



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

RENAN GABRIEL REQUENA

**INFLUÊNCIA DOS NÍVEIS DE HOMOCISTEÍNA SOBRE
MOLÉCULAS DE ADESÃO E ESTRESSE OXIDATIVO EM
PACIENTES COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO**

Londrina
2017

RENAN GABRIEL REQUENA

**INFLUÊNCIA DOS NÍVEIS DE HOMOCISTEÍNA SOBRE
MOLÉCULAS DE ADESÃO E ESTRESSE OXIDATIVO EM
PACIENTES COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO**

Dissertação apresentada ao programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Isaías Dichi.

Londrina
2017

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

Requena, Renan Gabriel.

Influência dos níveis de homocisteína sobre moléculas de adesão e estresse oxidativo em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico / Renan Gabriel Requena. - Londrina, 2017.

113 f. : il.

Orientador: Isaías Dichi.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2017.

Inclui bibliografia.

1. Lúpus eritematoso sistêmico - Tese. 2. Homocisteína - Tese. 3. Estresse oxidativo - Tese. 4. Moléculas de adesão - Tese. I. Dichi, Isaías. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

RENAN GABRIEL REQUENA

**INFLUÊNCIA DOS NÍVEIS DE HOMOCISTEÍNA SOBRE
MOLÉCULAS DE ADESÃO E ESTRESSE OXIDATIVO EM
PACIENTES COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO**

Dissertação apresentada ao programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

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

Profa. Dra. Andrea Name Colado Simão
Universidade Estadual de Londrina - UEL

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

Londrina, 10 de fevereiro de 2017.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela oportunidade concedida, pelos dons que me foram dados para que eu pudesse concluir esta jornada e pelas pessoas que colocou no meu caminho. A Ele honra, poder e glória para sempre

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Isaías Dichi, pelas inúmeras oportunidades concedidas, paciência comigo e conselhos que me foram dados, além de toda sabedoria e auxílio na conclusão deste trabalho.

Agradeço à Profa. Dra. Andrea Name Colado Simão, pela oportunidade de fazer este mestrado, conselhos, orientações em trabalhos, partes teórica e prática, por sua paciência e insistência comigo. Agradeço por seu exemplo, por partilhar sua sabedoria comigo e por me ajudar a ser uma pessoa melhor.

Ao Prof. Dr. Marcell Alysson Batisti Lozovoy, por fazer parte desta banca e por ter participado ativamente das pesquisas deste grupo, contribuindo com seu trabalho a vários projetos, incluindo o meu.

A todos os estagiários, alunos de pós graduação, professores, doutores e funcionários deste grupo de pesquisa e dos laboratórios de Imunologia e de Pós-Graduação. Para não correr o risco de ser injusto e esquecer alguém, não citarei nomes. Agradeço a todos em geral pela dedicação e esmero com os quais desempenham seu serviço. Em especial, agradeço a Nicole Perugini Stadtlober, a Bruna Miglioranza e a Poliana Macedo Guimarães que, além de amigas, foram fundamentais para a conclusão deste trabalho dando apoio técnico, intelectual e moral.

Agradeço a meu pai, Jefferson Requena, e a minha mãe, Marilda Farinácio Requena, por me darem as bases necessárias e o incentivo para que eu sempre me esforçasse em ter o melhor desempenho possível e sempre quisesse mais. Sei que nesta pós-graduação os decepcionei, mas tenho certeza que vendo-a ser concluída, estando comigo física e espiritualmente, terão orgulho do trabalho que fizeram.

À minha noiva, Fernanda Sitta Paludetto. Mesmo tendo começado nosso namoro após o início deste mestrado, seu apoio foi fundamental para sua conclusão. Mesmo quando eu não mais acreditava, quando pensei em desistir, quando encontrei dificuldades, ela foi o ajno que Deus enviou para me sustentar, apoiar, dar broncas e incentivar a continuar. Se hoje posso concluir este processo, foi muito graças a ela.

Um agradecimento especial vai àqueles que me ajudaram no começo de tudo, tanto da graduação como da vida profissional. À professora Sandra Regina Quintal Carvalho, por todo apoio e incentivo durante 5 anos seguidos de estágios, ao professor Walter Abou Murad, pelo incentivo e apoio nos primeiros momentos após o término da graduação. A todos do Laboratório Oswaldo Cruz, principalmente ao João Cláudio Santilli, Carolina Grignani S. Muñoz e Cristiane Scandiuzi Gusson, por formarem o meu caráter profissional e por me darem as bases para que eu pudesse crescer. A minha querida equipe de trabalho da Labimagem, Sandra, Eliane, Tatiane, Aline, Elizandra e a tantos outros que, entendendo meus momentos de estudo, me auxiliaram para que pudesse alcançar meus objetivos com êxito.

Por fim, agradeço a amigos e familiares, que sempre me apoiaram, incentivaram e torceram pelo meu sucesso. Obrigado a todos

“Uma coisa porém faço: esquecendo o que fica para trás, lanço-me para o que está à frente. Lanço-me em direção à meta, para conquistar o prêmio do que, do alto, Deus me chama a receber, no Cristo Jesus. É assim que nós, “perfeitos”, devemos pensar. E se tiverdes um outro modo de pensar, nisto também Deus vos esclarecerá. No entanto, qualquer que seja o ponto a que tenhamos chegado, continuemos na mesma direção.”
(Filipenses 3, 13-16).

REQUENA, Renan Gabriel. **Influência dos níveis de homocisteína sobre moléculas de adesão e estresse oxidativo em pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico**. 2016. 102 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017

RESUMO

O Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é uma doença inflamatória, crônica de origem autoimune. Sua principal característica é a presença de autoanticorpos, principalmente voltados contra o núcleo celular. Tem origem multifatorial, estando envolvidos em sua fisiopatologia fatores ambientais, genéticos e imunes. Com o passar dos anos, devido a um diagnóstico precoce e ao aumento no arsenal terapêutico, a sobrevida nos pacientes com diagnóstico de LES tem aumentado. Estudos têm mostrado que a comorbidade mais comum é a hipertensão e distúrbios cardiovasculares. Neste sentido, a homocisteína tem sido amplamente estudada nos pacientes com LES, pois é considerada um fator de risco de doenças cardiovasculares importante, além de estar relacionada com uma potencialização da disfunção endotelial. Estudos comprovam o aumento do nível de homocisteína nesses pacientes com LES. Além disso, devido ao caráter inflamatório que a doença tem, o estresse oxidativo, níveis de óxido nítrico e moléculas de adesão podem estar aumentados. **Justificativa:** Não há na literatura nenhum trabalho que relacione os níveis de homocisteína, estresse oxidativo, e disfunção endotelial em pacientes com LES. **Objetivo:** Avaliar se a hiperhomocisteinemia está associada à atividade da doença, a disfunção endotelial e ao estresse oxidativo em pacientes com LES. **Materiais e métodos:** O estudo incluiu 176 sujeitos; 50 indivíduos saudáveis (grupo controle) e 126 pacientes com LES. Determinaram-se os níveis de homocisteína, as medições de estresse oxidativo (TRAP, AOPP e hidroperóxido), metabólitos do Óxido Nítrico (NOx), as moléculas de adesão (VCAM, ICAM, PECAM, E-Selectina e P-Selectina), além do inibidor do ativador do plasminogênio (PAI). **Resultados:** Os pacientes com níveis elevados de homocisteína ($\geq 10,59$) apresentaram aumento nos níveis de hidroperóxidos ($p = 0,015$), AOPP ($p = 0,022$), NOx ($p = 0,011$), PECAM-1 ($p = 0,037$), VCAM ($p = 0,026$), E-selectina ($p = 0,017$), P-selectina ($p = 0,047$) e valores TRAP mais baixos ($p = 0,015$) do que pacientes com níveis mais baixos de homocisteína ($< 10,59$). Em uma regressão logística binária que incluiu marcadores e parâmetros com relevância estatística entre os grupos com homocisteína $< 10,59$, como grupo de referência, e homocisteína $\geq 10,59$, TRAP (OR = IC95%: 0,976; $p = 0,006$) foi encontrado inversamente associado, enquanto que os hidroperóxidos (OR = IC 95%: 1,000; $p = 0,012$), NOx (OR = IC 95%: 1,122; $p = 0,027$) e PECAM-1 (OR = 95%) foram encontradas diretamente associadas. **Conclusões:** O comportamento de algumas moléculas de adesão e marcadores de estresse oxidativo podem ser altamente influenciados pelos níveis de homocisteína. Os dados obtidos no presente estudo permitem sugerir que esforços especiais podem ser direcionados para diminuir os níveis de homocisteína no LES.

Palavras-chave: Lúpus eritematoso sistêmico. Homocisteína. Moléculas de adesão. Estresse oxidativo.

REQUENA, Renan Gabriel. **Influence of homocysteine levels on adhesion molecules and oxidative stress in patients with Systemic Lupus Erythematosus.** 2016.102 p. Dissertation (Master degree in Health Sciences) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

ABSTRACT

Systemic lupus erythematosus (SLE) is an inflammatory, chronic disease of autoimmune origin. Its main characteristic is the presence of autoantibodies, mainly directed against the cellular nucleus. Its origin is multifactorial, being involved in its pathophysiology environmental, genetic and immune factors. Over the years, due to an early diagnosis and an increase in the therapeutic arsenal, survival in patients diagnosed with SLE has increased. Studies have shown that the most common comorbidity is hypertension and cardiovascular disorders. In this sense, homocysteine has been widely studied in patients with SLE since it is considered an important risk factor for cardiovascular diseases, besides being related to a potentiation of endothelial dysfunction. Studies have confirmed the increase in homocysteine level in these SLE patients. In addition, due to the inflammatory nature of the disease, oxidative stress, nitric oxide levels and adhesion molecules may be increased. **Justification:** There is no literature that relates homocysteine levels, oxidative stress, and endothelial dysfunction in SLE patients. **Objective:** To evaluate whether hyperhomocysteinemia is associated with disease activity, endothelial dysfunction and oxidative stress in patients with SLE. **Materials and methods:** The study included 176 subjects; 50 healthy subjects (control group) and 126 SLE patients. The levels of homocysteine, oxidative stress measurements (TRAP, AOPP and hydroperoxide), nitric oxide metabolites (NOx), adhesion molecules (VCAM, ICAM, PECAM, E-Selectin and P-Selectin) and plasminogen activator inhibitor (PAI) were determined. **Results:** Patients with high homocysteine levels (≥ 10.59) presented higher levels of hydroperoxides ($P = 0.015$), AOPP ($p = 0.022$), NOx ($p = 0.011$), PECAM-1 ($p = 0.037$), VCAM 0.026), P-selectin ($p = 0.047$) and lower TRAP values ($p = 0.015$) than patients with lower levels of homocysteine (< 10.59). In a binary logistic regression that included markers and parameters with statistical significance between the groups with homocysteine < 10.59 as reference group, and homocysteine ≥ 10.59 , TRAP (OR = 95% CI: 0.976; $p = 0.006$) was found (OR = 95% CI: 1,000, $p = 0.012$), NOx (OR = 95% CI: 1.122, $p = 0.027$) and PECAM-1 (OR = 95%) were found to be directly associated with hydroperoxides. **Conclusions:** The behavior of some adhesion molecules and markers of oxidative stress can be highly influenced by homocysteine levels. The data obtained in the present study suggest that special efforts may be directed at lowering homocysteine levels in SLE.

Keywords: Systemic lupus erythematosus. Homocysteine. adhesion molecules. Oxidative stress.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Genes que podem influenciar o LES	17
Figura 2 – Cascata de reação de lipoperoxidação	23
Figura 3 – Mecanismos potenciais da disfunção endotelial induzida por hiperhomocisteinemia	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Critérios de classificação do LES pelo Colégio Americano de Reumatologia (CAR) de 1997	19
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADMA	<i>Assymmetric Dimethylarginine</i>
ANA	Anticorpos Anti-nuclear
Anti-dsDNA	Anti-DNA dupla fita
AOPP	<i>Advanced Oxidation Proteins Products</i>
CAC	Calcificação da Artéria Coronária
CAM	<i>Cell Adhesion Molecule</i>
CAR	Colégio Americano de Reumatologia
CAT	Transportador catiônico de aminoácidos
CL-LOOH	Hidroperóxidos
CPM	Contagens por Minuto
DCV	Doença Cardiovascular
DDAH	Dimetilarginina-Dimetilaminohidrolase
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
EDRF	<i>Endothelial-Derived Relaxing Factor</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
eNOS	Óxido Nítrico Sintase Endotelial
ERN	Espécies Reativas de Nitrogênio
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
FAN	Fator Anti-núcleo
HDL	<i>High Density Lipoprotein</i>
HNE	4-hidroxi nonenal
ICAM-1	<i>Intercellular Cell Adhesion Molecule</i>
IFI	Imunofluorescência Indireta
Ig	Imunoglobulina
IL-1	Interleucina1
IL-17	Interleucina 17
IL-2	Interleucina2
IMC	Índice de Massa Corporal
INF- α	Intérferon α
INF- β	Intérferon β
INF- γ	Intérferon γ
iNOS	Oxido Nítrico Sintase Induzível

LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
LES	Lúpus Eritematoso Sistêmico
MDA	Malondialdeído
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
NFkB	<i>Nuclear Factor- kB</i>
nNOS	Óxido Nítrico Sintase Neuronal
NO	Óxido Nítrico
NO ₂ ⁻	Nitrito
NO ₃ ⁻	Nitrato
NO _x	Metabólitos do Ácido Nítrico
O ₂	Oxigênio Molecular
ONOO ⁻	Peroxinitrito
oxHDL	HDL oxidado
PA	Pressão Arterial
PAI-1	<i>Plasminogen Activator Inhibitor</i>
PCR	Proteína C Reativa
PECAM-1	<i>Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule</i>
RI	Resistência à Insulina
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
RNA _m	<i>Ribonucleic Acid Messenger</i>
-SH	Grupos Sulfidril
SLEDAI	<i>Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SO	Radical Superóxido
TLR	<i>Toll-like Receptor</i>
TNF- α	<i>Tumoral Necrosis Factor α</i>
TRAP	<i>Total Radical-Antioxidant Parameter</i>
VCAM-1	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule</i>
VDRL	<i>Venereal Disease Research Laboratory</i>
VHS	Velocidade de Hemossedimentação

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO	15
1.2	EPIDEMIOLOGIA NO LES	15
1.3	ETIOLOGIA E FISIOPATOLOGIA DO LES	16
1.4	DIAGNÓSTICO CLÍNICO E LABORATORIAL DOLES	18
1.5	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA DOENÇA	20
1.6	LES E ESTRESSE OXIDATIVO	21
1.7	LES E ÓXIDO NÍTRICO	25
1.8	HIPERTENÇÃO, DOENÇAS CARDIOVASCULARES E LES	26
1.9	HOMOCISTEÍNA E LES	28
1.10	DISFUNÇÃO ENDOTELIAL, MOLÉCULAS DE ADESÃO E LES	30
2	JUSTIFICATIVA	34
3	OBJETIVOS	35
3.1	OBJETIVO GERAL	35
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
4	MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1	DELINEAMENTO DO ESTUDO	36
4.2	MEDIÇÕES ANTROPOMÉTRICAS	36
4.3	ANÁLISES BIOQUÍMICAS E IMUNOLÓGICAS	37
4.4	MEDIDAS DE ESTRESSE OXIDATIVO	37
4.4.1	QUIMIOLUMINESCÊNCIA (QL) INDUZIDA POR TERC-BUTIL- HIDROPERÓXIDO (CL-LOOH)	37
4.4.2	DETERMINAÇÃO DE PRODUTOS AVANÇADOS DE OXIDAÇÃO PROTEICA (AOPP)	38
4.4.3	ÓXIDO NÍTRICO (NO)	38
4.4.4	CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL DO PLASMA	38
4.5	MOLÉCULAS DE ADESÃO	38
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	39

5	RESULTADOS	39
5.1	ARTIGO	40
6	CONCLUSÃO	71
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	72
8	REFERÊNCIAS	73
	ANEXOS	84
	ANEXO 1 – APROVAÇÃO DO CEP/UEL	85
	ANEXO 2 – Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index – SLEDAI (Bombardier et al., 1992)	88
	Anexo 3 – Guideline para autores da revista <i>Immunobiology</i>	89
	APÊNDICES	103
	APÊNDICE 1 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (para grupo de pacientes)	104
	APÊNDICE 2 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (para grupo controle)	107
	APÊNDICE 3 - Questionário grupo controle	110
	APÊNDICE 4 - Ficha de avaliação (pacientes projeto LES)	112

1 INTRODUÇÃO

2 1.1 LUPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO

3

4 O Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é uma doença inflamatória crônica, de
5 origem multifatorial. O termo foi inicialmente usado para descrever lesões de
6 pele, porém, após mais de 100 anos de pesquisas e observações, constatou-se que
7 o LES é uma doença que atinge múltiplos órgãos, tais como sistema nervoso
8 central, sistema cardiovascular, sangue, pele, rins entre outros (DUARTE et. al.,
9 2011).

10 A origem imunológica do LES se dá pela presença de autoanticorpos. Estes
11 autoanticorpos são produzidos normalmente pela resposta imune adquirida, porém,
12 uma resposta imune inata inadequada está envolvida na produção dos mesmos, o
13 que pode desencadear tanto o início da doença quanto a suamanutenção(OATES;
14 GILKESON, 2006). Os autoanticorpos são principalmente contra o núcleo celular,
15 sendo denominados anticorpos antinucleares. Estes podem ser classificados em
16 quatro classes: anticorpos contra o ácido desoxirribonucleico (DNA), anticorpos
17 contra proteínas histonas, anticorpos contra proteínas ligadas ao ácido ribonucleico
18 (RNA) e anticorpos contra antígenos nucleolares (KOTZIN; O DELL, 1995; HAHN,
19 1998).

20

21 1.2 EPIDEMIOLOGIA DO LES

22

23 A incidência e prevalência dos casos de LES vem aumentando conforme o
24 passar dos anos. A principal hipótese da causa deste aumento é um diagnóstico
25 mais preciso de casos mais brandos e uma evolução na terapia desta, aumentando
26 a sobrevida dos pacientes já diagnosticados(LISNEVSKAIA; MURPHY; ISENBERG,
27 2014). Estudos multiétnicos feitos em 2007, com as populações dos Estados Unidos,
28 Reino Unido e Japão apresentaram taxas de incidência e prevalência de 5,1/100.000
29 e 52,2/100.000; 3,8/100.000 e 26,2/100.000; 2,9/100.000 e 28,4/100.000,

1 respectivamente. Estes números são significativamente maiores em populações de
2 descendência latina ou africana (D´CRUZ et. al., 2007).

3 Na comparação de gêneros, a proporção feminino-masculino é de 9:1. Dentro
4 do gênero feminino, o maior número de casos se concentra nas mulheres de idade
5 fértil. Uma proporção de 2-6:1 e 3-8:1 é encontrado em faixas etárias mais jovens e
6 mais idosas, respectivamente(LISNEVSKAIA; MURPHY; ISEBERG, 2014).

7 As taxas de mortalidade dos pacientes com LES vem diminuindo com o
8 passar dos anos. Em estudo publicado em 1955 por Margaret Merrell e Lawrence E.
9 Shulman (1955), a taxa de sobrevida nos 5 primeiros anos após o diagnóstico da
10 doença era de 50%. Já em 1970, estudos publicados em diversas partes do mundo
11 apontavam um aumento da taxa para 90%. Além disso, a porcentagem dos
12 pacientes que alcançaram uma sobrevida de 15 a 20 anos é de 80%(PONS-ESTEL
13 et al., 2010).

14 No Brasil, estudos sobre incidência, prevalência e taxas/causas de
15 mortalidade são escassos. Um estudo de 2008 feito com a população de Cascavel,
16 no estado do Paraná, mostra uma taxa de incidência de 4,8 casos por 100.00
17 habitantes/ano. Todos os casos no período estudado foram do sexo feminino e,
18 analisando somente este gênero, a incidência é de 9,3 casos / 100.000
19 habitantes/ano(NAKASHIMA et al., 2011).

20

21 **1.3 ETIOLOGIA E FISIOPATOLOGIA DO LES**

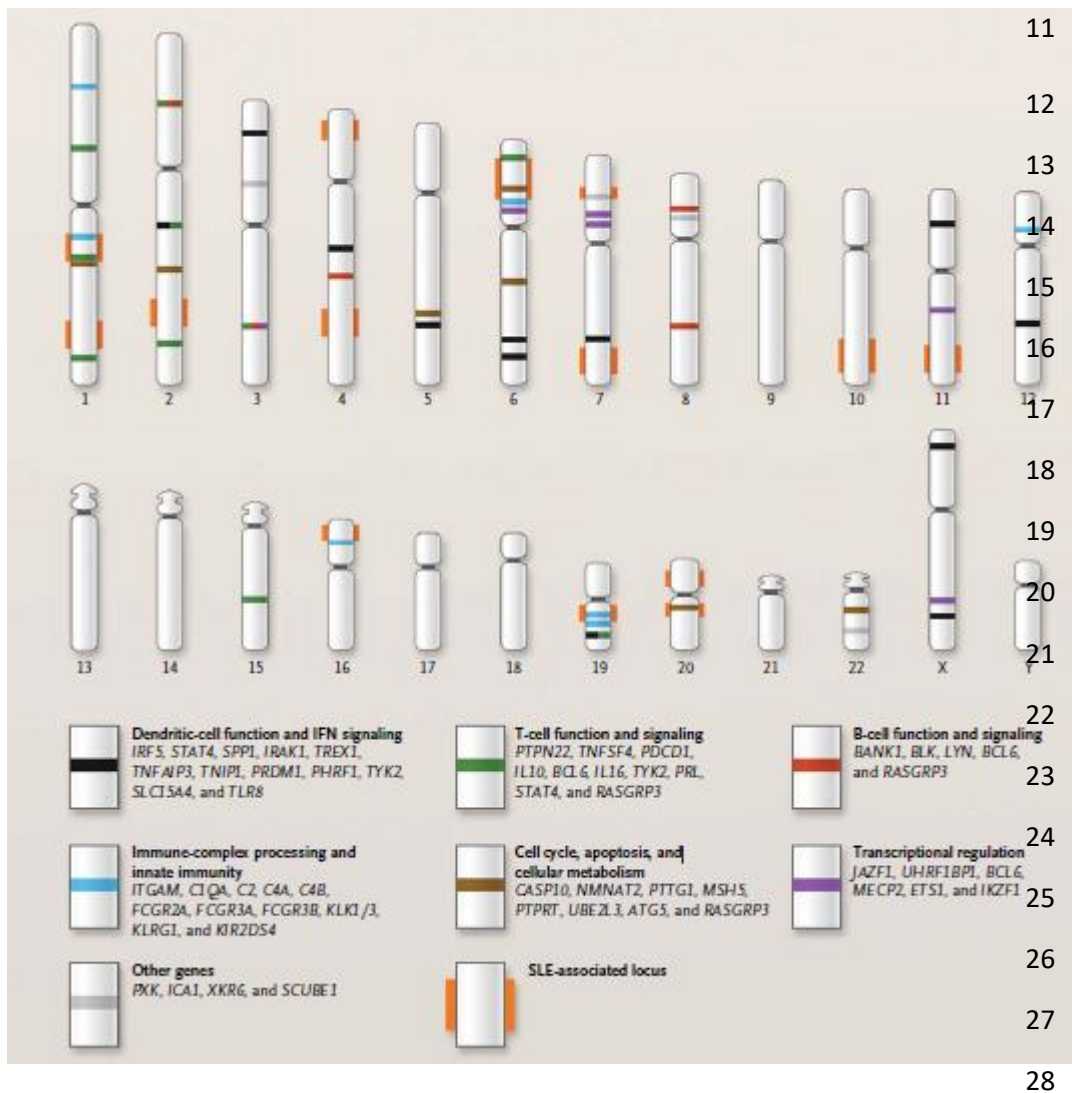
22

23 O LES é uma doença de origem multifatorial. Estão envolvidos em sua
24 fisiopatologia e etiologia fatores genéticos e ambientais, bem como distúrbios nas
25 imunidades inatas e adaptativas. Tais distúrbios são, por exemplo, deficiência na
26 depuração de células apoptóticas, produção diferenciada de citocinas, falha na
27 imunidade de células B e sinalização celular deficiente das células T (KLEIN-
28 GITELMAN; LANE, 2016).

29 Sem dúvida alguma, os fatores genéticos são predisponentes para o paciente
30 ter ou não LES. Porém, o que torna o estudo genético difícil é que, apenas em casos

1 raros, o LES pode ser associado a apenas um gene, como por exemplo, os genes
 2 da produção dos elementos do sistema complemento C1q e C4(RULLO; TSAO,
 3 2013).Os genes que influenciam a patogênese e fisiopatologia do LES podem ser
 4 agrupados da seguinte maneira: genes que regulam a sinalização do int erferon e
 5 fun o de c lulas dendr ticas; genes da fun o e regula o das c lulas T; genes da
 6 fun o e regula o das c lulas B; genes da fun o e regula o da imunidade inata e
 7 imunocomplexos; genes que regulam o ciclo celular, apoptose e metabolismo
 8 celular; genes de regula o transcricional (KLEIN-GITELMAN; LANE, 2016). A
 9 Figura 1 mostra tais genes e seus respectivos *loci*.

10 **Figura 1 – Genes que podem influenciar o LES**



29 **Fonte:** KLEIN-GITELMAN; LANE, 2016

30

1 Autoantígenos são os iniciadores da doença. Por algum motivo desconhecido,
2 elementos intracelulares ficam expostos devido a alguma lesão tecidual e indivíduos
3 com propensão genética não tem estes elementos devidamente depurados, fazendo
4 com que eles sejam expostos ao sistema imune como antígenos, o que gera
5 produção de anticorpos (KLINMAN et al., 1991). Estes restos celulares também
6 podem ser devido à falha na apoptose programada de algumas células. Durante a
7 apoptose, um processo de homeostase normal em determinados tecidos (DIEKER;
8 VAN DER VLAG; BERDEN, 2004), restos celulares expressam algumas moléculas
9 como a fosfatidilserina, que irão sinalizar a células imunes circulantes para fagocitá-
10 los. Estes restos celulares também emitem sinais que atraem células dendríticas e
11 macrófagos. Quando estes fagócitos não conseguem fazer a limpeza
12 adequadamente, principalmente de restos nucleares, células apresentadoras de
13 antígeno fazem sua captura e através de interações com células B e T, são
14 desenvolvidos os anticorpos antinucleares (LISNEVSKAIA; MURPHY; ISENBERG,
15 2014).

16

17 **1.4 DIAGNÓSTICO CLÍNICO E LABORATORIAL DO LES**

18

19 Em 1997, o Colégio Americano de Reumatologia (CAR) propôs uma série de
20 critérios clínicos e laboratoriais para o diagnóstico do LES (HOCHBERG, 1997). A
21 Tabela 1 descreve estes critérios.

22 O LES é caracterizado pela produção de autoanticorpos contra diversos
23 antígenos celulares, seu estudo é importante, não só para o diagnóstico, como para
24 monitoramento da doença. A dosagem quantitativo-qualitativa destes autoanticorpos
25 é feita por imunofluorescência indireta (IFI). A pesquisa de anticorpos antinucleares
26 (ANA), ou como ainda é frequentemente chamada no meio médico e laboratorial,
27 fator antinúcleo (FAN), (DELLAVANCE; LESER; ANDRADE, 2007). O padrão mais
28 comum encontrado em pacientes com LES é o homogêneo, apresentando
29 reatividade geralmente contra a cromatina, proteínas histonas e DNA (ARTICLE,
30 2002). Outro anticorpo importante é o anti DNA dupla fita (anti-dsDNA), sendo o

1 método padrão ouro para detecção deste anticorpo é a IFI (BERTSIAS et al., 2013;
2 CASTRO; GOURLEY, 2010)

3

4 **Tabela 1** – Critérios de classificação do LES pelo Colégio Americano de
5 Reumatologia (CAR) de 1997

Eritema Malar

Lesão cutânea crônica (discóide)

Fotossensibilidade

Úlcera oral ou nasofaríngea

Artrite não erosiva, acometendo duas ou mais articulações

Serosite: pleurite (dor/derrame/atrito) ou pericardite
(dor/derrame/atrito/alteração no eletrocardiograma)

Acometimento renal: proteinúria persistente >0,5g/24h OU >3+ no exame de
urina ou cilindros celulares

Convulsão ou psicose

Alterações hematológicas: anemia hemolítica com reticulócitose/ou
leucopenia < 4.000/mm³ OU linfopenia < 1.500/mm³ (em duas ou mais
ocasiões) ou trombocitopenia < 100.000/mm³ (em duas ou mais ocasiões)

Alterações imunológicas: anti-DNA positivo ou presença de anti-Sm positivo
OU anticorpo anti fosfolípide positivo (anticoagulante lúpico positivo e/ou
anticardioplipina positivo (IgM/IgG) e/ou VDRL falso positivo por pelo menos 6
meses.

Presença de anticorpos antinucleares: título elevado de ANA pela IFI ou teste
equivalente, em qualquer época da investigação

Requer 4 ou mais de 11 critérios durante evolução ou simultaneamente

6

7 CAR: Colégio Americano de Reumatologia;

8 LES: Lúpus Eritematoso Sistêmico;

9 Ig: imunoglobulina;

10 VDRL: sigla de Venereal Disease Research Laboratory para detecção de sífilis

11 ANA: Anticorpo anti-nuclear;

12 IFI: imunofluorescência indireta.

13 **Fonte:** Adaptado de Hochberg, 1997.

14

1 Além desses testes, outros exames são necessários para o diagnóstico mais
2 preciso, além do acompanhamento da atividade da doença. A velocidade de
3 hemossedimentação (VHS) e a proteína C reativa (PCR) são os exames mais
4 comuns para avaliação da atividade inflamatória. Quanto mais elevados forem seus
5 níveis, maior será a atividade inflamatória (CASTRO; GOURLEY, 2010). Além disso,
6 outros anticorpos são avaliados na prática clínica. São eles: Anti-Ro, Anti-La, Anti-
7 Sm, Anti-RNP, anti-nucleossomo, anti-Ribossomal, anti-fosfolipídeos, e mais uma
8 infinidade(YANIV et al., 2015). Por fim, é avaliado também o sistema complemento.
9 Geralmente são mensurados níveis de C3, C4 e CH50. Níveis baixos dos elementos
10 do complemento indicam consumo, ou seja, a cascata está sendo constantemente
11 ativada, o que pode levar a formação e deposição de imunocomplexos nos órgãos
12 alvo, especialmente nos rins. Porém, o aumento dos níveis de C3 e C4 indica uma
13 desordem inflamatória, já que essas moléculas são proteínas de fase
14 aguda(CASTRO; GOURLEY, 2010).

15

16 **1.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA DOENÇA**

17

18 Para avaliação da atividade da doença, são levados em consideração fatores
19 clínicos, como o histórico clínico, exame físico e avaliação geral, assim como os
20 laboratoriais. Para poder padronizar e escalonar tais parâmetros, vários índices e
21 critérios foram criados. Dentre eles está o *Systemic Lupus Erythematosus Disease*
22 *Activity Index* (SLEDAI). Este score está baseado em 24 parâmetros clínico-
23 laboratoriais que avaliam a atividade da doença nos últimos 10 dias. Tal índice pode
24 ter um *score* de 0, que significa doença inativa, a 105, que representa doença com
25 uma alta atividade. Petri et. al., em 1991, publicou um artigo classificando a atividade
26 da doença segundo os seguintes parâmetros: Doença sem atividade (SLEDAI = 0),
27 atividade leve (SLEDAI 1-5), atividade moderada (SLEDAI 6-10), atividade alta (11-
28 19) e atividade muito alta (SLEDAI ≥20) (PETRI et. al., 1991).

29 Como já referido anteriormente, os níveis séricos de C3 e C4 estão
30 relacionados com a atividade da doença. Quando há uma queda nos seus valores,
31 há uma atividade maior da doença, pois eles estão sendo consumidos, dando

1 origem aos imunocomplexos, o que significa um provável comprometimento de
2 órgãos, principalmente rins. Outro fator que pode ser relacionado à atividade da
3 doença é o anti-dsDNA. Títulos séricos elevados estão associados a uma doença
4 ativa (BOMBARDIER et. al., 1992)

5 **1.6 LES E ESTRESSE OXIDATIVO**

6
7 Estresse oxidativo é o desequilíbrio entre a produção de agentes oxidantes e
8 a capacidade do organismo de desintoxicar prontamente tais agentes, podendo
9 causar grande dano ao organismo (PREISER, 2012). Tais agentes oxidantes
10 recebem o nome de espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de
11 nitrogênio (ERN). O termo ERO pode ser aplicado tanto a radicais livres quanto a
12 intermediários não radicalares. Os radicais livres são espécies moleculares
13 altamente reativas por ter um ou mais elétrons desemparelhados (BURTON;
14 JAUNIAUX, 2011). Tais radicais são encontradas em condições fisiológicas. Os
15 fagócitos, como monócitos e neutrófilos, são os principais produtores dos radicais
16 livres, pois tais EROs estarão envolvidas na resposta imune contra partículas
17 estranhas e microrganismos (BROWN et al., 2006). Por sua vez, os agentes
18 antioxidantes podem inibir os ataques dos radicais livres. Eles podem ser
19 enzimáticos ou não enzimáticos. Como agentes enzimáticos, temos a enzima
20 superóxido desmutase, a glutathione peroxidase e a catalase. Já os agentes não
21 enzimáticos externos são o ácido ascórbico (Vitamina C), o α -tocoferol (Vitamina E)
22 e o ácido úrico e a glutathione reduzida-GPX, como agente interno (BURTON;
23 JAUNIAUX, 2011).

24 Diversos estudos foram feitos para verificar os efeitos do estresse oxidativo
25 nos pacientes com LES. As conclusões que se tem chegado são de que tal condição
26 está envolvida desde a patogênese da doença até a ocorrência de danos em
27 determinados órgãos e o estadiamento do LES (LEE et. al., 2016; PERL, 2013;
28 TSOKOS, 2011).

29 Estudos apontam que a produção excessiva de EROs e uma alteração no
30 equilíbrio redox podem causar alterações no processo de apoptose (LOPEZ-
31 PEDRERA et. al, 2016; SHAH et. al., 2013; MUNOZ et al., 2008). Tais alterações

1 vão desde o aumento de células apoptóticas até a deficiência da limpeza dos restos
2 celulares (SHAH et al., 2014). Esta deficiência prolonga a exposição de restos
3 celulares ao sistema imune e a interação dos mesmos com as EROs, podendo
4 originar novos epítomos, aumentando assim os tipos de auto-anticorpos formados,
5 levando à inflamação e danos em órgãos (AHSAN; ALI; ALI, 2003).

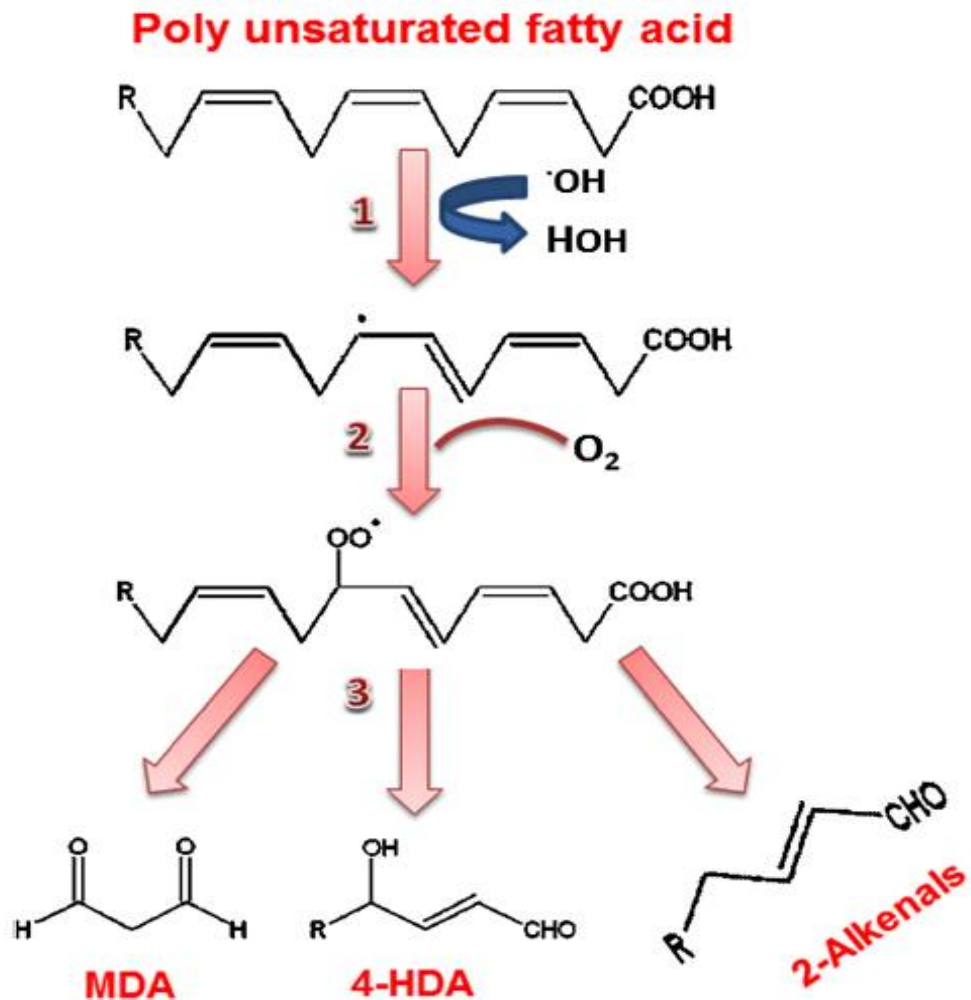
6 Por serem altamente reativos, as EROs podem reagir com todos os tipos de
7 biomoléculas. Portanto lipídeos, proteínas e o DNA podem ser danificados e os
8 produtos das cascatas de reação entre tais moléculas e EROs podem ser
9 quantificados em elementos biológicos, como soro, plasma, urina, eritrócitos e
10 leucócitos. Sendo assim, sua detecção qualitativa ou quantitativa pode funcionar
11 como biomarcadores relacionados com atividade da doença e danos
12 em órgãos(LOZOVYOY et al., 2011; SHAH et al., 2010).

13 Os lipídeos são os primeiros alvos das EROs, principalmente os lipídeos de
14 membrana celular, dando início a um processo chamado de lipoperoxidação. Esta
15 lipoperoxidação pode causar alteração na estrutura da membrana celular, alteração
16 em suas funções normais e de sua permeabilidade. Além disso, ela forma produtos
17 tóxicos que podem ser reativos a outras moléculas(NIKI, 2008),como as proteínas
18 histonas, o que podem gerar novos epítomos (ALZOLIBANI et al., 2013),DNA, que
19 pode dar origem ao anticorpo anti-DNA(GEHRKE et al., 2013) e lipoproteínas de
20 baixa densidade (LDL), dando origem a moléculas pró-aterogênicas(STEINBERG,
21 2009). Como fator aterogênico, também a peroxidação lipídica favorece a adesão de
22 macrófagos nos vasos, sendo fator importante na formação da placa de
23 ateroma(LINDAHL, 2000).

24 A figura 2 representa esquematicamente tais reações. A reação de
25 lipoperoxidação começa com a fase inicial (1), onde as EROs, especialmente
26 radicais hidroxila, reagem com os lipídios de membrana, sequestrando um
27 hidrogênio de um carbono insaturado, formando um dieno conjugado e deixando um
28 elétron desemparelhado. Na fase de propagação (2), o carbono reage com o
29 oxigênio molecular (O₂), levando a formação de radicais peroxil, que são altamente
30 reagentes. Estes radicais irão reagir com outras moléculas de lipídeos, formando as
31 moléculas de hidroperóxido. Também os radicais peroxil podem produzir novos
32 radicais de ácidos graxos, o que resulta em uma reação em cadeia. Apesar disso, os

1 produtos finais dessas reações (3) são bastante conhecidos, como o malondialdeído
 2 (MDA), 4-hidroxi-2-nonenal (HNE), isoprostanos e lipoproteína de alta densidade
 3 (HDL) oxidado (oxHDL).

4 **Figura 2 – Cascata de reação de lipoperoxidação**



5 **Fonte:** (SHAH et al., 2014) **Legenda:** MDA (Malondialdeído); 4-HDA (4-hidroxi-2-
 6 nonenal)

7 O MDA é o principal produto e o marcador biológico mais estudado da
 8 peroxidação lipídica. Ele é um aldeído potencialmente tóxico e altamente reativo.
 9 Suas interações com proteínas e moléculas de DNA são frequentemente relatadas
 10 como aterogênicas e mutagênicas (DEL RIO; STEWART; PELLEGRINI, 2005).
 11 Estudos mostram níveis de MDA e de proteínas modificadas pelo MDA aumentados
 12 no LES (BEN MANSOUR et al., 2010; SHAH et al., 2010). O HNE é um aldeído
 13 insaturado e é considerado o produto mais reativo da peroxidação lipídica (SHAH et
 14 al., 2014) Além disso, ele também pode se ligar covalentemente a proteínas e aos
 15 ácidos nucleicos, causando modificações estruturais e funcionais

1 dosmesmos(WANG et al., 2010). Em 2013, Alzolibani et. al. publicaram um estudo
2 comprando a modificação causada pelo HNE em proteínas histonas em pacientes
3 com LES, podendo dar origem a novos epítomos. Outro biomarcador que pode ser
4 estudado é o hidroperóxido. É um marcador considerado mais sensível e com
5 menos interferentes possíveis (SIMAO et al., 2008). Em dois estudos, Lozovoy *et. al.*
6 mostraram aumento da peroxidação lipídica, pela avaliação dos hidroperóxidos
7 através do método de quimioluminescência, em pacientes com LES(LOZOVOY;
8 SIMAO, 2011; LOZOVOY et al., 2014)

9 Dada a sua abundância em tecidos e no plasma, as proteínas são o principal
10 alvo das EROs. Tem-se por definição que oxidação de proteínas são modificações
11 covalentes induzidas por EROs, ou por reações secundárias com bioprodutos de
12 reações prévias de estresse oxidativo, com capacidade de alterar sua função e
13 estrutura(SHACTER, 2000). O dano oxidativo a essas proteínas pode ocorrer
14 por diversos mecanismos, como quebra da estrutura principal, ligações cruzadas ou
15 alteração do tamanho da cadeia ou mesmo de cada aminoácido. Os danos
16 oxidativos às proteínas são irreparáveis e, dentre as funções alteradas, estão a
17 inibição de atividades enzimáticas, alteração na imunogenicidade, proteólise e
18 agregação das mesmas (DALLE-DONNE et al., 2006).

19 As proteínas carbonílicas são um grupo formado pela oxidação em resíduos
20 de aminoácidos específicos, tais como arginina, treonina, lisina, prolina e histidina.
21 Elas circulam no sangue por longos períodos, e podem estar relacionados com a
22 atividade da doença(SHAH et al., 2014). Já as proteínas nitrotirosinas são formadas
23 pela reação com ERNs, como o peroxinitrito e o dióxido de nitrogênio, nos resíduos
24 de tirosina das proteínas. Alguns estudos mostram associações de artrite,
25 envolvimento renal e cardíaco com o aumento da 3-nitrotirosina(SHAH et al., 2014;
26 ZHANG et al., 2010).

27 Apesar de o método mais comumente utilizado para avaliação da oxidação
28 proteica seja a detecção de proteínas carbonílicas, os produtos avançados de
29 oxidação proteica (AOPP) são marcadores bastante importantes e facilmente
30 analisados. Os AOPP são formados principalmente pelo aumento da liberação de
31 mieloperoxidase pelos macrófagos. Possuem vários agentes cromóforos, o que
32 facilita sua detecção por espectrofotometria simples (HANASAND et al., 2012).

1 Vários estudos foram conduzidos associando o LES e AOPP. Em um estudo de
2 2011, Lozovoy *et. al.* compararam pacientes com LES com um grupo controle de
3 indivíduos saudáveis e demonstraram que os pacientes com LES possuem um nível
4 maior de AOPP do que os do controle(LOZOVOY *et al.*, 2011).

5

6 **1.7 LES E ÓXIDO NÍTRICO**

7

8 O óxido nítrico (NO) é uma molécula de curta meia vida que desempenha um
9 importante papel fisiológico, como regulação do tônus vascular, funções
10 mitocondriais e de apoptose. Além disso, ela inibe a adesão de leucócitos às células
11 endoteliais e a agregação plaquetária. Existem três enzimas que o produzem, as
12 chamadas oxido nítrico sintetases (NOS): a NOS neuronal (nNOS), a endotelial
13 (eNOS) e a induzível (iNOS) (NAGY *et al.*, 2010a). Ele é produzido durante a
14 conversão da L-arginina para a L-citrulina.

15 Em um estado de estresse oxidativo, inflamatório ou de dano tecidual, a iNOS
16 é estimulada a produzir um valor quase 1000 vezes maior do que o valor normal.
17 Isto leva a conclusão de que o NO está presente e medeia a resposta inflamatória.
18 Além disso, o NO regula o sinal de transdução pela regulação da sinalização
19 decálcio(GUNNETT; HEISTAD; FARACI, 2003; NAGY *et al.*, 2010b).

20 No LES, a patogenicidade do NO é ligada a sua reação com o radical
21 superóxido (SO) para formar uma molécula extremamente reativa, o peroxinitrito
22 (ONOO⁻) (OATES; GILKESON, 2006). Porém, quando falamos dos metabólitos do
23 NO (NOx), os resultados são contraditórios. Belmente *et. al.*, 1997 e Wanchu *et. al.*,
24 2001, publicaram seus trabalhos relatando aumento do NOx, enquanto Wigand *et.*
25 *al.*, 1997 e Gonzales-Crespo *et. al.*, 1998, relataram baixos níveis de NOx.

26 Em publicações feitas pelo nosso grupo de pesquisas, foram demonstrados
27 altos níveis na produção de NO. Esta produção estava aumentada pelo próprio
28 estresse oxidativo. Tal condição pode, simultaneamente, aumentar o consumo do
29 NO e NOx, o que diminui sua biodisponibilidade (LOZOVOY *et al.*, 2014; OLIVEIRA
30 *et al.*, 2012; SIMAO *et al.*, 2008).

1

2

3 **1.8 HIPERTENSÃO, DOENÇAS CARDIOVASCULARES E LES**

4

5 A hipertensão é uma comorbidade bastante comum entre os pacientes com
6 LES. Vários estudos revelam uma alta prevalência desta, chegando a 74% em
7 algumas coortes (BUDMAN; STEINBERG, 1976; AL-HERZ, 2003). Um número alto
8 se compararmos com indivíduos saudáveis. Em 2007, um estudo publicado pelo
9 *National Center for Health Statistics*, dos Estados Unidos, publicou um estudo de
10 prevalência que indicou que em mulheres saudáveis a prevalência é de 2,7% na
11 faixa etária de 20 a 34 anos e de 14% entre 35 e 44 anos. Embora ainda não
12 totalmente elucidados, são vários os mecanismos que podem levar a hipertensão
13 em pacientes com LES (TAYLOR; RYAN, 2016). Entre eles podem estar o fato de o
14 LES ser uma doença inflamatória crônica, e as citocinas liberadas influenciarem
15 positivamente o desenvolvimento da hipertensão. Além disso, outros fatores, tais
16 como comprometimento renal, estresse oxidativo, disfunção endotelial, fatores
17 hormonais, podem estar presentes (RYAN, 2009).

18 Há tempos já se sabe o papel fundamental dos rins no controle da pressão
19 arterial (PA) (COLEMAN et. al., 1975; HALL et. al., 2000). Portanto, visto que existe
20 uma estimativa de 60% dos pacientes com LES serem portadores de
21 glomerulonefrite, causada pela deposição de imunocomplexos nos glomérulos
22 (LALWANI et. al., 2015), observa-se a importância da disfunção renal no
23 desenvolvimento da hipertensão em pacientes com LES. Fatores como a
24 hemodinâmica renal e função tubular prejudicada contribuem na disfunção renal e,
25 por consequência, no aumento da hipertensão (RYAN, 2009).

26 Estudos propõem que o endotélio vascular tem sua função prejudicada em
27 pacientes com LES, mostrando o aumento do risco cardiovascular (ALVES; AMES,
28 2003). Além disso, a hipertensão está associada a uma disfunção endotelial e
29 autoanticorpos e mediadores inflamatórios podem estar associados à expressão de
30 moléculas de adesão pelo endotélio vascular (BIJM, 2003). Porém, demonstrar se a
31 disfunção endotelial é causadora ou está associada à sua progressão é difícil. Isto

1 se deve à diversidade dos pacientes, atividade da doença e tratamento adotado.
2 Sabe-se, por exemplo, que o uso de corticosteroides pode levar a uma disfunção
3 endotelial e hipertensão (MAXWELL; MOOTS; KENDALL, 1994, DASGUPTA; 2016).

4 A geração de EROs nos rins é um mecanismo largamente conhecido como
5 potencial causador de hipertensão, tanto pelo mecanismo vascular quanto pelo
6 tubular. Por exemplo, o íon superóxido promove um aumento na sensibilidade
7 vascular renal sobre a angiotensina II, o que levará, no final de uma cadeia de
8 reações à resistência vascular, condição para o desenvolvimento da hipertensão.
9 Quanto a ação tubular, EROs podem promover o aumento da expressão do
10 transportador de cloreto de sódio e potássio, levando a um aumento na reabsorção
11 de água e sódio (MATHIS et al., 2012). Em um estudo publicado em 2014, Lozovoy
12 et. al. mostraram que pacientes com LES ativo tem maior probabilidade de
13 desenvolver hipertensão que aqueles indivíduos controle e com LES inativo. Isso se
14 deve a uma série de fatores, incluindo o estresse oxidativo, que é importante na
15 fisiopatologia da hipertensão em pacientes com LES ativo sem
16 comprometimentorenal(LOZOVOY et al., 2014).

17 Outra área amplamente estudada é a de doenças cardiovasculares (DCV).
18 Vários estudos têm mostrado que os pacientes com LES têm de 9 a 50 vezes mais
19 chances de desenvolver DCV do que indivíduos controle. Tais chances aumentam
20 graças aos fatores de risco tradicionais e deficiências nos mecanismos inflamatórios
21 e imunológicos (WESTERWEEL et. al., 2007). Além disso, pessoas com LES tem
22 um risco de cinco a oito vezes maior de evoluir para infarto do miocárdio do que a
23 população em geral e mais de um terço dos pacientes com LES mostram evidências
24 de calcificações arteriais coronarianas e placas carótidas. Aterosclerose prematura
25 tem sido considerada comorbidade em paciente com LES (FRIERI; STAMPFL,
26 2016).

27 Kiani et. al. publicaram em 2015 um estudo avaliando a extensão da
28 calcificação da artéria coronária (CAC) em pacientes com LES comparado com um
29 grupo controle. A prevalência da CAC em pacientes com LES foi significativamente
30 maior do que no grupo controle. A principal diferença estatisticamente significativa
31 foi encontrada nos pacientes com 45-54 anos, mas a diferença entre os pacientes
32 entre 55 e 64 anos também foi significativa. Os pacientes foram controlados por
33 idade, etnia, grau de formação, renda, diabetes, hipertensão, níveis de HDL e índice

1 de massa corpórea (IMC). A prevalência continuou maior quando os fatores de risco
2 cardiovasculares tradicionais foram ajustados.

3 Os fatores de risco cardíaco também são prevalentes nos pacientes com LES.
4 Tais fatores são: hiperlipidemia, diabetes mellitus, fumo, obesidade, hipertensão, e
5 vida sedentária. Contudo, estudo tem mostrado outros fatores de risco,
6 independentemente dos tradicionais, e específicos para os pacientes com LES. A
7 inflamação sistêmica, autoanticorpos contra o endotélio, HDL e fosfolípidios,
8 imunocomplexos circulantes, produtos do sistema complemento ativados, nefrite e
9 dislipidemia podem ser associados ao risco cardíaco. Somam-se a isso efeitos
10 adversos do tratamento, principalmente com corticosteroides e ciclofosfamida, e
11 vasculopatia que acompanha a atividade da doença, como o estado de
12 hipercoagulabilidade da síndrome antifosfolípide secundária (CHOGLE;
13 CHAKRAVARTY, 2007)

14 A aterosclerose pode ser considerada uma doença imunológica, pois as
15 lesões e placas ateroscleróticas são repletas de células do sistema imune,
16 principalmente monócitos e leucócitos que fagocitaram partículas de LDL e formam
17 as células espumosas (HANSSON, 2001). De fato, os sistemas imunes inato e
18 adaptativo estão envolvidos no processo da formação da placa de ateroma,
19 principalmente na formação das estrias de gordura iniciais, quando o endotélio
20 vascular está ativado e expressa quimiocinas e moléculas de adesão, recrutando
21 linfócitos e monócitos e subsequente infiltração no subendotélio (TEGUI; MALLAT,
22 2006).

23

24 **1.9 HOMOCISTEÍNA E LES**

25

26 A homocisteína é um pequeno aminoácido sulfidrílico que atua
27 fisiologicamente no metabolismo de seu aminoácido precursor, a metionina, e
28 também da biossíntese da cisteína (BYDLOWSKI; MAGNANELLI; F, 1998). Em sua
29 reação de síntese, a metionina é ativada em S-adenosilmetionina. Após perder um
30 grupo metil, é formado a S-adenosilhomocisteína e, por fim, após hidrólise do S-
31 adenosil, é formada a homocisteína(LAI; KAN, 2015).A partir daí, a homocisteína

1 pode sofrer dois tipos de reações. A primeira é a remetilação, que é dependente da
2 enzima metionina sintase, folato e de Vitamina B12. A segunda é a transulfuração,
3 onde a homocisteína liga-se a serina para a formação de cistationa que,
4 posteriormente, dará origem ao antioxidante glutathiona (CAO et. al., 2009). Portanto,
5 fatores nutricionais envolvendo o *status* das vitaminas do complexo B e ácido fólico,
6 e fatores hereditários envolvidos na transcrição das enzimas envolvidas no
7 metabolismo da homocisteína estão envolvidos no desenvolvimento da
8 hiperhomocisteinemia (ANDREASSI et. al., 2003, CURRO et. al., 2014). Alguns
9 estudos vêm mostrando que deficiência nutricional de vitamina B12, B6 e folato,
10 após terapia de reposição com folato e vitamina B12, diminuem os níveis de
11 homocisteína (PATERSON et. al., 2006; SETOLA et.al., 2004; PANUZIO et. al.,
12 2003).

13 McCully, em 1969, propôs que a hiperhomocisteinemia é um fator de risco
14 cardiovascular independente (MCCULLY, 1969). A partir do início dos anos 90, a
15 homocisteína é considerada um fator de risco, devido a sua relação com doenças
16 vasculares e estados de hipercoagulabilidade (SHENOY et. al., 2014). Além disso,
17 níveis elevado de homocisteína no sangue têm sido correlacionados com doenças
18 cardiovasculares, derrames, estenose arterial periférica e trombose venosa(LAI;
19 KAN, 2015).

20 Nos pacientes com LES, diversos estudos vêm sendo conduzidos para avaliar
21 os níveis de homocisteína e suas ações. Eles têm associado a hiperhomocisteinemia
22 com DCV, aterotrombose, alta calcificação da artéria coronária a rigidez arterial
23 (VON FELDT et. al., 2006; KIANI et. al., 2012). Além disso, alguns autores têm
24 proposto que a hiperhomocisteinemia seja um fator de risco para a progressão da
25 aterosclerose (PERNA et. al., 2010; RUA-FIGUEIROA et. al., 2010). Sabio et. al.,
26 num estudo publicado em 2014, concluíram que os níveis séricos de homocisteína
27 são independentemente associados com o aumento da pressão arterial. Sugeriram
28 ainda que isto acontece pelos efeitos tóxicos da homocisteína nas células do
29 endotélio vascular e por sua capacidade de aumentar a rigidez vascular (SABIO et
30 al., 2014).

31 Vários estudos têm fornecido dados cada vez mais contundentes que a
32 hiperhomocisteinemia prejudica a dilatação vascular mediada pelo endotélio. Isso se

1 dá pela redução da biodisponibilidade de NO frente a estímulos vasodilatadores, tal
2 como a acetilcolina, o que leva a conclusão de que a homocisteína pode causar a
3 disfunção endotelial pela inibição da ação do NO (CHEN et. al., 1999). O
4 mecanismo pelo qual isso acontece não está bem elucidado. Apesar de existirem
5 teorias bastante esclarecedoras, não existem estudos que as comprovem (LAI; KAN,
6 2015).

7 A homocisteína sofre um processo de auto oxidação devido à presença de
8 grupos sulfidril (-SH) pela reação com grupos tióis livres, gerando radicais
9 superóxidos (MCDOWELL; LANG, 2000). Além disso, a homocisteína promove uma
10 regulação positiva na enzima Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Oxidase
11 (NADPH oxidase) das células endoteliais. Tal enzima também promove a formação
12 do radical superóxido (TYAGI, 2005). Estes radicais, embora sejam considerados
13 apenas fontes iniciais do estresse oxidativo gerado pela hiperhomocisteinemia,
14 reagem de forma importante com o aminoácido L-arginina, principal fonte de
15 nitrogênio para a e-NOS (JIN, 2007). Além disso, a falta deste aminoácido vai gerar
16 um efeito chamado de desacoplamento da e-NOS, que transforma tal enzima de
17 produtora de NO a produtora de EROs (FÖRSTERMANN; MÜNZEL, 2006). Outro
18 mecanismo importante também é a supressão da enzima Dimetilarginina-
19 Dimetilaminohidrolase (DDAH) e o acúmulo da enzima Dimetilarginina assimétrica
20 (ADMA), que age como um inibidor competitivo da e-NOS (BÖGER et. al., 2000).
21 Todos estes mecanismos vão levar a não produção de óxido nítrico, levando a uma
22 disfunção endotelial (LAI; KAN, 2015). A figura 3 esquematiza estes mecanismos.

23

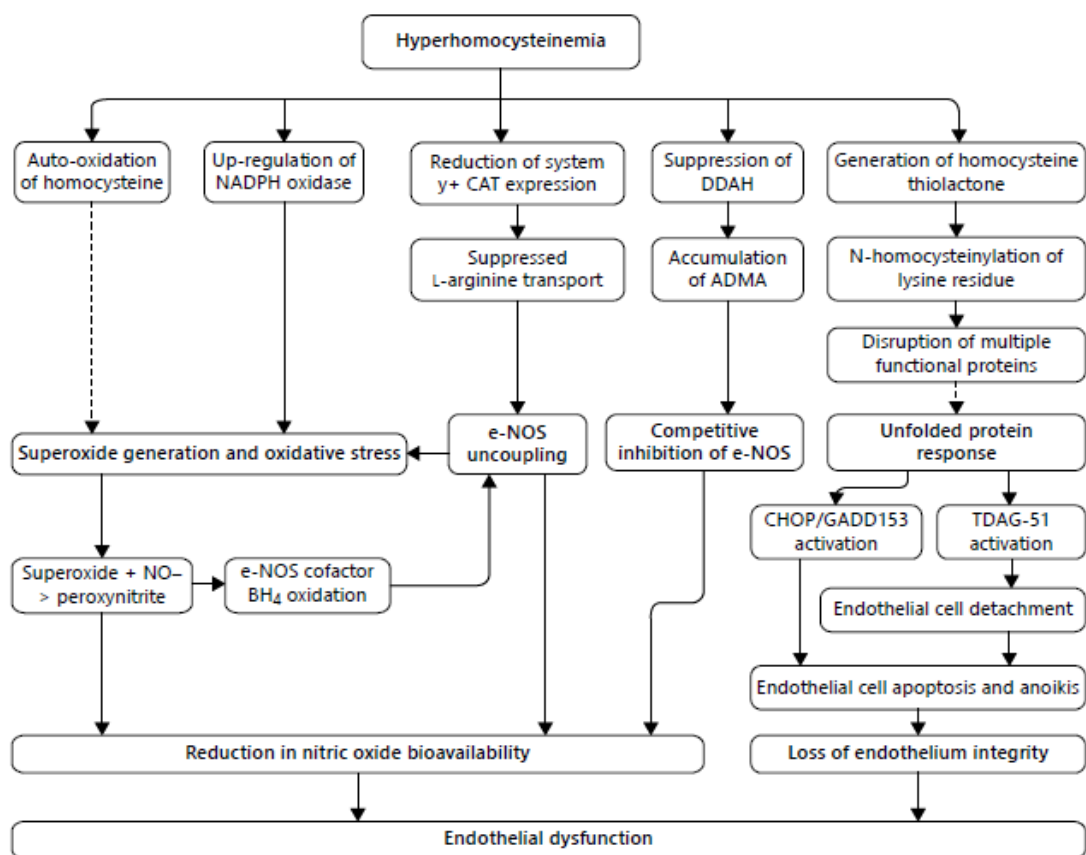
24 **1.10 DISFUNÇÃO ENDOTELIAL, MOLÉCULAS DE ADESÃO E LES**

25

26 O endotélio vascular é uma monocamada de células que revestem toda a
27 parede do lúmen dos vasos sanguíneos e conferem uma barreira física de proteção
28 contra agentes que possam causar danos e estejam presentes no sangue, como
29 mediadores inflamatórios, agentes infecciosos, entre outros (STANKEVICIUS et. al.,
30 2003). Além de ser esta barreira física, o endotélio vascular é responsável por
31 controlar o tônus vascular de acordo com mudanças fisiológicas, como alta

1 pressão por perfusão. Este controle é feito pela produção dos fatores relaxantes
 2 derivados do endotélio (EDRF). Hoje, sabemos que este fator é o NO (BAUER,
 3 SOTNIKOVA, 2010). A deficiência na produção e biodisponibilidade do NO é um dos
 4 primeiros passos da aterogênese, pois leva a uma redução da vasodilatação
 5 mediada pelo endotélio, o que é um grande fator de risco para
 6 eventos cardiovasculares (MAK; KOW, 2014)

7 **Figura 3** – Mecanismos potenciais da disfunção endotelial induzida por
 8 hiperhomocisteinemia



9 **Fonte:** (LAI; KAN, 2015) **Legenda:** NADPH: Nicotinamida Adenina
 10 Dinucleotídeo Fosfato-oxidase. / CAT: Transportador catiônico de
 11 aminoácidos / DDAH: Dimetilarginina-Dimetilaminohidrolase / ADMA:
 12 Dimetilarginina assimétrica / e-NOS: Óxido Nítrico Sintase endotelial

13

14 Disfunção endotelial pode ser definida como um desequilíbrio entre os fatores
 15 de vasodilatação e de vasoconstrição produzidos pelo endotélio vascular. Tal

1 disfunção geralmente é ocasionada por danos ao endotélio (LAI; KAN, 2015). No
2 LES, a principal causa do dano endotelial são os marcadores inflamatórios, sendo
3 que o Intérféron-1 executa papel importante no dano endotelial nos paciente com
4 LES. Além dele, citocinas pró-inflamatórias, citocinas co-estimulatórias, produtos de
5 peroxidação lipídica, estresse oxidativo e autoanticorpos podem causar dano
6 ao endotélio (MAK; KOW, 2014). O endotélio, exposto por um período prolongado ou
7 repetidas vezes a estes fatores, pode perder seu efeito protetor, tornando-se
8 disfuncional e perdendo sua integridade (WOYWODT et. al., 2002).

9 Uma ampla avaliação das funções do endotélio pode ser obtida através da
10 quantificação das moléculas de origem endotelial. A ativação endotelial leva a
11 expressão aumentada de citocinas inflamatórias e moléculas de adesão (RIDKER et.
12 al., 2004). As moléculas de adesão são proteínas transmembrana que atuam na
13 adesão dos leucócitos ao endotélio e sua migração aos locais de inflamação. Sua
14 expressão é regulada pelo Fator de Necrose Tumoral α (TNF- α). Estas moléculas
15 também são liberadas na circulação, por isso podem servir de marcadores da função
16 do endotélio (SKEOCK. et al., 2013).

17 Moléculas de Adesão Celular (CAM) é uma família de moléculas de adesão
18 que tem como representantes a Molécula de Adesão Intracelular (ICAM-1), a
19 Molécula de Adesão Vascular (VCAM-1) e a Molécula de Adesão de Células
20 Endoteliais e Plaquetas (PECAM-1). A ICAM-1 e a VCAM-1 não tem uma expressão
21 muito grande na superfície de células endoteliais. Porém, sob estímulo de citocinas
22 pró-inflamatórias como o TNF- α , Interleucina 1 (IL-1) e Intérféron γ (IFN- γ) são
23 rapidamente expressas e expostas (ELGERT, 2009). No LES, os resultados
24 encontrados são controversos. Alguns estudos mostram o ICAM-1 com uma
25 elevação estatisticamente significativa nos pacientes com LES em relação ao grupo
26 controle (ELWY; GALAL; HASAN, 2010). Outros estudos mostram que este aumento
27 se dá quando comparado doença ativa ou não (SARI et. al., 2002). Também no
28 estudo de Skeoch et. al., em 2013, a VCAM foi citada como marcador de nefrite não
29 invasivo (SKEOCH. et al., 2013). A PECAM-1 é produzida na superfície e junção de
30 células epiteliais, plaquetas e leucócitos (PARK; SORENSON; SHEIBANI, 2015).
31 São raros os estudos de PECAM-1 no LES.

1 Selectinas são moléculas de adesão transmembrana do tipo I que participam
2 da mediação da resposta inflamatória e da cascata de metástase do câncer. Durante
3 o processo de inflamação, elas têm a função de captura e rolamento dos leucócitos
4 do sangue para o endotélio vascular (EBEL et. al., 2015). A E-selectina é produzida
5 constitutivamente nas células endoteliais da pele e medula óssea. Por ação do TNF-
6 α , sua expressão pode acontecer nas vênulas pós capilares. Skeoch et. al., em
7 2013, publicou um estudo em que ele concluiu que a E-selectina pode atuar como
8 marcador de risco cardiovascular em pacientes com LES. A P-selectina é produzida
9 constitutivamente nos megacariócitos e posteriormente incorporada por células
10 endoteliais e plaquetas. São armazenadas nos grânulos α das plaquetas e nos
11 corpúsculos de Weibel-Palade nas células endoteliais. Sob estímulo da trombina ou
12 da histamina, a P-selectinase dirige à superfície celular (EBEL et. al., 2015).

13 A molécula Inibidora do Ativador de Plasminogênio (PAI-1) é um inibidor da
14 protease de serina, e vai inibir o ativador de plasminogênio nos tecidos. Também é
15 uma adipocitocina regulada no tecido adiposo. Ele pode estar elevado na síndrome
16 de Chushing ou durante tratamento com corticosteroides (TAMURA et. al., 2014).
17 Somer et. al., em 2005, publicaram um estudo que indicou que o PAI-1 estava
18 relacionado ao aumento da disfunção endotelial em pacientes com LES (SOMER et.
19 al., 2005).

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

1

2

3 2. JUSTIFICATIVA

4

5 Não há na literatura nenhum trabalho que relacione os níveis de
6 homocisteína, estresse oxidativo, e disfunção endotelial em pacientes com LES. Os
7 dados existentes são isolados e controversos. Por fim, inexistem na literatura
8 trabalhos que façam um painel de moléculas de adesão e as compare com
9 marcadores de estresse oxidativo e homocisteína.

1 **3. OBJETIVOS**

2

3 **3.1 OBJETIVO GERAL**

4

5 O objetivo do presente estudo foi avaliar se a hiperhomocisteinemia está
6 associada à atividade da doença, a disfunção endotelial e ao estresse oxidativo em
7 pacientes com LES.

8

9 **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

10 **3.2.1** Comparar os níveis séricos de homocisteína de pacientes com LES e
11 indivíduos normais.

12 **3.2.2** Verificarse os níveis séricos de homocisteína se associam à atividade da
13 doença.

14 **3.2.3** Verificarse os níveis séricos de homocisteína se associam à disfunção
15 endotelial, avaliada pelas moléculas de adesão.

16 **3.2.4.** Verificarse os níveis séricos de homocisteína se associam ao estresse
17 oxidativo.

18

19

20

21

22

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

O presente estudo, do tipo observacional caso/controle, incluiu 176 indivíduos; 50 indivíduos saudáveis (grupo controle) foram selecionados entre doadores de sangue do Hospital Universitário e 126 pacientes com LES foram selecionados no ambulatório de Reumatologia do Hospital Universitário de Londrina, Paraná, Brasil, para participar do estudo. LES foi diagnosticado diante de critérios revistos do CAR, 1997. O score SLEDAI foi utilizado para classificar o LES como ativo, sendo considerado LES ativo aqueles que obtiveram score SLEDAI ≥ 6 . Os pacientes com SLE também foram divididos em dois grupos: pacientes com homocisteína $< 10,59$ (n = 62) e homocisteína $\geq 10,59$ (n = 63).

Informações sobre os fatores de estilo de vida e história médica foram obtidos em avaliação clínica. A duração da doença, o envolvimento de órgãos, e terapia foi registrado para cada paciente. Prednisona foi o único tipo de corticosteroides que os pacientes estavam tomando no momento da inclusão; assim o cálculo de equivalentes de prednisona não foi necessário. Os pacientes fizeram uso da mesma dose de prednisona, pelo menos, nos últimos 4 meses. Nenhum dos indivíduos recebeu uma dieta específica. Os indivíduos de ambos os grupos não bebiam álcool regularmente. Nenhum dos participantes do estudo apresentou doenças cardiovasculares (exceto hipertensão arterial), tireoidianas, renais, hepáticas, gastrointestinais ou doenças oncológicas, e nenhum estava recebendo terapia de reposição hormonal ou suplementos antioxidantes. Este estudo foi realizado de acordo com as orientações estabelecidas na Declaração de Helsinque e o Comitê de Ética da Universidade de Londrina, Paraná, Brasil que aprovou todos os procedimentos envolvendo seres humanos do trabalho. O consentimento informado por escrito foi obtido de todos os indivíduos/pacientes (parecer CAAE 01865212.000005231).

4.2 MEDIÇÕES ANTROPOMÉTRICAS

1 O peso corporal foi medido com aproximação de 0,1 kg utilizando uma
2 balança eletrônica, com os indivíduos vestindo roupas leves, mas sem sapatos, na
3 parte da manhã. A altura foi medida com aproximação de 0,1 cm usando um
4 estadiômetro. O índice de massa corporal (IMC) foi calculado como o peso (kg)
5 dividido pela altura (m) ao quadrado.

6 **4.3 ANÁLISES BIOQUÍMICAS E IMUNOLÓGICAS**

7 O nível de homocisteína no soro foi determinado por imunoensaio de
8 micropartículas por quimiluminescência (Architect, Laboratório Abbott, Abbott Park,
9 IL, EUA). A categorização de hiperhomocisteinemia foi realizada utilizando a
10 mediana obtida para grupo LES (10,59 ng/mL). A PCR e os níveis de fatores do
11 complemento C3 e C4 foram medidos usando um ensaio turbidimétrico (*C8000*,
12 *ABBOTT, Architect Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA*). Anti-anticorpos de
13 cadeia dupla de DNA (anti-dsDNA) foi determinada por ensaio imunoenzimático
14 (ELISA), utilizando um imunoensaio comercial de ELISA (enzyme-linked INOVA
15 Diagnostic, San Diego, CA, EUA).

16

17 **4.4 MEDIDAS ESTRESSE OXIDATIVO**

18

19 Amostras de sangue periférico foram obtidas com EDTA como anticoagulante
20 e antioxidante para avaliar o estresse oxidativo. Todas as amostras foram
21 centrifugadas a 3000 rpm durante 15 minutos e alíquotas de plasma foram
22 armazenadas a -70°C até à utilização.

23

24 **4.4.1 QUIMIOLUMINESCÊNCIA (QL) INDUZIDA POR TERC-BUTIL- 25 HIDROPERÓXIDO (CL-LOOH)**

26

1 Os hidroperóxidos lipídicos no plasma foram avaliados por CL-LOOH como
2 descrito anteriormente por Flecha et.al., 1991. Este método é considerado como
3 sendo muito mais sensível e específico do que a medição de TBARS, o método
4 usual para determinar a oxidação lipídica. Os resultados foram expressos em
5 contagens por minuto (cpm).

6 **4.4.2 DETERMINAÇÃO DE PRODUTOS AVANÇADOS DE OXIDAÇÃO PROTEICA** 7 **(AOPP)**

8 AOPP foi determinada nas amostras de plasma, utilizando o método semi-
9 automatizado descrito por Witko-Sarsat et al., 1998. A AOPP resulta da oxidação de
10 resíduos de aminoácidos, tais como a tirosina, que conduz à formação de produtos
11 de proteína de reticulados contendo ditirosina detectado por espectrofotometria.
12 Concentrações de AOPP foram expressos em micro mols por litro (umol/L) de
13 equivalentes de cloramina-T.

14 **4.4.3 ÓXIDO NÍTRICO (NO)**

15 Os níveis séricos de NO foram avaliados através da concentração de nitrito
16 (NO₂-) e nitrato (NO₃-) de acordo com a reação de Griess, complementada pela
17 redução de nitrato em nitrito com cádmio (GUEVARA et. al., 1998; NAVARRO-
18 GONZALES et. al., 1998). Os resultados são expressos em µM.

19 **4.4.4 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL DO PLASMA**

20 O TRAP foi determinado conforme Reppeto et. al. [21]. Este método detecta
21 antioxidantes no plasma, sendo hidrossolúveis ou lipossolúveis e faz por inibição de
22 quimioluminescência induzido por 2, 2-azobis (2-amidinopropane). O Sistema foi
23 calibrado com um análogo da vitamina E, o TROLOX, e os valores de TRAP foram
24 expressos em equivalente µM Trolox/ UA mg/dL

25 **4.5 MOLÉCULAS DE ADESÃO**

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

1 4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

2 Os dados categóricos foram analisados com o teste de chi-quadrado e os
3 resultados foram demonstrados em números absolutos. Comparações entre grupos
4 foram feitos usando teste de Mann-Whitney. Os dados foram expressos com a
5 média (\pm DP). Os resultados das análises estatísticas univariadas foram usados para
6 delinear as variáveis explicativas importantes a serem usadas como determinantes
7 de associação independente com grupos de diagnósticos em análises de regressão
8 logística subsequente. A análise da regressão logística bivariada foi usada para
9 definir a associação significativa do LES com o controle, e homocisteína < 10.59 e
10 homocisteína \geq 10.59 usando os biomarcadores com $p < 0.10$. O p-valor usado para
11 significância estatística foi de 0.05. Todas as análises foram feitas com o programa
12 SPSS 20.0 (SPSS, Chicago, IL, USA).

13

14 5 RESULTADOS

15

16 Como resultado desta dissertação, foi submetido para publicação no periódico
17 *Immunology* (fator de impacto: 2.781) o artigo intitulado: "**Influence of**
18 **homocysteine levels on adhesion molecules and oxidative stress in patients**
19 **with Systemic Lupus Erythematosus**".

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

1 **5.1 ARTIGO**

2 **Influence of Homocysteine Levels on Adhesion Molecules and Oxidative Stress in**
3 **Patients with Systemic Lupus Erythematosus**

4

5 **Homocysteine, Adhesion Molecules and Oxidative Stress in Systemic Lupus**
6 **Erythematosus**

7

8 Renan G. Requena¹, Lorena F. R. F. Santos¹, *Nicole P. Stadtlober*², *Tamires Flauzino*¹, Bruna
9 M. Scavuzzi¹, Poliana M. Guimarães¹, Ligia G. C. Dall'Aqua², Marcell A. B. Lozovoy³, Neide
10 T. Costa², Tathiana V. M. Iriyoda⁴, Edna M. V. Reiche³, Andréa N. C. Simão³, Isaias Dichi⁵.

- 11 1. Post Graduate Program in Health Sciences – University of Londrina, Brazil.
12 2. Post Graduate Program in Experimental Pathology – University of Londrina, Brazil.
13 3. Department of Pathology, Clinical Analysis and Toxicology – University of Londrina,
14 Brazil.
15 4. Department of Rheumatology – University of Londrina, Brazil.
16 5. Department of Internal Medicine – University of Londrina, Brazil.

17

18 * Corresponding author: Isaias Dichi, MD, PhD,

19

20 Postal address: Department of Internal Medicine –Rua Robert Koch, n 60.University of
21 Londrina, Londrina, Paraná, Brazil. Zip code: 86038-440. Tel.: +55-43-3371-2234; Fax: +55-
22 43-3371-2332.

23 E-mail address: dichi@sercomtel.com.br

24

Word count: 3604; Figures: 01; Tables: 5

1

2

3 **ABSTRACT**

4 **Background:** Increased homocysteine levels, adhesion molecules and oxidative stress are
5 considered important mechanisms contributing to the complex pathophysiological network
6 that characterizes systemic lupus erythematosus (SLE). The aim of this study was to verify if
7 homocysteine levels could influence the results obtained in the oxidative stress and in cell
8 adhesion molecules in patients with SLE. **Material:** The study included 176 subjects; 50
9 healthy individuals (control group) and 126 patients with SLE. Homocysteine levels, oxidative
10 stress measurements, adhesion molecules and plasminogen activator inhibitor were
11 determined. Hyperhomocysteinemia was categorized using the median of SLE patients
12 **Results:** Patients with increased homocysteine levels (≥ 10.59) presented higher
13 hydroperoxides ($p = 0.015$), AOPP ($p = 0.022$), NOx ($p = 0.011$), PECAM-1 ($p = 0.037$), VCAM
14 ($p = 0.026$), E-Selectin ($p = 0.017$), P-Selectin ($p = 0.047$), and lower TRAP values ($p = 0.015$)
15 than patients with lower homocysteine levels (< 10.59). In a binary logistic regression that
16 included the markers and parameters with statistical relevance between the groups with
17 homocysteine < 10.59 , as a reference group, and homocysteine ≥ 10.59 , TRAP (OR= 95% CI:
18 0.976; $p = 0.006$) was found as inversely associated, whereas hydroperoxides (OR= 95% CI:
19 1.000; $p = 0.012$), NOx (OR= 95% CI: 1.122; $p = 0.027$), and PECAM-1 (OR= 95% CI: 1.000;
20 $p = 0.004$) were found to be directly associated. **Conclusions:** The behavior of some adhesion
21 molecules and oxidative stress markers depends in a large scale of homocysteine levels. The
22 data obtained in the present study allow suggesting that special efforts may be directed to
23 decrease homocysteine levels in SLE.

24

1 **Keywords: Systemic lupus erythematosus, homocysteine, adhesion molecules, oxidative**
2 **stress.**

3

4 **INTRODUCTION**

5 Systemic lupus erythematosus (SLE) is an autoimmune syndrome characterized by
6 autoantibodies production, especially against nuclear components (1). It follows a relapsing-
7 remitting disease course, and the risk of flares varies between patients. Although it is
8 believed that the etiology of SLE is multifactorial, it has been suggested that the increased
9 production of reactive oxygen and nitrogen species (ROS and RNS, respectively), adhesion
10 molecules and homocysteine levels may have deleterious effects in the disease, especially in
11 endothelial dysfunction (2–4).

12 Increased oxidative damage and decreased antioxidant capacity in SLE patients have
13 been reported by several research groups (5–7). ROS can attack all cellular biomolecules,
14 including deoxyribonucleic acid (DNA), ribonucleic acid (RNA), lipids and proteins. Post-
15 translational oxidative modifications of self-antigen may lead to the generation or
16 unmasking of epitopes, resulting in the triggering of an autoimmune response (8).
17 Furthermore, the role of ROS/RNS in the deregulation of apoptosis and the delay in
18 clearance of apoptotic cells may generate neo-epitopes that subsequently stimulate broad
19 spectrum of autoantibodies formation, leading to inflammation and organ damage in SLE (9).

20 Cell adhesion molecules (CAMs) enable leukocyte adhesion and rolling along
21 endothelial cells surfaces and control migration of leukocytes into inflamed tissues. With the
22 aid of chemokines and chemoattractants, these molecules facilitate leucocyte-endothelial
23 cell interactions and the transmigration of inflammatory cells to sites of inflammation

1 thereby acting as markers of endothelial activation and dysfunction (10). In SLE, elevated
2 adhesion molecules levels have been associated with disease activity (11) and its clinical
3 feature, including cutaneous manifestations (12), neurological disorders (13) and lupus
4 nephritis (LN) (14–16). Aberrations in cell adhesive interactions in SLE, are often
5 accompanied by vascular changes and cellular infiltration of tissues (17). Multifactorial
6 components are involved in the elevation of local expression as well as in levels of serum
7 soluble adhesion molecules, however, chronic inflammation and endothelial dysfunction are
8 key components(3).

9 Elevated homocysteine levels are also thought to be a risk factor for cardiovascular
10 diseases (CVD) (18). A meta-analysis of prospective cohort studies demonstrated that after
11 accounting for known CVD risk, a 25% lower homocysteine level was associated with about
12 an 11% lower risk of ischemic heart disease and about a 19% lower risk of stroke (19).
13 Homocysteine is a metabolite in methionine production, and plays a direct role in the
14 pathogenesis of SLE through its toxic effects on the endothelium (4). Homocysteine is also
15 prothrombotic(20) and decreases the availability of nitric oxide (21). The thiolactone
16 metabolite of homocysteine combines with LDL to enhance foam cell formation in vessel
17 walls (22). The molecule releases free oxygen radicals that can damage tissue (23), and has
18 several prothrombotic actions on platelets and endothelial cells (24). In SLE, high plasma
19 homocysteine concentrations are associated with a high risk of CVD (25,26) and
20 thrombolysis (27), and correlate independently with lupus disease duration and increased
21 coronary artery calcification (28). In addition, a study has demonstrated that the most
22 significant predictors of plaque progression in SLE were age, pro inflammatory
23 (dysfunctional) HDL, high leptin values, high soluble TNF-like weak inducer of apoptosis

1 (sTWEAK) and homocysteine > 12 (29).

2 Although several works were developed on these three important pathophysiological
3 mechanisms in SLE, we are not aware of any study investigating these components and their
4 associations. We hypothesized that homocysteine levels could influence the results obtained
5 with oxidative stress and adhesion molecules. Therefore, the aim of the present study was to
6 analyze the association between oxidative stress, adhesion molecules and homocysteine
7 levels in SLE. These associations could increase our understanding of physiopathology and
8 could identify new therapeutic targets in SLE.

9 **SUBJECTS AND METHODS**

10 The study included one hundred and seventy-six subjects. Fifty healthy individuals
11 (control group) were selected among blood donors of the University Hospital and one
12 hundred and twenty-six patients with SLE were selected from among the ambulatory of
13 Rheumatology of the University Hospital of Londrina, Paraná, Brazil, to participate in the
14 study. SLE was diagnosed using the American College of Rheumatology (ACR) 1997 revised
15 criteria and the disease activity was determined using SLEDAI score (30)

16 Information on lifestyle factors and medical history were obtained at clinical
17 evaluation. Disease duration, organ involvement, and therapy were recorded for each
18 patient. Prednisone was the only kind of corticosteroids the patients were taking at the
19 time of inclusion; thus, prednisone-equivalent calculation was not required. They had been
20 taking the same prednisone dose at least for the past 4 months. None of the subjects was
21 receiving a specific diet. The individuals of both groups did not drink alcohol regularly.
22 None of the participants in the study presented heart, thyroid, renal, hepatic,
23 gastrointestinal, oncological or other autoimmune disease, and none were receiving
24 estrogen replacement therapy or antioxidant supplements.

1

2 **Ethical approval**

3 The research has been complied with all the relevant national regulations,
4 institutional policies and in accordance the tenets of the Helsinki Declaration, and has
5 been approved by the Ethical Committee of the University of Londrina (Paraná, Brazil)
6 (CAAE 01865212.0.0000.5231, CEP/UEL 205.328). Written informed consent was obtained
7 from all subjects/patients.

8

9 **Anthropometric measurements**

10 Body weight was measured in the morning, using electronic scales to the nearest 0.1
11 kg, with patients wearing light clothing and no shoes; height was measured to the nearest 0.1
12 cm by using a stadiometer. Body mass index (BMI) was calculated as weight (kg) divided by
13 height (m) squared. The waist circumference was measured with a soft tape in the region
14 between the last rib and the iliac crest, always in the standing position. Blood pressure
15 $\geq 130/90$ mmHg or use of antihypertensive medications were the considered criteria to define
16 hypertension (31).

17

18 **Biochemical and Immunological Biomarkers**

19 Serum homocysteine level was determined by chemiluminescence microparticle
20 immunoassay (Architect, Abbott Laboratory, Abbott Park, IL, USA). The categorization of
21 hyperhomocysteinemia was realized using the median obtained for the SLE group (10.59
22 ng/mL). Serum C-reactive protein (CRP) and complement factors C3 and C4 levels were
23 measured using a turbidimetric assay (C8000, ABBOTT, Architect Abbott Laboratories,

1 Abbott Park, IL, USA). Anti-double-stranded DNA (anti-dsDNA) antibodies were determined
2 by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using a commercial immunoassay ELISA
3 (INOVA Diagnostic, San Diego, CA, USA).

4

5 **Oxidative Stress Measurements**

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

9

10

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

12 Lipid hydroperoxides in plasma were evaluated by CL-LOOH as described previously
13 (32). This method is considered more sensitive and specific than the TBARS measurement,
14 the usual method to determine lipid oxidation. The results were expressed in counts per
15 minute (cpm).

16

17 **Determination of Advanced Oxidation Protein Products (AOPP)**

18 AOPP was determined in the plasma samples using a semi-automated method (35).
19 AOPP results from oxidation of amino acid residues such as tyrosine, leading to the
20 formation of dityrosine-containing protein cross-linking products detected by

1 espectrophotometry. AOPP concentrations were expressed as micromoles per liter ($\mu\text{mol/L}$)
2 of chloramines-T equivalents.

3

4 **Nitric Oxide (NO)**

5 Serum NO metabolite (NO_x levels were assessed by nitrite (NO_2^-) and nitrate
6 (NO_3^-) concentration according to the Griess reaction, supplemented by the reduction
7 of nitrate to nitrite with cadmium. The results are expressed in μM (34).

8

9 **Total radical-antioxidant parameter (TRAP)**

10 TRAP was determined as reported previously (35). This method detects hydrosoluble
11 and/or liposoluble plasma antioxidants by measuring the chemiluminescence inhibition time
12 induced by 2,2-azobis (2-amidinopropane). The system was calibrated with the vitamin E
13 analog TROLOX, and the values of TRAP were expressed in equivalent of $\mu\text{MTrolox/UA}$
14 mg/dL .

15

16

17 **Adhesion Molecules and Plasminogen Activator Inhibitor (PAI)**

18 Levels of platelet endothelial cell adhesion molecule 1 (PECAM-1), vascular cell
19 adhesion molecule 1 (VCAM-1), intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1),
20 endothelial-selectin (E-selectin), platelet-selectin (P-selectin) and plasminogen
21 activator inhibitor type-1 (PAI-1) were determined by Human Magnetic Adhesion 6-

1 Plex Panel (Novex Life Technologies, Frederick, United States of America) for Luminex®
2 platform. The results were expressed by ng/mL.

3 **Statistical analysis**

4 Categorical data were analyzed with chi-square test and results were demonstrated
5 by absolute number. Comparisons between groups were made using Mann-Whitney test.
6 Data were expressed as the media (\pm SE). The results of these univariate statistical analyses
7 were used to delineate the significant explanatory variables to be used as determinants of
8 independent association with diagnostic groups in subsequent logistic regression analyses.
9 Bivariate logistic regression analysis was used to define the significant association of SLE
10 versus controls (reference group), and Homo <10.59 (reference group)and HOMO ≥ 10.59
11 using the biomarkers with $p < 0.10$. All tests were 2-tailed and a p-value of 0.05 was used for
12 statistical significance. All analyses were conducted with SPSS 20.0 software (SPSS, Chicago,
13 IL, USA).

14

15 **RESULTS**

16 Table 1 shows the clinical characteristics of the patients with SLE and the control
17 group. There was no statistical difference between these groups with regard to sex and age.
18 However, patients with SLE had higher BMI ($p < 0.0001$) and the relationship between
19 Caucasian and not Caucasian was lower when compared with the control group. Regarding
20 oxidative stress, even when adjusted for ethnicity and BMI, patients with SLE presented
21 higher ($p < 0.0001$) AOPP and lower NOx and TRAP values, whereas hydroperoxides did not
22 show statistical difference ($p = 0.782$). In relation to adhesion molecules, PECAM-1, VCAM, E-

1 selectin, P-selectin and PAI showed higher ($p < 0.0001$) values in patients with SLE compared
2 with the control group. The exception was ICAM, which did not present statistical difference
3 ($p = 0.319$). SLE patients had higher ($p = 0.003$) CRP values than the control group. When p
4 was adjusted for ethnicity and age, all the parameters maintained the same results, except
5 for CRP that showed no statistical difference ($p = 0.112$).

6 In table 2, a binary logistic regression with the parameters that presented statistical
7 relevance in table 1 demonstrated that NOx (OR= 95% CI: 0.934; $p = 0.003$) was inversely
8 associated, whereas PECAM-1 (OR= 95% CI: 1.000; $p = 0.004$) and PAI (OR= 95% CI: 1.000; $p =$
9 0.043) were directly associated with SLE independently of BMI (OR= 95% CI: 1.304; $p =$
10 0.027) and ethnicity (OR= 95% CI: 0.080; $p = 0.031$).

11 Figure 1 shows a scatterplot of homocysteine levels in patients with SLE and controls.
12 The median of homocysteine in the SLE group was higher than in the control group. Hence,
13 we categorized hyperhomocysteinemia using the median of SLE patients to improve the
14 understanding on the association between homocysteine and other parameters.

15 Table 3 shows the categorization of hyperhomocysteinemia performed using the
16 median obtained for the SLE group (10.59 ng/mL). SLE patients with homocysteine levels
17 ≥ 10.59 had a higher age ($p = 0.025$), SLEDAI ($p = 0.017$) and lower C3 levels ($p = 0.020$) when
18 compared with patients with homocysteine levels < 10.59 . However, sex ($p = 0.690$), ethnicity
19 ($p = 1.000$), BMI ($p = 0.925$), SLEDAI ≥ 6 ($p = 0.377$), Anti- dsDNA ($p = 0.985$) and C4 levels ($p =$
20 0.557), as well as the use of antimalarials ($p = 0.143$), mycophenolate ($p = 0.878$), prednisone
21 ($p = 0.237$) and other immunosuppressive therapies ($p = 0.796$) were not significantly
22 different between the groups.

1 The comparison of the oxidative stress parameters and the endothelial dysfunction
2 markers in patients with SLE classified according to homocysteine levels are shown in Table
3 4. Patients with increased homocysteine levels presented higher hydroperoxides ($p = 0.015$),
4 AOPP ($p = 0.022$), NOx ($p = 0.011$), PECAM-1 ($p = 0.037$), VCAM ($p = 0.026$), E-Selectin ($p =$
5 0.017), P-Selectin ($p = 0.047$) and CRP ($p = 0.038$) levels, and lower TRAP values ($p = 0.015$)
6 when compared with other group. In contrast, only ICAM ($p = 0.813$) and PAI ($p = 0.864$)
7 were not statistically different. When the p value was adjusted for age, only P-selectin lost
8 its significance, whereas the other parameters maintained the same significance.

9 In a binary logistic regression that includes the markers and parameters with
10 statistical relevance between the groups with homocysteine <10.59 , as a reference group,
11 and homocysteine ≥ 10.59 , shown in table 3 and 4, C3 (OR= 95% CI: 0,918; $p =0.003$) and
12 TRAP (OR= 95% CI: 0.976; $p =0.006$) were found as inversely associated, whereas
13 hydroperoxides (OR= 95% CI: 1.000; $p=0.012$), NOx (OR= 95% CI: 1.122; $p =0.027$), PECAM-1
14 (OR= 95% CI: 1.000; $p=0.004$) and CRP (OR= 95% CI: 1.502; $p =0.002$) were found as directly
15 associated (Table 5).

16

17 **DISCUSSION**

18 The main findings of the present study were that adhesion molecules and oxidative
19 stress were more associated with SLE and plasma homocysteine levels than when SLE was
20 analyzed independently of homocysteine levels. This was specifically verified by a positive
21 association with hydroxyperoxides, NOx, PECAM-1 and CRP levels and an inverse association
22 with C3 levels and TRAP when the patients with SLE were categorized by homocysteine

1 levels. Of note, NOx changed from reduced levels in SLE patients when compared to controls
2 to a positive association when SLE and homocysteine levels were considered.

3 SLE patients with higher homocysteine levels had a higher age, SLEDAI and lower C3
4 levels when compared with patients with lower homocysteine levels. However, binary
5 logistic regression did not show association of homocysteine levels with SLEDAI and C3.
6 Homocysteine concentrations are generally elevated in several autoimmune diseases,
7 including SLE (36). In several studies, elevated levels of homocysteine have correlated with
8 atherosclerosis in SLE (26–28,37). Pathogenic deficiencies resulting in deficiency of vitamin
9 B12 and folate, co-factors in homocysteine metabolism, have been proposed as possible
10 pathways. The persistent inflammatory activation may result in increased vitamin
11 consumption via increased DNA synthesis in immune cells. Moreover, vitamin deficiency
12 may result from decreased gastrointestinal absorption as well as interference with folate
13 metabolism related to medications, such as methotrexate (36). The data of the present
14 study allow suggesting that increased vitamin consumption due to permanent inflammatory
15 status was the most likely cause of elevated homocysteine levels. None of the patients used
16 methotrexate or any medication which could inhibit folate or vitamin B12 metabolism and
17 there was no evidence, at least clinically, of decreased gastrointestinal absorption.

18 As expected, several adhesion molecules and oxidative stress markers in patients with
19 SLE showed higher levels than in the healthy control group. Regarding adhesion molecules,
20 SLE was associated with higher PECAM-1, VCAM-1, E-Selectin, P-Selectin, and PAI-1 levels.
21 Previous studies have reported an up-regulation of VCAM-1 and P-Selectin(38,39), E-
22 Selectin(38,40), and PAI-1 (41) in SLE. However, when binary logistic regression was
23 performed, only PECAM-1 and PAI maintained their positive association. As far as we know,

1 there are no studies on PECAM-1 in SLE. PECAM-1 actively mediates leukocyte
2 transendothelial migration and may mobilize to the luminal surface, thus creating an
3 adhesive haptotactic gradient that guides luminal leukocytes to the junctions (42,43). The
4 pro-inflammatory activity of PECAM-1 mainly occurs at the final stage of leukocyte
5 recruitment, favoring endothelial junction dilation and promoting leukocyte migration
6 mediated by chemokines, which lead the leukocytes through integrin activation to the
7 inflammatory sites (43). Miller et al. (2003) consider PECAM-1 an essential molecule for
8 leukocyte migration through vascular endothelium via intercellular junctions (42). In the
9 meantime, PAI-1 is considered an obesity biochemical marker (44), and as our SLE patients
10 had higher BMI than controls, we may suggest that this finding was probably related to
11 increased adiposity in the patients.

12 Some studies have verified the positive association of homocysteine and adhesion
13 molecules in type 1 (45) diabetes as well as in non-diabetic and type 2 diabetes (46). These
14 studies reported an association between homocysteine and VCAM-1 and ICAM-1. In SLE,
15 some few studies evaluated this association (47,48). Raslam and Rasmy verified a positive
16 association between homocysteine and P-selectin and reinforced the statement suggested by
17 Ross (1999) that endothelial cell dysfunction can result from various sources of injury
18 including shear stress, immune complexes and other toxins such as homocysteine, all of
19 which are relevant in SLE (49). Such injury results in the up regulation of adhesion molecules
20 on the endothelial surface, increased permeability and subsequent trapping of inflammatory
21 cells at the site of activation, factors commonly seen in SLE which may contribute to
22 endothelial injury and recruitment of inflammatory cells. In the present study, although
23 relationship between homocysteine and P-selectin was not found, the other adhesion molecule

1 related to platelet, PECAM-1 was associated, suggesting that PECAM-1 may be a mechanism
2 by which hyperhomocysteinemia causes an increased thrombotic risk in patients with SLE.

3 In relation to oxidative stress, SLE was associated with higher protein oxidation and
4 lower Nox and TRAP. However, when binary logistic regression was performed, only NOx
5 maintained its inverse association. It has been demonstrated that increased oxidative stress are
6 involved in nucleic acid alterations leading to the formation of autoantibodies (8). Increased
7 endogenous nitric oxide (NO) synthesis has been reported in SLE, with implication in T-
8 lymphocyte dysfunction (50). Oxidative stress and proinflammatory cytokines may stimulate
9 NO production by an increase in inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression (51).
10 Nevertheless, analysis of the concentration of nitric oxide metabolites (NOx) in patients with
11 SLE has shown contradictory results; some authors have not found any alteration (52,53),
12 whereas others reported increased production (54,55). Although this increased NO production
13 induced by redox imbalance, our group has shown in many inflammatory chronic diseases
14 that an increased consumption of NO by oxidative stress can occur, resulting in decreased
15 NOx bioavailability(56–58). Besides regulation of vascular tone, NO also contributes to anti-
16 inflammatory and antithrombotic properties at the endothelial level. As for the antithrombotic
17 effect of NO, the activity of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) has been shown to be a
18 critical regulator which suppress platelet activation and aggregation (59). Of note, the
19 PECAM-1 and NOx showed to be related in all scenarios of the present study, independently
20 of homocysteine levels.

21 The direct association between homocysteine and oxidative stress has been reported in
22 different conditions, such as in atherosclerosis, hypertension, type 2 diabetes mellitus and
23 metabolic syndrome (60,61). Tyagi et al. (2005) showed in cardiac microvascular endothelial
24 cells that homocysteine induces oxidative stress by increasing inducible nitric oxide synthase
25 (iNOS) and decreasing endothelial nitric oxide synthase (eNOS) (62). In addition,

1 homocysteine inhibits dimethylargininedimethylaminohydrolase (DDAH), which is
2 responsible for degrading asymmetric dimethylarginine (ADMA); the latter inhibits eNOS and
3 compete with L-arginine for NO production (60). Thus, endothelial dysfunction is an
4 important mechanism mediating increased oxidative stress caused by increased homocysteine
5 levels. Although there are some studies which analyzed concomitantly homocysteine and
6 oxidative stress in lupus nephritis (63,64), this association has not been studied in SLE or in
7 lupus nephritis as of yet. Our finding of the paradoxical behavior of NOx depending on
8 considering or not homocysteine levels is difficult to explain. Nevertheless, one possibility is
9 that disease activity as shown by higher SLEDAI found in patients with higher homocysteine
10 levels may have influenced the results.

11 Some limitations must be considered in the present study. First, several studies have
12 shown that sex, age and ethnicity influence oxidative stress and thus may be considered
13 important confounding factors; however, these aforementioned factors were controlled in
14 this study. Second, another possible factor, which could interfere with NOx analysis, would
15 be the increase in BMI. It was previously shown that serum NOx levels are inversely
16 correlated with BMI and waist circumference (65). However, our data show that changes in
17 NOx levels were independently associated with BMI. Similarly, also adhesion molecules (66)
18 and oxidative stress markers (67) could be influenced by BMI if adjustment is not performed.
19 Nevertheless, the present study also has several strengths. First, although the cross-sectional
20 design does not allow casual inferences, we assessed many original associations, which may
21 be taken in consideration as possible therapeutic targets. Second, we rigorously tried to
22 assure that the patients did not take any drug or present any disease that could interfere
23 with the results. Therefore, patients with renal impairment, B12 insufficiency,

1 hypothyroidism, in hemolysis or using drugs, such as phenytoin, isoniazid, methotrexate and
2 L-dopa (67) were excluded from the study to avoid interference with homocysteine results.

3 In conclusion, homocysteine, adhesion molecules and oxidative stress are important
4 mechanisms contributing to the complex pathophysiological network that characterizes SLE.
5 The behavior of some adhesion molecules and oxidative stress markers depends in a large
6 scale of homocysteine levels. The data obtained in the present study allow suggesting that
7 special efforts may be directed to decrease homocysteine levels in SLE. More studies are
8 warranted to analyze the risk-benefit ratio that antiplatelet medication and antioxidants
9 could have in patients with SLE.

10

11 **REFERENCES**

- 12 1. Shah D, Mahajan N, Sah S, Nath SK, Paudyal B. Oxidative stress and its biomarkers in
13 systemic lupus erythematosus. *J Biomed Sci.* 2014;21(1).
- 14 2. Oates JC. The biology of reactive intermediates in systemic lupus erythematosus.
15 *Autoimmunity.* 2010 Feb;43(1):56–63.
- 16 3. Prasad M, Hermann J, Gabriel SE, Weyand CM, Mulvagh S, Mankad R, et al.
17 *Cardiorheumatology: cardiac involvement in systemic rheumatic disease. Nat Rev*
18 *Cardiol.* 2015;12(3):168–76.
- 19 4. Wall RT, Harlan JM, Harker LA, Striker GE. Homocysteine-induced endothelial cell
20 injury in vitro: A model for the study of vascular injury. *Thromb Res.* 1980;18(1-
21 2):113–21.
- 22 5. Nuttall SL, Heaton S, Piper MK, Martin U, Gordon C. Cardiovascular risk in systemic

- 1 lupus erythematosus - Evidence of increased oxidative stress and dyslipidaemia.
2 Rheumatology. 2003;42(6):758–62.
- 3 6. Morgan PE, Sturgess AD, Davies MJ. Evidence for chronically elevated serum protein
4 oxidation in systemic lupus erythematosus patients. Free Radic Res. 2009;43(2):117–
5 27.
- 6 7. Lozovoy MAB, SIMÃO ANC, Panis C, ROTTER MAC, Reiche EM V, MORimoto HK, et al.
7 Oxidative stress is associated with liver damage, inflammatory status, and
8 corticosteroid therapy in patients with systemic lupus erythematosus. Lupus.
9 2011;20(12):1250–9.
- 10 8. Ohmori H, Kanayama N. Immunogenicity of an inflammation-associated product,
11 tyrosine nitrated self-proteins. Autoimmun Rev. 2005;4(4):224–9.
- 12 9. Shah D, Sah S, Wanchu A, Wu MX, Bhatnagar A. Altered redox state and apoptosis in
13 the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. Immunobiology. 2013;218(4):620–
14 7.
- 15 10. Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: The
16 multistep paradigm. Cell. 1994;76(2):301–14.
- 17 11. Lewis M, Vyse S, Shields A, Zou L, Khamashta M, Gordon P, et al. Improved monitoring
18 of clinical response in Systemic Lupus Erythematosus by longitudinal trend in soluble
19 vascular cell adhesion molecule-1. Arthritis Res Ther. 2016;18(5):1–11.
- 20 12. Hejazi EZ, Werth VP. Cutaneous Lupus Erythematosus: An Update on Pathogenesis,
21 Diagnosis and Treatment. Am J Clin Dermatol. 2016;17(2):135–46.
- 22 13. Mikdashi JA. Altered functional neuronal activity in neuropsychiatric lupus: A

- 1 systematic review of the fMRI investigations. *Semin Arthritis Rheum.* 2016;45(4):455–
2 62.
- 3 14. Lalwani P, De Souza GKBB, De Lima DSN, Passos LFS, Boechat AL, Lima ES. Serum thiols
4 as a biomarker of disease activity in lupus nephritis. *PLoS One.* 2015;10(3).
- 5 15. Soliman S, Mohan C. *Lupus Nephritis Biomarkers.* Clin Immunol. Elsevier B.V.; 2016;
- 6 16. Skeoch S, Haque S, Pemberton P, Bruce I. Cellular adhesion molecules as potential
7 biomarkers of nephritis, damage and accelerated atherosclerosis in patients with
8 systemic lupus erythematosus. *Rheumatol (United Kingdom).* 2013;52:134.
- 9 17. Hirata T, Usui T, Kobayashi S, Mimori T. A novel splice variant of human L-selectin
10 encodes a soluble molecule that is elevated in serum of patients with rheumatic
11 diseases. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015;462(4):371–7.
- 12 18. Selhub J. The Many Facets of Hyperhomocysteinemia: Studies from the Framingham
13 Cohorts. *J Nutr.* 2006;1726–30.
- 14 19. Homocysteine Studies Collaboration. Homocysteine and risk of ischemic heart disease
15 and stroke: a meta-analysis. *JAMA.* 2002;288(16):2015–22.
- 16 20. Hajjar KA. Homocysteine-induced modulation of tissue plasminogen activator binding
17 to its endothelial cell membrane receptor. *J Clin Invest.* 1993;91(6):2873–9.
- 18 21. Upchurch GR, Welche GN, Fabian AJ, Freedman JE, Johnson JL, Keaney JF, et al.
19 Homocyst(e)ine decreases bioavailable nitric oxide by a mechanism involving
20 glutathione peroxidase. *J Biol Chem.* 1997;272(27):17012–7.
- 21 22. McCully K. Homocysteine and vascular disease. *Nat Med.* 1996;2(4):386–9.

- 1 23. Stamler JS, Osborne JA, Jaraki O, Rabbani LE, Mullins M, Singel D, et al. Adverse
2 vascular effects of homocysteine are modulated by endothelium-derived relaxing
3 factor and related oxides of nitrogen. *J Clin Invest.* 1993;91(1):308–18.
- 4 24. Woo KS, Chook P, Lolin YI, Cheung ASP, Chan LT, Sun YY, et al.
5 Hyperhomocyst(e)inemia Is a Risk Factor for Arterial Endothelial Dysfunction in
6 Humans. *Circulation.* 1997;96(8):2542–4.
- 7 25. Petri M, Roubenoff R, Dallal GE, Nadeau MR, Selhub J, Rosenberg IH. Plasma
8 homocysteine as a risk factor for atherothrombotic events in systemic lupus
9 erythematosus. *Lancet.* 1996;348(9035):1120–4.
- 10 26. Svenungsson E, Jensen-Urstad K, Heimbürger M, Silveira A, Hamsten A, de Faire U, et
11 al. Risk Factors for Cardiovascular Disease in Systemic Lupus Erythematosus.
12 *Circulation.* 2001;104(16):1887–93.
- 13 27. Refai TMK, Al-Salem IH, Nkansa-Dwamena D, Al-Salem MH. Hyperhomocysteinaemia
14 and risk of thrombosis in systemic lupus erythematosus patients. *Clin Rheumatol.*
15 2002;21(6):457–61.
- 16 28. Von Feldt JM, Scalzi L V., Cucchiara AJ, Morthala S, Kealey C, Flagg SD, et al.
17 Homocysteine levels and disease duration independently correlate with coronary
18 artery calcification in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.*
19 2006;54(7):2220–7.
- 20 29. McMahon M, Sahakian L, Grossman J, Skaggs B, Fitzgerald J, Charles-Schoeman C, et
21 al. High score on PREDICTS is associated with 10-fold increased odds for the
22 progression of subclinical atherosclerosis in SLE. *Arthritis Res Ther.* 2012;14(Suppl

- 1 3):A50.
- 2 30. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for
3 the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1997;40(9):1725.
- 4 31. James PA, Oparil S, Carter BL, Cushman WC, Dennison-Himmelfarb C, Handler J, et al.
5 2014 evidence-based guideline for the management of high blood pressure in adults:
6 report from the panel members appointed to the Eighth Joint National Committee
7 (JNC 8). *JAMA.* 2014;311(5):507–20.
- 8 32. Gonzalez Flecha B, Llesuy S, Boveris A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence:
9 An assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. *Free Radic Biol*
10 *Med.* 1991;10(2):93–100.
- 11 33. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Nguyen KT, Capeillere-Blandin C, Nguyen AT,
12 Canteloup S, et al. Advanced oxidation protein products as novel mediators of
13 inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. *J Immunol.*
14 1998;161(5):2524–32.
- 15 34. Navarro-González JA, García-Benayas C, Arenas J. Semiautomated measurement of
16 nitrate in biological fluids. *Clin Chem.* 1998;44(3):679–81.
- 17 35. Repetto M, Reides C, Gomez Carretero ML, Costa M, Griemberg G, Llesuy S. Oxidative
18 stress in blood of HIV infected patients. *Clin Chim Acta.* 1996;255(2):107–17.
- 19 36. Lazzerini PE, Capecchi PL, Selvi E, Lorenzini S, Bisogno S, Galeazzi M, et al.
20 Hyperhomocysteinemia : a cardiovascular risk factor in autoimmune diseases ? *Lupus.*
21 2007;852–62.
- 22 37. Petri M. Detection of coronary artery disease and the role of traditional risk factors in

- 1 the Hopkins Lupus Cohort. *Lupus*. 2000;9(3):170–5.
- 2 38. Blankenberg S, Barbaux S, Tiret L. Adhesion molecules and atherosclerosis.
3 *Atherosclerosis*. 2003;170(2):191–203.
- 4 39. Wu T, Xie C, Wang HW, Zhou XJ, Schwartz N, Calixto S, et al. Elevated urinary VCAM-1,
5 P-selectin, soluble TNF receptor-1, and CXC chemokine ligand 16 in multiple murine
6 lupus strains and human lupus nephritis. *J Immunol*. 2007;179(10):7166–75.
- 7 40. Egerer K, Feist E, Rohr U, Pruss A, Burmester GR, Dörner T. Increased serum soluble
8 CD14, ICAM-1 and E-selectin correlate with disease activity and prognosis in systemic
9 lupus erythematosus. *Lupus*. 2000;9(8):614–21.
- 10 41. Somers EC, Marder W, Kaplan MJ, Brook RD, McCune WJ. Plasminogen activator
11 inhibitor-1 is associated with impaired endothelial function in women with systemic
12 lupus erythematosus. *Ann N Y Acad Sci*. 2005;1051:271–80.
- 13 42. Muller WA. Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and
14 the inflammatory response. *Trends Immunol*. 2003;24(6):326–33.
- 15 43. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the
16 leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(September
17 2007):678–89.
- 18 44. Alessi MC, Juhan-Vague I. Metabolic syndrome, haemostasis and thrombosis. *Thromb
19 Haemost*. 2008;99(6):995–1000.
- 20 45. Targher G, Zenari L, Bertolini L, Falezza G, Muggeo M, Zoppini G. Plasma total
21 homocysteine levels are associated with von Willebrand factor, soluble intercellular
22 adhesion molecule-1, and soluble tumor necrosis factor-alpha receptors in young type

- 1 1 diabetic patients without clinical evidence of macrovascular complicat. *Diabetes*
2 *Care.* 2001;24(8):1496–7.
- 3 46. Becker A, Van Hinsbergh VW, Kostense PJ, Jager A, Dekker JM, Nijpels G, et al. Serum
4 homocysteine is weakly associated with von Willebrand factor and soluble vascular
5 cell adhesion molecule 1, but not with C-reactive protein in type 2 diabetic and non-
6 diabetic subjects - The Hoorn Study. *Eur J Clin Invest.* 2000;30(9):763–70.
- 7 47. Spencer CGC, Martin SC, Felmeden DC, Blann AD, Beevers GD, Lip GYH. Relationship of
8 homocysteine to markers of platelet and endothelial activation in “high risk”
9 hypertensives: A substudy of the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial. *Int J*
10 *Cardiol.* 2004;94(2-3):293–300.
- 11 48. Raslam H, Rasmy H. Soluble P-selection in Systemic Lupus Erythematosus. *J Med Sci.*
12 2006;6(3):463–7.
- 13 49. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999 Jan;340(2):115–
14 26.
- 15 50. Nagy G, Koncz A, Talarico T, Fernandez D, Ersek B, Buzas E, et al. Central role of nitric
16 oxide in the pathogenesis of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus.
17 *Arthritis Res Ther.* 2010;12(3):210.
- 18 51. Levesque M, Weinberg J. The Dichotomous Role of Nitric Oxide in the Pathogenesis of
19 Accelerated Atherosclerosis Associated with Systemic Lupus Erythematosus. *Curr Mol*
20 *Med.* 2004;4(7):777–86.
- 21 52. Wigand R, Meyer J, Busse R, Hecker M. Increased serum NG-hydroxy-L-arginine in
22 patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus as an index of an

- 1 increased nitric oxide synthase activity. *Ann Rheum Dis.* 1997;56(5):330–2.
- 2 53. Gonzalez-Crespo MR, Navarro J a, Arenas J, Martin-Mola E, De La Cruz J, Gomez-Reino
3 JJ. Prospective study of serum and urinary nitrate levels in patients with systemic
4 lupus erythematosus. *Br J Rheumatol.* 1998;37(9):972–7.
- 5 54. Belmont HM, Levartovsky D, Goel A, Amin A, Giorno R, Rediske J, et al. Increased nitric
6 oxide production accompanied by the up-regulation of inducible nitric oxide synthase
7 in vascular endothelium from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis
8 Rheum.* 1997;40(10):1810–6.
- 9 55. Wanchu A, Khullar M, Sud K, Sakhuja V, Thennarasu K, Sud A, et al. Serum and urine
10 nitrite and citrulline levels among patients with systemic lupus erythematosus: a
11 possible addition to activity parameters? *J Clin Rheumatol.* 2001;7(1):10–5; discussion
12 15.
- 13 56. Oliveira SR, Kallaur AP, Simão ANC, Morimoto HK, Lopes J, Panis C, et al. Oxidative
14 stress in multiple sclerosis patients in clinical remission: Association with the
15 expanded disability status scale. *J Neurol Sci.* 2012;321(1-2):49–53.
- 16 57. Lozovoy MAB, SIMÃO ANC, Iryioda TM V, Panis C, Reiche EM V, Morimoto HK, et al.
17 Hypertension is associated with serologically active disease in patients with systemic
18 lupus erythematosus: role of increased Th1/Th2 ratio and oxidative stress. *Scand J
19 Rheumatol.* 2014;43:59–62.
- 20 58. Simão ANC, Lozovoy MAB, Simão TNC, Venturini D, Barbosa DS, Dichi JB, et al.
21 Immunological and biochemical parameters of patients with metabolic syndrome and
22 the participation of oxidative and nitroactive stress. *Brazilian J Med Biol Res.*

- 1 2011;44(7):707–12.
- 2 59. Mak A, Kow NY. Imbalance between endothelial damage and repair: A gateway to
3 cardiovascular disease in systemic lupus erythematosus. *Biomed Res Int.* 2014;2014.
- 4 60. Hayden MR, Tyagi SC. Homocysteine and reactive oxygen species in metabolic
5 syndrome, type 2 diabetes mellitus, and atheroscleropathy: The pleiotropic effects of
6 folate supplementation. *Nutr J.* 2004;3(figure 1):4.
- 7 61. Dominguez LJ, Galioto A, Pineo A, Ferlisi A, Ciaccio M, Putignano E, et al. Age,
8 homocysteine, and oxidative stress: relation to hypertension and type 2 diabetes
9 mellitus. *J Am Coll Nutr.* 2010;29(1):1–6.
- 10 62. Tyagi N, Sedoris KC, Steed M, Ovechkin A V, Moshal KS, Tyagi SC, et al. Mechanisms of
11 homocysteine-induced oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*
12 2005;289(6):H2649–56.
- 13 63. Moroni G, Novembrino C, Quaglini S, De Giuseppe R, Gallelli B, Uva V, et al. Oxidative
14 stress and homocysteine metabolism in patients with lupus nephritis. *Lupus.*
15 2010;19(1):65–72.
- 16 64. Dwivedi J, Sarkar PD. Study of homocysteine, lipoprotein (a), lipid profile with
17 oxidative stress in nephrotic syndrome and lupus nephritis. *Res J Pharm Biol Chem Sci.*
18 2010;1(3):670–9.
- 19 65. Lin LY, Lee WJ, Shen HN, Yang WS, Pai NH, Su TC, et al. Nitric oxide production is
20 paradoxically decreased after weight reduction surgery in morbid obesity patients.
21 *Atherosclerosis.* 2006;190(0021-9150 (Print)):436–42.
- 22 66. Adamska A, Karczewska-Kupczewska M, Nikołajuk A, Otziomek E, Górská M, Kowalska

1 I, et al. Relationships of serum soluble E-selectin concentration with insulin sensitivity
2 and metabolic flexibility in lean and obese women. *Endocrine*. 2014;45(3):422–9.

3 67. Simão A, Lovozoy M, Dichi I. Oxidative stress in overweight and obesity. In: *Role of*
4 *Oxidative Stress in Chronic Diseases*. 2014. p. 121–36.

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

1 **Table 1: Clinical, oxidative stress and adhesion molecules parameters in patients with**
 2 **Systemic Erythematosus Lupus (SLE) and healthy controls**

Parameters	Control (n = 50)	SLE (n = 126)	p	P adjust *
Sex (F/M)	48/2	120/6	0.827	---
Ethnicity (C/NC)	46/4	77/49	<0.0001	---
Age (years)	39.16 (1.05)	39.91 (1.21)	0.640	
BMI (kg/m ²)	24.25 (0.45)	27.55 (0.57)	<0.0001	
Hydro (cpm)	19574 (3728)	20582 (1839)	0.782	0.436
AOPP (μmol/L)	131.05 (6.45)	188.02 (7.68)	<0.0001	<0.0001
NOx (μM)	42.83 (3.86)	19.68 (1.14)	<0.0001	<0.0001
TRAP (μM Trolox/ UA mg/dL)	182.83 (7.93)	135.93 (3.88)	<0.0001	<0.0001
PECAM-1 (ng/mL)	24.44 (0.84)	39.95 (0.99)	<0.0001	<0.0001
ICAM (ng/mL)	640.62 (157.24)	895.19 (146.31)	0.319	0.506
VCAM (ng/mL)	635.19 (29.81)	958.91 (35.70)	<0.0001	<0.0001
E-Selectin (ng/mL)	96.11 (6.12)	197.49 (10.04)	<0.0001	<0.0001
P-Selectin (ng/mL)	87.70 (8.22)	165.11 (6.67)	<0.0001	<0.0001
PAI (ng/mL)	44.91 (6.30)	119.74 (9.74)	<0.0001	<0.0001
CRP (mg/dL)	2.64 (0.49)	6.34 (1.11)	0.003	0.112

3 Chi-square. Data given as absolute number. *t*Test to independent samples. Data given as mean
 4 (±SE).

5 F/M: Female/male; C/NC: Caucasian/not Caucasian; BMI: Body mass index; Hydro:
 6 Hydroperoxides; AOPP: Advanced oxidation protein products; NOx: Nitric oxide
 7 metabolites; TRAP: Total radical antioxidant parameter; PECAM-1: Platelet Endothelial Cell
 8 Adhesion Molecule; ICAM: Induced Cell Adhesion Molecule; VCAM: Vascular cell
 9 adhesion molecule; PAI: Plasminogen activator inhibitor; CRP: C- reactive protein

10 *p adjusted for ethnicity and BMI.

1 **Table 2: Binary logistic regression between SLE and healthy controls (as the reference**
 2 **group) and endothelial dysfunction markers and oxidative stress parameters**

Parameters	B	Wald	Df	P	OR	95%CI
BMI (kg/m ²)	0.266	4.883	1	0.027	1.304	1.030-1.651
Ethnicity (C/NC)	-2.523	4.669	1	0.031	0.080	0.008-0.791
AOPP (μmol/L)	0.010	2.340	1	0.126	1.010	0.997-1.023
NOx (μM)	-0.068	8.821	1	0.003	0.934	0.893-0.977
TRAP (μM Trolox/ UA mg/dL)	-0.018	1.659	1	0.198	0.982	0.955-1.009
PECAM-1 (ng/mL)	0.000	8.159	1	0.004	1.000	1.000-1.001
VCAM (ng/mL)	0.000	0.250	1	0.617	1.000	1.000-1.000
E-Selectin (ng/mL)	0.000	1.685	1	0.194	1.000	1.000-1.000
P-Selectin (ng/mL)	0.000	0.580	1	0.809	1.000	1.000-1.000
PAI (ng/mL)	0.000	4.078	1	0.043	1.000	1.000-1.000
Homo (μmol/L)	0.110	0.139	1	0.431	1.116	0.850-1.465

3 BMI: Body mass index; AOPP: Advanced oxidation protein products; NOx: Nitric oxide
 4 metabolites; TRAP: Total radical antioxidant parameter; PECAM-1: Platelet endothelial cell
 5 adhesion molecule; ICAM: Induced cell adhesion molecule; VCAM: Vascular cell adhesion
 6 molecule; PAI: Plasminogen activator inhibitor; Homo: Homocysteine.

7

8

9

10

11

1 **Table 3: Anthropometric, clinic and laboratory data of patients with SLE classified by**
 2 **the homocysteine levels**

Parameters	HOMO<10.59 n = 62	HOMO ≥10.59n = 63	p	P adjusted
Sex (F/M)	59/3	60/3	0.690	---
Ethnicity (C/NC)	38/25	39/24	1.000	---
Age (years)	37.24 (1.63)	42.66 (1.76)	0.025	---
BMI (kg/m ²)	27.90 (0.72)	27.80 (0.78)	0.925	---
SLEDAI	3.55 (0.40)	5.30 (0.66)	0.017	---
SLEDAI ≥6	48/44	24/39	0.377	---
Antimalarials (Y/N)	52/11	44/19	0.143	---
Mycofenolate (Y/N)	16/46	16/47	0.878	---
Prednisone (Y/N)	55/7	61/2	0.158	---
Prednisone (mg/day)	9.46 (1.36)	11.83 (1.48)	0.237	---
Other Immunosuppressive Therapies (Y/N)	28/34	26/37	0.796	---
Homocysteine (μmol/L)	8.13 (0.24)	13.60 (0.40)	<0.0001	---
Anti-dsDNA	56.70 (9.97)	55.14 (8.45)	0.905	0.985
C3 (mg/dL)	116.90 (3.10)	105.70 (3.60)	0.020	0.013
C4 (mg/dL)	21.58 (1.28)	20.37 (1.60)	0.557	0.597

3 Chi-Square. Data given as absolute number. tTest for independent samples. Data given as
 4 mean (± SE).

5 F/M: Female/male; C/N: Caucasian/not Caucasian; BMI: Body mass index; SLEDAI:
 6 Systemic lupus erythematosus disease activity index; HOMO: Homocysteine; Anti-dsDNA:
 7 Antibody anti-double-stranded Deoxyribonucleic Acid; C3: Complement C3; C4:
 8 Complement C4

9 * p adjusted by age

1 **Table 4: Oxidative stress parameters and endothelial dysfunction markers in patients**
 2 **with SLE classified by homocysteine level.**

Parameters	HOMO <10.59)	HOMO ≥ 10.59	P	P adjusted *
	n = 62	n = 63		
Hydro (cpm)	18110 (1122)	24430 (2282)	0.015	0.033
AOPP (μmol/L)	170.00 (9.52)	203.70 (11.03)	0.022	0.034
NOx (μM)	16.35 (0.94)	21.51 (1.75)	0.011	0.031
TRAP (μM Trolox/ UA mg/dL)	145.80 (6.48)	127.10 (4.07)	0.015	0.042
PECAM (ng/mL)	38.04 (1.18)	42.26 (1.52)	0.037	0.080
ICAM (ng/mL)	937.00 (223.20)	867.40 (191.50)	0.813	0.892
VCAM (ng/mL)	875.70 (43.30)	1035.00 (55.95)	0.026	0.094
E-Selectin (ng/mL)	170.30 (11.45)	211.70 (12.75)	0.017	0.034
P-Selectin (ng/mL)	150.90 (8.01)	175.70 (9.41)	0.047	0.108
PAI (ng/mL)	121.60 (14.60)	118.20 (13.20)	0.864	0.965
CRP (mg/dL)	3.84 (0.48)	8.51 (2.17)	0.038	0.054

3 Chi-square.Data given as absolute number. tTest to independent samples. Data given as mean
 4 (±SE)

5 Hydro: Hydroperoxides; AOPP: Advanced oxidation protein products; NOx: Nitric oxide
 6 metabolites; TRAP: Total radical antioxidant parameter; PECAM: Platelet endothelial cell
 7 adhesion molecule; ICAM: Induced cell adhesion molecule; VCAM: Vascular cell adhesion
 8 molecule; PAI: Plasminogen activator Inhibitor; CRP: C-reactive protein.

9 *p adjusted by age

10

11

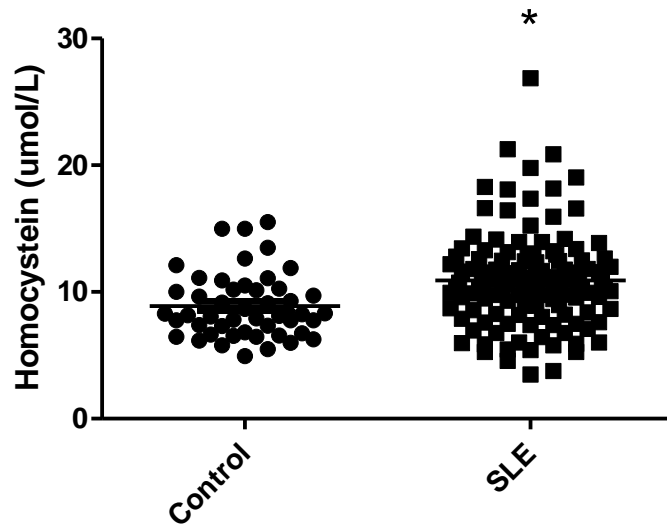
1 **Table 5: Binary logistic regression between patients with SLE (and**
 2 **hyperhomocysteinemia ≥ 10.59 as the reference group) and oxidative stress parameters**
 3 **and endothelial dysfunction markers.**

Parameter	B	Wald	Df	p	OR	CI
Age	0.007	0.068	1	0.794	1.007	0.955 – 1.062
SLEDAI	0.018	0.025	1	0.875	1.019	0.809 – 1.282
C3 (mg/dL)	-0.086	7.924	1	0.005	0.918	0.865 – 0.974
Hydro (cpm)	0.000	6.286	1	0.012	1.000	1.000 – 1.000
AOPP($\mu\text{mol/L}$)	0.008	1.975	1	0.160	1.008	0.997 – 1.020
NOx (μM)	0.115	4.895	1	0.027	1.122	1.013 – 1.242
TRAP ($\mu\text{M Trolox/ UA mg/dL}$)	-0.033	7.695	1	0.006	0.976	0.945 – 0.990
PECAM (ng/mL)	0.000	8.211	1	0.004	1.000	1.000 – 1.000
VCAM (ng/mL)	0.000	1.981	1	0.159	1.000	1.000 – 1.000
E-Selectin (ng/mL)	0.000	0.572	1	0.450	1.000	1.000 – 1.000
CRP (mg/dL)	0.407	9.750	1	0.002	1.502	1.164 – 1.940

4

5 SLEDAI: Systemic lupus erythematosus disease activity index; Hydro: Hydroperoxides;
 6 AOPP: Advanced oxidation protein products; NOx: Nitric oxide metabolite; TRAP: Total
 7 radical antioxidant parameter; PECAM: Platelet endothelial cell adhesion molecule; VCAM:
 8 Vascular cell adhesion molecule; CRP: C-reactive protein.

9



1

2 Figure 1: Homocystein levels in systemic lupus erythematosus and healthy individuals

3 (control group). * $p = 0.0002$. Data were adjusted for ethnicity and BMI.

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

1 **6 CONCLUSÃO**

2 Os resultados obtidos neste estudo nos permitem concluir que:

- 3 • Pacientes com LES possuem um nível de homocisteína maior do que o grupo
4 controle.
- 5 • Pacientes com LES com níveis elevados de homocisteína apresentam
6 SLEDAI maior que pacientes com níveis reduzidos de homocisteína.
- 7 • Níveis de homocisteína elevados estão associados à disfunção endotelial,
8 demonstrado pelos maiores valores de algumas moléculas de adesão.
- 9 • Níveis de homocisteína elevados estão associados ao estresse oxidativo,.

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados deste estudo foram importantes para auxiliar a compreensão do complexo mecanismo fisiopatológico que envolve o LES e o desenvolvimento de DCV. Estudos adicionais são necessários, porém caminhos foram apontados por este trabalho.

Vários trabalhos na literatura indicavam uma hiperhomocisteinemia no grupo LES quando comparado com um controle saudável. Este estudo demonstrou, além disto, associações importantes entre esta hiperhomocisteinemia, estresse oxidativo e disfunção endotelial. Portanto, mostrou-se importante o controle do nível de homocisteína nos pacientes com LES.

Foi feito o estudo de um painel de moléculas de adesão nos pacientes com LES e no grupo controle, bem como quando classificamos os pacientes com LES de acordo com os níveis de homocisteína. Este painel permitiu a observação da associação independente de PECAM-1 e PAI com o LES, dados que não foram encontrados na literatura. Portanto, estudos que justifiquem e ratifiquem tal associação são necessários.

Além disso, mostrou-se que a hiperhomocisteinemia está associada à disfunção endotelial e ao estresse oxidativo. Portanto, o controle dos níveis de homocisteína nos pacientes com LES é importante para monitorar o desenvolvimento de DCV. E, caso estes níveis estejam elevados, esforços precisam ser tomados com objetivo de controlá-lo.

Por fim, os resultados sugerem a importância no controle nutricional e de qualidade de vida dos pacientes com LES, visto que tais fatores podem ajudar a manter normais os níveis de homocisteína. Ressalta-se também a importância do desenvolvimento de estudos que analisem a relação risco-benefício de terapias com anti agregação plaquetária e/ou antioxidantes.

1 8 REFERÊNCIAS

2

3 AHSAN, H.; ALI, A.; ALI, R. Oxygen free radicals and systemic autoimmunity.

4 **Clinical and Experimental Immunology**, v. 131, n. 3, p. 398–404, 2003.

5 AL-HERZ, Adeeba et al. Cardiovascular risk factor screening in systemic lupus

6 erythematosus. **The Journal of Rheumatology**, v. 30, n. 3, p. 493-496, 2003.

7 ALVES, J. D.; AMES, P.R.J. Atherosclerosis, oxidative stress and auto-antibodies in

8 systemic lupus erythematosus and primary antiphospholipid

9 syndrome. **Immunobiology**, v. 207, n. 1, p. 23-28, 2003.

10 ALZOLIBANI, A. A. et al. 4-Hydroxy-2-nonenal modified histone-H2A: A possible

11 antigenic stimulus for systemic lupus erythematosus autoantibodies. **Cellular**

12 **Immunology**, v. 284, n. 1-2, p. 154–162, 2013.

13 ANDREASSI, Maria et al. Methylenetetrahydrofolate reductase gene C677T

14 polymorphism, homocysteine, vitamin B12, and DNA damage in coronary artery

15 disease. **Human genetics**, v. 112, n. 2, p. 171-177, 2003.

16 ARTICLE, S. Guidelines for immunologic laboratory testing in the rheumatic

17 diseases: an introduction. **Arthritis and Rheumatism**, v. 47, n. 4, p. 429–33, 2002.

18 BAUER, V.; SOTNÍKOVÁ, R. Nitric oxide- the endothelium-derived relaxing factor

19 and its role in endothelial functions. **Gen Physiol Biophys**, v. 29, n. 4, p. 319-340,

20 2010.

21 BEN MANSOUR, R. et al. Enhanced reactivity to malondialdehyde-modified proteins

22 by systemic lupus erythematosus autoantibodies. **Scandinavian Journal of**

23 **Rheumatology**, 2010.

24 BERTSIAS, G. K. et al. Diagnostic criteria for systemic lupus erythematosus: has the

25 time come? **Nature Reviews. Rheumatology**, v. 9, n. 11, p. 687–94, 2013.

26 BIJL, M. Endothelial activation, endothelial dysfunction and premature

27 atherosclerosis in systemic autoimmune diseases. **Netherlands Journal of**

28 **Medicine**, v. 61, n. 9, p. 273-277, 2003.

29 BÖGER, R. H. et. al. An endogenous inhibitor of nitric oxide synthase regulates

- 1 endothelial adhesiveness for monocytes. **Journal of the American College of**
2 **Cardiology**, v. 36, n. 7, p. 2287-2295, 2000.
- 3 BROWN, K. A. et al. Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis.
4 **Lancet**, v. 368, n. 9530, p. 157–169, 2006.
- 5 BUDMAN, D. R.; STEINBERG, A. D. Hypertension and renal disease in systemic
6 lupus erythematosus. **Archives of Internal Medicine**, v. 136, n. 9, p. 1003-1007,
7 1976
- 8 BURTON, G. J.; JAUNIAUX, E. Oxidative stress. **Research Clinical**
9 **Obstretic&Gyaecology**, v. 25, n. 3, p. 287–299, 2011.
- 10 BYDLOWSKI, S. P.; MAGNANELLI, A. C.; CHAMONE, D. A. F.; Hiper-
11 Homocisteinemia e Doenças Vaso-Oclusivas. **Arquivos brasileiros de cardiologia**,
12 v. 71, n. n^o 1, p. 69–76, 1998.
- 13 CAO, Y. G. et al. Beneficial effects of danshensu, an active component of *Salvia*
14 *miltiorrhiza*, on homocysteine metabolism via the trans-sulphuration pathway in
15 rats. **British journal of pharmacology**, v. 157, n. 3, p. 482-490, 2009.
- 16 CASTRO, C.; GOURLEY, M. Diagnostic testing and interpretation of tests for
17 autoimmunity. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, n. 2 SUPPL. 2,
18 p. S238–S247, 2010.
- 19 CHEN, P. et al. Homocysteine metabolism in cardiovascular cells and tissues:
20 implications for hyperhomocysteinemia and cardiovascular disease. **Advances in**
21 **Enzyme Regulation**, v. 39, n. 1, p. 93-109, 1999.
- 22 CHOGLE, A R.; CHAKRAVARTY, A. Cardiovascular events in systemic lupus
23 erythematosus and rheumatoid arthritis : emerging concepts, early diagnosis and
24 management. **The Journal of the Association of Physicians of India**, v. 55, p. 32–
25 40, 2007.
- 26 COLEMAN, Thomas G. et al. The role of the kidney in essential
27 hypertension. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 2, n.
28 6, p. 571-581, 1975.
- 29 CURRO, M. et al. Toxic effects of mildly elevated homocysteine concentrations in
30 neuronal-like cells. **Neurochemical research**, v. 39, n. 8, p. 1485-1495, 2014.

- 1 DALLE-DONNE, I. et al. Biomarkers of oxidative damage in human disease. **Clinical**
2 **Chemistry**, v. 52, n. 4, p. 601–623, 2006.
- 3 DASGUPTA, S. Therapeutic interventions of tissue specific autoimmune onset in
4 systemic lupus erythematosus. **Mini reviews in medical chemistry**, 2016.
- 5 D´CRUZ, D. P.; KHAMASHTA, M. A.; HUGHES, G. R. Systemic lupus
6 erythematosus. **Lancet**, v.369 n.9561, p.587-596, 2007.
- 7 DEL RIO, D.; STEWART, A. J.; PELLEGRINI, N. A review of recent studies on
8 malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress.
9 **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 15, n. 4, p. 316-328, 2005.
- 10 DELLAVANCE, A.; LESER, P. G.; ANDRADE, L. E. C. Análise crítica do teste de
11 anticorpos antinúcleo (FAN) na prática clínica. **Revista Brasileira de Reumatologia**,
12 v. 47, n. 4, p. 265–275, 2007.
- 13 DIEKER, J. W. C.; VAN DER VLAG, J.; BERDEN, J. M. H. , **Nephrology Dialysis**
14 **Transplantation**, v. 19, n. 2, p. 282-285, 2004.
- 15 DUARTE C, COUTO M, INES L, LIANG M.H. Epidemiology of systemic lupus
16 erythematosus. **Systemic lupus erythematosus. 5th ed. London: Elsevier**, p. 673-
17 96, 2011
- 18 EBEL, Mark E. et al. Diverse Inflammatory Cytokines Induce Selectin Ligand
19 Expression on Murine CD4 T Cells via p38 α MAPK. **The Journal of Immunology**, v.
20 194, n. 12, p. 5781-5788, 2015.
- 21 ELGERT, K. D. Immunology: understanding the immune system. **John Wiley &**
22 **Sons**, 2009.
- 23 ELWY, M. A.; GALAL, Z. A.; HASAN, H. E. Immunoinflammatory markers and
24 disease activity in systemic lupus erythematosus: something old, something
25 new/Marqueurs immuno-inflammatoires-anciens et nouveaux-et évolutivité du lupus
26 érythémateux disséminé. **Eastern Mediterranean Health Journal**, v. 16, n. 8, p.
27 893, 2010.
- 28 FLECHA, B.G; LLESUY, S.; BOVERIS, A. Hydroperoxide-initiated
29 chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and
30 muscle. **Free Rad Biol Med**, 10:93–100, 1991.

- 1 FÖRSTERMANN, U.; MÜNZEL, T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular
2 disease from marvel to menace. **Circulation**, v. 114, n. 13, p. 1708-1714, 2006.
- 3 FRIERI, M.; STAMPFL, H. Systemic lupus erythematosus and atherosclerosis:
4 review of the literature. **Autoimmunity Reviews**, v. 15, n. 1, p. 16-21, 2016.
- 5 GEHRKE, N. et al. Oxidative damage of dna confers resistance to cytosolic nuclease
6 trex1 degradation and potentiates STING-dependent immune sensing. **Immunity**, v.
7 39, n. 3, p. 482–495, 2013.
- 8 GUEVARA, I. et al. Determination of nitrite/nitrate in human biological material by the
9 simple griess reaction. **Clin Chim Acta**, 274: 177-188,1998.
- 10
- 11 GUNNETT, C. A; HEISTAD, D. D.; FARACI, F. M. Gene-targeted mice reveal a
12 critical role for inducible nitric oxide synthase in vascular dysfunction during diabetes.
13 **Stroke; A Journal of Cerebral Circulation**, v. 34, n. 12, p. 2970–2974, 2003.
- 14 HALL, J. E. et al. Role of sympathetic nervous system and neuropeptides in obesity
15 hypertension. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 6, p.
16 605-618, 2000.
- 17 HANASAND, M. et al. Improved detection of advanced oxidation protein products in
18 plasma. **Clinica Chimica Acta**, v. 413, n. 9-10, p. 901–906, 2012.
- 19 HANSSON, G. K. Immune mechanisms in atherosclerosis. **Arteriosclerosis,**
20 **Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 21, n. 12, p. 1876-1890, 2001.
- 21 HOCHBERG, M. C. Updating the American College of Rheumatology Revised
22 Criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. **Arthritis and**
23 **Rheumatism**, v. 40, n. 9, p. 1725, 1724, 1997.
- 24 JIN, L. et. al. Homocysteine induces endothelial dysfunction via inhibition of arginine
25 transpor. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 58, n. 2, p. 191, 2007.
- 26 KIANI, A. N. et al. Coronary calcification in SLE: comparison with the Multi-Ethnic
27 Study of Atherosclerosis. **Rheumatology**,p. kev198, 2015.
- 28 KIANI, A. N. et. al. Semiquantified noncalcified coronary plaque in systemic lupus
29 erythematosus. **The Journal of rheumatology**, v. 39, n. 12, p. 2286-2293, 2012

- 1 KLEIN-GITELMAN, M.; LANE, J. C. Systemic Lupus Erythematosus. **Textbook of**
2 **Pediatric Rheumatology**, p. 285–317, 2016.
- 3 KLINMAN, D. M. et al., Quantitation of IgM and IgG secreting B cells in the peripheral
4 blood of patients with systemic lupus erythematosus. **Arthritis & Rheumatism**, n.
5 21, p. 1404–1410, 1991.
- 6 LAI, W. K.; KAN, M. Y. Homocysteine-Induced Endothelial Dysfunction. **Annals of**
7 **Nutrition and Metabolism**, v. 67, n. 1, p. 1–12, 2015.
- 8 LALWANI, P. et al. Serum thiols a 31 biomarker of disease activity in lupus nephritis.
9 **Plos One**, v.10, n.3, p.1-12, 2015.
- 10 LEE, Hui-Ting et al. The pathogenesis of systemic lupus erythematosus-From the
11 viewpoint of oxidative stress and mitochondrial dysfunction. **Mitochondrion**, v. 30, p.
12 1-7, 2016.
- 13 LINDAHL, B. et. al., Markers of myocardial damage and inflammation in relation to
14 long-term mortality in unstable coronary artery disease. **New England Journal of**
15 **Medicine**, v. 343, n. 16, p. 1139-1147, 2000.
- 16 LISNEVSKAIA, L.; MURPHY, G.; ISENBERG, D. Systemic lupus erythematosus.
17 **The Lancet**, v. 384, n. 9957, p. 1878–1888, 2014.
- 18 LOZOVOY, M. et al. Inflammatory biomarkers and oxidative stress measurements in
19 patients with systemic lupus erythematosus with or without metabolic syndrome.
20 **Lupus**, v. 20, n. 13, p. 1356–1364, 2011.
- 21 LOZOVOY, M. et al. Hypertension is associated with serologically active disease in
22 patients with systemic lupus erythematosus: role of increased Th1/Th2 ratio and
23 oxidative stress. **Scandinavian Journal of Rheumatology**, v. 43, n. 1, p. 59–62,
24 2014.
- 25 LOZOVOY, M. et al. Relationship between iron metabolism, oxidative stress, and
26 insulin resistance in patients with systemic lupus erythematosus. **Scandinavian**
27 **Journal of Rheumatology**, v. 42, n. 4, p. 303–10, 2013.
- 28 LOZOVOY, M. A. B.; SIMAO, A. N. C. Oxidative stress is associated with liver
29 damage , inflammatory status , and corticosteroid therapy in patients with systemic
30 lupus erythematosus.**Lupus**, v. 20, n. 12, p. 1250-1259, 2011.

- 1 MAK, A.; KOW, N. Y. Imbalance between endothelial damage and repair: A gateway
2 to cardiovascular disease in systemic lupus erythematosus. **BioMed Research**
3 **International**, v. 2014, 2014.
- 4 MATHIS, K. W. et al. Oxidative stress promotes hypertension and albuminuria during
5 the autoimmune disease systemic lupus erythematosus. **Hypertension**, v. 59, n. 3,
6 p. 673–679, 2012.
- 7 MAXWELL, S. R. J.; MOOTS, R. J.; KENDALL, M. J. Corticosteroids : do they
8 damage the cardiovascular system ?**Postgraduate medical journal**, v. 70, n. 830, p.
9 863-870, 1994.
- 10 MCCULLY, Kimer S. Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the
11 pathogenesis of arteriosclerosis. **The American Journal of Pathology**, v. 56, n. 1, p.
12 111, 1969.
- 13 MCDOWELL, I.F.W.; LANG, D. Homocysteine and endothelial dysfunction: a link with
14 cardiovascular disease. **The Journal of Nutrition**, v.130, n. 2, p. 369S-372S, 2000
- 15 MELISSA, R. et al. Development of Autoantibodies before the Clinical Onset of
16 Systemic Lupus Erythematosus. **New England Journal of Medicine**, p. 1526–1533,
17 2003.
- 18 MERRELL, M.; SHULMAN, L. E. Determination of prognosis in chronic disease,
19 illustrated by systemic lupus erythematosus. **Journal of Chronic Diseases**, v. 1, n.
20 1, p. 12-32, 1955.
- 21
- 22 MUNOZ, L. E. et al. Apoptosis in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus.
23 **Lupus**, v. 17, n. 5, p. 371–375, 2008.
- 24 MURUVE, D. A. et al. The inflammasome recognizes cytosolic microbial and host
25 DNA and triggers an innate immune response.**Nature**, v. 452, n. 7183, p. 103-107,
26 2008.
- 27 NAGY, G. et al. Central role of nitric oxide in the pathogenesis of rheumatoid arthritis
28 and sysemic lupus erythematosus. **Arthritis Research and Therapy**, v. 12, n. 3,
29 2010a.
- 30 NAGY, G. et al. Central role of nitric oxide in the pathogenesis of rheumatoid arthritis

- 1 and systemic lupus erythematosus. **Arthritis research & therapy**, v. 12, n. 3, p. 210,
2 2010b.
- 3 NAKASHIMA, C. A. K. et al. Incidência e aspectos clínico-laboratoriais do Lúpus
4 eritematoso sistêmico em cidade do Sul do Brasil. **Revista Brasileira de**
5 **Reumatologia**, v. 51, n. 3, p. 235–239, 2011.
- 6 NATIONAL CENTER FOR HEALTH STATISTICS (US et al. Health, United States,
7 2007: With chartbook on trends in the health of Americans. 2007.
- 8 NAVARRO-GONZALVEZ JA, GARCIA-BENAYAS C, ARENAS J. Semi-automated
9 measurement of nitrate in biological fluids. **Clin Chem**,v. 44, n. 3, p. 679-681, 1998
- 10 NIKI, E. Lipid peroxidation products as oxidative stress biomarkers.**Biofactors**, v.
11 34, p. 171–180, 2008.
- 12 OATES, J. C.; GILKESON, G. S. The biology of nitric oxide and other reactive
13 intermediates in systemic lupus erythematosus. **Clinical Immunology**, v. 121, n. 3,
14 p. 243–250, 2006.
- 15 OLIVEIRA, S. R. et al. Oxidative stress in multiple sclerosis patients in clinical
16 remission: Association with the expanded disability status scale. **Journal of the**
17 **Neurological Sciences**, v. 321, n. 1-2, p. 49–53, 2012.
- 18 PANUNZIO, Michele F. et al. Supplementation with fruit and vegetable concentrate
19 decreases plasma homocysteine levels in a dietary controlled trial. **Nutrition**
20 **research**, v. 23, n. 9, p. 1221-1228, 2003.
- 21 PARK, S.; SORENSON, C. M.; SHEIBANI, N. PECAM-1 isoforms, eNOS and
22 endoglin axis in regulation of angiogenesis. **Clinical Science**, v. 129, n. 3, p. 217-
23 234, 2015.
- 24 PATERSON, Elaine et al. Supplementation with fruit and vegetable soups and
25 beverages increases plasma carotenoid concentrations but does not alter markers of
26 oxidative stress or cardiovascular risk factors. **The Journal of nutrition**, v. 136, n.
27 11, p. 2849-2855, 2006.
- 28 PERL, A. Oxidative stress in the pathology and treatment of systemic lupus
29 erythematosus. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 9, n. 11, p. 674–86, 2013.

- 1 PERNA, M. et al. Relationship of asymmetric dimethylarginine and homocysteine to
2 vascular aging in systemic lupus erythematosus patients. **Arthritis & Rheumatism**, v.
3 62, n. 6, p. 1718-1722, 2010.
- 4 PETRI, Michelle; BUYON, Jill; KIM, Mimi. Classification and definition of major flares
5 in SLE clinical trials. **Lupus**, v. 8, n. 8, p. 685-691, 1999.
- 6 PETRIN, Jurij et al. The dissociation of arterial hypertension and lupus
7 glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus. **Blood Pressure**, v. 2, n. 2, p.
8 108-112, 1993.
- 9 PONS-ESTEL, G. J. et al. Understanding the Epidemiology and Progression of
10 Systemic Lupus Erythematosus. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, 2010.
- 11 PREISER, J.-C. Oxidative stress. **JPEN. Journal of Parenteral and Enteral**
12 **Nutrition**, v. 36, n. 2, p. 147–54, 2012.
- 13 RIDKER, P. M. et al. Established and emerging plasma biomarkers in the prediction
14 of first atherothrombotic events. **Circulation**, v. 109, n. 25 suppl 1, p. IV-6-IV-19,
15 2004.
- 16 RUA-FIGUEROA, I. et al. Factors involved in the progress of preclinical
17 atherosclerosis associated with systemic lupus erythematosus: a 2-year longitudinal
18 study. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 69, n. 6, p. 1136-1139, 2010.
- 19 RUBANYI, G. M. The role of endothelium in cardiovascular homeostasis and
20 diseases. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 22, p. S1&hyphen, 1993.
- 21 RULLO, O. J.; TSAO, B. P. Recent insights into the genetic basis of systemic lupus
22 erythematosus. **Annals of the Rheumatic Diseases**, p. annrheumdis-2012-202351,
23 2013
- 24 RYAN, M. J. The pathophysiology of hypertension in systemic lupus
25 erythematosus. **American Journal of Physiology. Regulatory, integrative and**
26 **comparative physiology**, v. 296, n. 4, p. 1258-67, 2009.
- 27 SARI, R. et al. Correlation of serum levels of soluble intercellular adhesion molecule-
28 1 with disease activity in systemic lupus erythematosus. **Rheumatology**
29 **International**, v. 21, n. 4, p. 149-152, 2002.

- 1 SHENOY, Vijetha et al. Correlation of serum homocysteine levels with the severity of
2 coronary artery disease. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 29, n. 3, p.
3 339-344, 2014.
- 4 SKEOCH., S. et al. Cellular adhesion molecules as potential biomarkers of nephritis,
5 damage and accelerated atherosclerosis in patients with systemic lupus
6 erythematosus. **Rheumatology (United Kingdom)**, v. 52, p. i134, 2013.
- 7 SABIO, J. M. et al. Relationship between homocysteine levels and hypertension in
8 systemic lupus erythematosus. **Arthritis Care and Research**, v. 66, n. 10, p. 1528–
9 1535, 2014.
- 10 SETOLA, Emanuela et al. Insulin resistance and endothelial function are improved
11 after folate and vitamin B12 therapy in patients with metabolic syndrome: relationship
12 between homocysteine levels and hyperinsulinemia. **European journal of**
13 **endocrinology**, v. 151, n. 4, p. 483-489, 2004.
- 14 SHACTER, E. Quantification and significance of protein oxidation in biological
15 samples. **Drug Metabolism Reviews**, v. 32, n. 3-4, p. 307–326, 2000.
- 16 SHAH, D. et al. Altered redox state and apoptosis in the pathogenesis of
17 systemic lupus erythematosus. **Immunobiology**, v. 218, n. 4, p. 620-627,
18 2013.
- 19 SHAH, D. et al. Oxidative stress in systemic lupus erythematosus: Relationship to
20 Th1 cytokine and disease activity. **Immunology Letters**, v. 129, n. 1, p. 7–12, 2010.
- 21 SHAH, D. et al. Oxidative stress and its biomarkers in systemic lupus erythematosus.
22 **Journal of biomedical science**, v. 21, n. 1, p. 23, 2014.
- 23 SIMAO, A. N. C. et al. Influence of uric acid and (gamma)-glutamyltransferase on
24 total antioxidant capacity and oxidative stress in patients with metabolic syndrome.
25 **Nutrition**, v. 24, n. 7-8, p. 675–681, 2008.
- 26 SOMERS, Emily C. et al. Plasminogen activator inhibitor-1 is associated with
27 impaired endothelial function in women with systemic lupus erythematosus. **Annals**
28 **of the New York Academy of Sciences**, v. 1051, n. 1, p. 271-280, 2005.
- 29 STANKEVICIUS, Edgaras et. al. Role of nitric oxide and other endothelium-derived

- 1 factors. **Medicina (kaunas)**, v. 39, n. 4, p. 333-41, 2003.
- 2 STEINBERG, D. The LDL modification hypothesis of atherogenesis: an update.
3 **Journal of Lipid Research**, v. 50 Suppl, p. S376–S381, 2009.
- 4 TAMURA, Y. et al. Role of plasminogen activator inhibitor-1 in glucocorticoid-induced
5 diabetes and osteopenia in mice. **Diabetes**, p. DB_141192, 2014.
- 6 TAYLOR, E. B.; RYAN, M. J. Understanding mechanisms of hypertension in systemic
7 lupus erythematosus. **Therapeutic Advances in Cardiovascular Disease**, p. 1–13,
8 2016.
- 9 TEDGUI, A.; MALLAT, Z. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory
10 pathways. **Physiological Reviews**, v. 86, n. 2, p. 515-581, 2006.
- 11 TSAO, B. P. The genetics of human systemic lupus erythematosus. **Trends in**
12 **Immunology**, v. 24, n. 11, p. 595-602, 2003.
- 13 TSOKOS, G.C. Systemic Lupus Erythemayosus. **New England Journal of**
14 **Medicine**, 365(22): 2110-21, 2011
- 15 TYAGI, N. et. al. Mechanisms of homocysteine-induced oxidative stress. **American**
16 **Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 289, n. 6, 2005.
- 17 VON FELDT, J. M. et al. Homocysteine levels and disease duration independently
18 correlate with coronary artery calcification in patients with systemic lupus
19 erythematosus. **Arthritis & Rheumatism**, v. 54, n. 7, p. 2220-2227, 2006.
- 20 WANG, G. et al. Markers of oxidative and nitrosative stress in systemic lupus
21 erythematosus: Correlation with disease activity. **Arthritis and Rheumatism**, v. 62,
22 n. 7, p. 2064–2072, 2010.
- 23 WESTERWEEL, P. E. et al. Premature atherosclerotic cardiovascular disease in
24 systemic lupus erythematosus. **Arthritis & Rheumatism**, v. 56, n. 5, p. 1384-1396,
25 2007.
- 26 WITKO-SARSAT, V.; FRIEDLANDER, M.; KHOA, T.N. Advanced oxidation protein
27 products a novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal
28 failure. **J Immunol**. 1998;161:2524–2532.
- 29

- 1 WOYWODT, A. et al. Circulating endothelial cells: life, death, detachment and repair
2 of the endothelial cell layer. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 17, n. 10, p.
3 1728-1730, 2002.
- 4 YANIV, G. et al. A volcanic explosion of autoantibodies in systemic lupus
5 erythematosus: A diversity of 180 different antibodies found in SLE patients.
6 **Autoimmunity Reviews**, v. 14, n. 1, p. 75–79, 2015.
- 7 ZHANG, Q. et al. Oxidative protein damage and antioxidant status in systemic lupus
8 erythematosus. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 35, n. 3, p. 287–294,
9 2010.
- 10
- 11

- 1
- 2
- 3
- 4
- 5
- 6
- 7
- 8
- 9
- 10
- 11
- 12
- 13
- 14
- 15
- 16
- 17
- 18
- 19
- 20
- 21
- 22
- 23
- 24
- 25
- 26
- 27
- 28
- 29
- 30

ANEXOS

1

ANEXO 1 – APROVAÇÃO DO CEP/UUEL

2

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/UUEL.

Endereço: AVENIDA ROBERT KOCH, 60

Bairro: VILA OPERÁRIA

CEP: 86.038-440

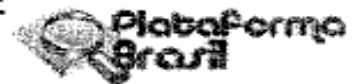
UF: PR

Município: LONDRINA

Telefone: (43)3371-2490

E-mail: cep268@uel.br

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



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

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

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

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

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todas as pendências foram respondidas adequadamente.

Recomendações:

Encaminhar relatório ao final do estudo.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Prezada Pesquisadora,

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

Endereço: AVENIDA ROBERT KOCH, 60

Bairro: VILA OPERÁRIA

CEP: 86.038-440

UF: PR **Município:** LONDRINA

Telefone: (43)3371-2490

E-mail: cep268@uel.br

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



LONDRINA, 04 de Março de 2013

Assinador por:
Alexandrina Aparecida Maciel Cardelli
(Coordenador)

Endereço: AVENIDA ROBERT KOCH, 60

Bairro: VILA OPERÁRIA

CEP: 86.038-440

UF: PR

Município: LONDRINA

Telefone: (43)3371-2490

E-mail: cep268@uel.br

1
2 **ANEXO 2 - Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index - SLEDAI**
3 **(Bombardier et al., 1992)**
4

5 Entrar com o peso específico na coluna do Score do SLEDAI se a alteração estiver **presente**
6 **navisita ou nos últimos 10 dias antes**
7

Table 7

SLE Daily Activity Index: Data Collection Sheet

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

TOTAL SLEDAI SCORE: _____

Reprinted, with permission, from Bombardier C[72]

Anexo 3 – Guideline para autores da revista *Immunobiology*

IMMUNOBIOLOGY

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

●	Description	p.1
●	Audience	p.1
●	Impact Factor	p.1
●	Abstracting and Indexing	p.2
●	Editorial Board	p.2
●	Guide for Authors	p.3



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 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

1
2
3
4 Immunologists, bacteriologists, virologists, serologists, biochemists, dermatologists,
5 researchers into infectious diseases, hematologists, allergists, histochemists, pathologists

6
7
8
9
10 **IMPACT FACTOR**

11 2015: 2.781 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2016
12

13
14
15 **ABSTRACTING AND INDEXING**

16
17 Animal Breeding Abstracts
18 Biosciences Information Services
19 Elsevier BIOBASE
20 Cambridge Scientific Abstracts
21 Current Contents/Life Sciences
22 MEDLINE®
23 Index Veterinarius
24 Medical Documentation Service
25 EMBASE
26 Reference Update
27 Research Alert
28 Science Citation Index
29 Scisearch
30 Veterinary Bulletin
31 Excerpta Medica
32 Biological Abstracts
33 Current Awareness in Biological Sciences
34 CAB Abstracts
35 Chemical Abstracts Service
36 Scopus
37 Current Advances in Genetics and Molecular Biology
38

39
40
41 **EDITORIAL BOARD**

42
43 ***Editor-in-Chief***

44
45 **Wilhelm J. Schwaeble**, Dept. of Infection, Immunity and Inflammation, University of Leicester,
46 Medical Science Bld, University Road, LE1 9HN, Leicester, England, UK, Fax: ++44-116-2525030
47

48 ***Editorial Coordinator***

49 **Leyla Z. Al-Mansouri**
50
51

52 ***Section Editors***

53
54 **Basel al-Ramadi**, United Arab Emirates (UAE) University, Al Ain, United
55 Arab Emirates **Julia Kzhyshkowska**, University of Heidelberg, Mannheim,
56 Germany

57 **John Lambris**, University of Pennsylvania School of Medicine, Philadelphia,
58 Pennsylvania, USA **Galina Mukamolova**, University of Leicester, Leicester,
59 England, UK

60 **Peter Zavodsky**, Hungarian Academy of Sciences, Budapest, Hungary
61
62

63 ***Editorial Board***

64
65 **Youssif Mohammed Ali**, University of Leicester, Leicester, England, UK

66 **Gérard J. Arlaud**, Laboratoire d'Enzymologie Moléculaire, Grenoble
67 Cedex, France **John Atkinson**, Washington University School of
68 Medicine, St. Louis, Missouri, USA **Marina Botto**, Royal Postgrad.
69 Medical School, London, UK

70
71 **Arturo Ferreira**, Universidad de Chile, Santiago de Chile,
72

1 Chile **Teizo Fujita**, Fukushima Medical University,
 2 Fukushima, Japan **Diethard Gemsa**, Philipps-Universität
 3 Marburg, Marburg, Germany **UffeHolmskov**, Syddansk
 4 Universitet, Odense C, Denmark **Roger James**, University
 5 of Leicester, Leicester, England, UK
 7 **Stefan Kaufmann**, Max Planck Institut (MPI) für Infektionsbiologie,
 8 Berlin, Germany **Daniela N Maennel**, University of Regensburg,
 10 Regensburg, Germany
 11 **Patrice Noël Marche**, Université Joseph Fourier (Grenoble I), Grenoble
 12 Cedex 09, France **Misao Matsushita**, Tokai University, Kanagawa, Japan
 14 **Kenneth B.M Reid**, University of Oxford, Oxford, UK
 15 **Noel Rose**, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore,
 16 Maryland, USA **Robert B Sim**, MRC Immunochimistry Unit, Oxford, UK
 18 **Silvano Sozzani**, Università degli Studi di Brescia, Brescia,
 19 Italy **Gregory L. Stahl**, USA Harvard Medical School,
 20 Boston, Maine, USA
 22 **Marcus The len**, Institute for Research in Biomedicine, Bellinzona,
 23 Switzerland **Russell Wallis**, University of Leicester, Leicester,
 24 England, UK
 25 **Marsha Wills-Karp**, Cincinnati Children's Hospital Medical Center, Cincinnati, Ohio, USA

26 **GUIDE FOR AUTHORS**

30 *Your Paper Your Way*

32 We now differentiate between the requirements for new and revised submissions. You
 33 may choose to submit your manuscript as a single Word or PDF file to be used in the
 34 refereeing process. Only when your paper is at the revision stage, will you be requested
 35 to put your paper in to a 'correct format' for acceptance and provide the items required
 37 for the publication of your article.

38 **To find out more, please visit the Preparation section below.**

40 **INTRODUCTION**

42 The Journal publishes papers from the following areas of immunology:

- 43 • Clinical Immunology & Allergology
- 44 • Innate Immunity
- 45 • Tumour Immunology
- 46 • Adaptive Immunity
- 47 • Immunopathology
- 48 • Immunogenetics
- 49 • Parasite Immunology
- 50 • Immunochimistry

52 The Journal considers for publication original research papers. In exceptional cases we
 53 aim to publish high priority papers of special importance on-line within 4–6 weeks of
 54 submission. On occasion, the Journal will publish reviews, editorials and letters to the
 55 editor. Reviews should be solicited by the editors. Editorials are primarily contributed by
 56 the editors but may also be accepted from authors not associated with the Journal.
 57 Letters to the editor should deal with matters of urgent scientific interest and should be
 58 very brief.

60 *Page charges*

61 This journal has no page charges.

64 *Submission checklist*

65 You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to
 66 the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for
 67 more details.

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

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

- 72 • E-mail address

- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable) *Supplemental files* (where applicable)

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)
- Relevant declarations of interest have been made
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our [Support Center](#).

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Please see our information pages on [Ethics in publishing](#) and [Ethical guidelines for journal publication](#).

Human and animal rights

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with [The Code of Ethics of the World Medical Association](#) (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans; [Uniform Requirements for manuscripts submitted to journals](#). Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

All animal experiments should comply with the [ARRIVE guidelines](#) and should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, [EU Directive 2010/63/EU for animal experiments](#), or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed.

Declaration of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/ registrations, and grants or other funding. If there are no conflicts of interest then please state this: 'Conflicts of interest: none'. [More information](#).

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' section of our ethics policy for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out,

1 and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in
 2 any other language, including electronically without the written consent of the copyright-
 3 holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection
 4 service [Cross Check](#).

5 **Changes to authorship**

7 Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before**
 8 submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the
 9 original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the
 10 authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if
 11 approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the
 12 following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list
 13 and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the
 14 addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this
 15 includes confirmation from the author being added or removed.

17 Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or
 18 rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor
 19 considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript
 20 has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will
 21 result in a corrigendum.

22 **Clinical trial results**

24 In line with the position of the International Committee of Medical Journal Editors, the
 25 journal will not consider results posted in the same clinical trials registry in which primary
 26 registration resides to be prior publication if the results posted are presented in the form
 27 of a brief structured (less than 500 words) abstract or table. However, divulging results
 28 in other circumstances (e.g., investors' meetings) is discouraged and may jeopardise
 29 consideration of the manuscript. Authors should fully disclose all posting in registries of
 30 results of the same or closely related work.

31 **Copyright**

32 Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing
 33 Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding
 34 author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing
 35 Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

36 Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including
 37 abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is
 38 required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative
 39 works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works
 40 are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners
 41 and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in
 42 these cases.

43 For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to
 44 complete an 'Exclusive License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party
 45 reuse of open access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

46 **Author rights**

47 As an author you (or your employer or institutions) have certain rights to reuse your
 48 work. [More information](#).

49 *Elsevier supports responsible sharing*

50 Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

51 **Role of the funding source**

52 You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the
 53 research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the
 54 sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data;
 55 in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the
 56 funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the Open Access Publication Fee. Details of [existing agreements](#) are available online.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.
- An open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their research funder or institution.

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our [universal access programs](#).
- No open access publication fee payable by authors.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following [Creative Commons user licenses](#):

Creative Commons Attribution (CC BY)

Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-Non Commercial-No Derivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The open access publication fee for this journal is **USD 2050**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our [green open access page](#) for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form. [Find out more](#).

This journal has an embargo period of 12 months.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's Web Shop.

Informed consent and patient details

1 Studies on patients or volunteers require ethics committee approval and informed
 2 consent, which should be documented in the paper. Appropriate consents, permissions
 3 and releases must be obtained where an author wishes to include case details or other
 4 personal information or images of patients and any other individuals in an Elsevier
 5 publication. Written consents must be retained by the author and copies of the consents
 6 or evidence that such consents have been obtained must be provided to Elsevier on
 7 request. For more information, please review the [Elsevier Policy on the Use of Images or](#)
 8 [Personal Information of Patients or other Individuals](#). Unless you have written permission
 9 from the patient (or, where applicable, the next of kin), the personal details of any patient
 10 included in any part of the article and in any supplementary materials (including all
 11 illustrations and videos) must be removed before submission.

12 **Submission**

13 Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your
 14 article details and uploading your files. The system converts your article files to a single
 15 PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required
 16 to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of
 17 the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

18 *Submit your article*

19 Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/imbio>.

20 **Referees**

21 Please submit, with the manuscript, the names, addresses and e-mail addresses of four
 22 potential referees. Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the
 23 suggested reviewers are used.

24 **PREPARATION**

25 **NEW SUBMISSIONS**

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

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

35 *References*

36 There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in
 37 any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s),
 38 journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book
 39 chapter and the pagination

40 must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the
 41 journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that
 42 missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct.

43 *Formatting requirements*

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

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

50 Divide the article into clearly defined sections.

51 *Figures and tables embedded in text*

52 Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the

1 relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file. The
 2 corresponding caption should be placed directly below the figure or table.

4 **REVISED SUBMISSIONS**

5 *Use of word processing software*

6 Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us
 7 with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as
 8 possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article.
 9 The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional
 10 manuscripts (see also the [Guide to Publishing with Elsevier](#)). See also the section on
 11 Electronic artwork.

12 To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and
 13 'grammar-check' functions of your word processor.

14 *Subdivision - unnumbered sections*

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

19 *Introduction*

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

22 *Material and methods*

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

25 *Results*

26 Results should be clear and concise.

27 *Discussion*

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

31 *Conclusions*

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

35 *Appendices*

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

40 **Essential title page information**

41 • **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems.
 42 Avoid abbreviations and formulae where possible.

43 • **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family
 44 name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the
 45 authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names.
 46 Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's
 47 name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each
 48 affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each
 49 author.

50 • **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages
 51 of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that the e-mail address is
 52 given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**

1 • **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the
 2 article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may
 3 be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did
 4 the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are
 5 used for such footnotes.

7 **Abstract**

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

15 *Graphical abstract*

16 Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to
 17 the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a
 18 concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical
 19 abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size:
 20 Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally
 21 more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution
 22 of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view [Example](#)
 23 [Graphical Abstracts](#) on our information site.

24 Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best
 25 presentation of their images and in accordance with all technical requirements: [Illustration](#)
 26 [Service](#).

27 *Highlights*

28 Highlights are a short collection of bullet points that convey the core findings of the article.
 29 Highlights are optional and should be submitted in a separate editable file in the online
 30 submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points
 31 (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). You can view [example Highlights](#)
 32 on our information site.

33 **Keywords**

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

38 *Abbreviations*

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

43 *Acknowledgements*

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

48 *Formatting of funding sources*

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

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

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

5
 6 If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:
 7

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

10 *Units*

11 Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of
 12 units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.
 13

14 *Footnotes*

15 Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article.
 16 Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should
 17 this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the
 18 footnotes themselves separately at the end of the article.
 19

20 **Artwork**

21 *Image manipulation*

22 Whilst it is accepted that authors sometimes need to manipulate images for clarity,
 23 manipulation for purposes of deception or fraud will be seen as scientific ethical abuse
 24 and will be dealt with accordingly. For graphical images, this journal is applying the
 25 following policy: no specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved,
 26 removed, or introduced. Adjustments of brightness, contrast, or color balance are
 27 acceptable if and as long as they do not obscure or eliminate any information present in
 28 the original. Nonlinear adjustments (e.g. changes to gamma settings) must be disclosed
 29 in the figure legend.
 30

31 *Electronic*

32 *artwork*

33 *General*

34 *points*

- 35 • Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- 36 • Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- 37 • Number the illustrations according to their sequence in the text.
- 38 • Use a logical naming convention for your artwork files.
- 39 • Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
- 40 • For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables
 41 within a single file at the revision stage.
- 42 • Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate
 43 source files. A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

44 **You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are
 45 given here.**

46 *Formats*

47 Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save
 48 as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution
 49 requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):
 50

51 EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

52 TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum

53 of 300 dpi. TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

54 TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of
 55 500 dpi is required.
 56

57 **Please do not:**

- 58 • Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is
 59 too low.

- 1 • Supply files that are too low in resolution.
- 2 • Submit graphics that are disproportionately large for the content.

3 *Color artwork*

4 Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or
5 PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted
6 article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge,
7 that these figures will appear in color online (e.g., Science Direct and other sites)
8 regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed
9 version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding
10 the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your
11 preference for color: in print or online only. [Further information on the preparation of
12 electronic artwork.](#)

13 *Illustration services*

14 [Elsevier's Web Shop](#) offers Illustration Services to authors preparing to submit a
15 manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article.
16 Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical-style images,
17 as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available,
18 where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard.
19 Please visit the website to find out more.

20 *Figure captions*

21 Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (**not** on
22 the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations
23 themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

24 *Tables*

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

31 *References*

32 *Citation in text*

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

41 *Reference links*

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

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

1 should be in the same style as all other references in the paper.

2 *Web references*

3 As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last
4 accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a
5 source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately
6 (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in
7 the reference list.

8 *Data references*

9 This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by
10 citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references
11 should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version
12 (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the
13 reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not
14 appear in your published article.

15 *References in a special issue*

16 Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any
17 citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

18 *Reference management software*

19 Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most
20 popular reference management software products. These include all products that
21 support Citation Style Languages styles, such as Mendeley and Zotero, as well as EndNote.
22 Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the
23 appropriate journal template when preparing their article, after which citations and
24 bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet
25 available for this journal, please follow the format of the sample references and citations
26 as shown in this Guide.

27 following link:

28 <http://open.mendeley.com/use-citation-style/immunobiology>

29 When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the
30 Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

31 *Reference formatting*

32 There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can
33 be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s)
34 name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume
35 number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly
36 encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted
37 article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof
38 stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they
39 should be arranged according to the following examples:

40 *Reference style*

41 References should be cited in the text by first author name and year (Surname, Year)
42 and listed alphabetically in the references section, for example:

43 (Aaron et al., 2001a; Aaron et al., 2001b; Schmidt and Mayer, 1999)

44 Aaron, J.P., Park, C.H., York, N.A., 2001a. Altered immune response in Wkb^{-/-} knockout
45 mice. *Am. J. Immunol.* 98, 545–556.

46 Aaron, J.P., Wang, X., York, N.A., MacTabor, W.D., 2001b. New immune system
47 mediators working through the Wkb signalling pathway. *J. Med. Immun.* 8, 12–34.

48 Schmidt, J., Mayer, M., 1999. The role of the WKB gene family in lymphocyte
49 recruitment. *J. Inflamm.* 52, 68–79.

50 [dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T., 2015. Mortality data for
51 Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions. Mendeley Data, v1.

1 <http://dx.doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>

2
3 The author is fully responsible for the accuracy of bibliographic references.

4
5 *Journal abbreviations source*

6 Journal names should be abbreviated according to the [List of Title Word Abbreviations](#)

7 **Video**

8
9 Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your
10 scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit
11 with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the
12 article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or
13 animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted
14 files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In
15 order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide
16 the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150
17 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of
18 your article in Elsevier Web products, including Science Direct. Please supply 'stills' with
19 your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate
20 image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your
21 video data. For more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note:
22 since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please
23 provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article
24 that refer to this content.
25

26 **Supplementary material**

27
28 Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published
29 with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as
30 they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit
31 your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each
32 supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any
33 stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any
34 corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in
35 Microsoft Office files as these will appear in the published version.
36

37 **RESEARCH DATA**

38 39 **Database linking**

40
41 Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving readers access
42 to relevant databases that help to build a better understanding of the described research.
43 Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article:
44 Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). [More information and](#)
45 [a full list of supported databases](#).
46

47 **Data deposit and linking**

48
49 Elsevier encourages and supports authors to share raw data sets underpinning their
50 research publication where appropriate and enables interlinking of articles and data. [More](#)
51 [information on depositing, sharing and using research data](#).
52

53 **AFTER ACCEPTANCE**

54 55 *Availability of accepted article*

56
57 This journal makes articles available online as soon as possible after acceptance. This
58 concerns the accepted article (both in HTML and PDF format), which has not yet been
59 copyedited, typeset or proofread. A Digital Object Identifier (DOI) is allocated, thereby
60 making it fully citable and searchable by title, author name(s) and the full text. The
61 article's PDF also carries a disclaimer stating that it is an unedited article. Subsequent
62 production stages will simply replace this version.
63

64 **Online proof correction**

65
66 Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system,

1 allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS
2 Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer
3 questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-
4 prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential
5 introduction of errors.

7 If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version.
8 All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including
9 alternative methods to the online version and PDF.

10 We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please
11 use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of
12 the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication
13 will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to
14 ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check
15 carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be
16 guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.
17

18 The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50
19 days free access to the final published version of the article on Science Direct. The Share
20 Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email
21 and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint
22 order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding
23 and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's Web shop. Corresponding
24 authors who have published their article open access do not receive a Share Link as their
25 final published version of the article is available open access on Science Direct and can
26 be shared through the article DOI link.
27

28 **AUTHOR INQUIRIES**

29 Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find
30 everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

31 You can also [check the status of your submitted article](#) or find out [when your accepted
32 article will be published](#).
33
34
35

- 1
- 2
- 3
- 4
- 5
- 6
- 7
- 8
- 9
- 10
- 11
- 12
- 13
- 14
- 15
- 16
- 17
- 18
- 19
- 20
- 21
- 22
- 23
- 24
- 25
- 26
- 27
- 28
- 29
- 30

APÊNDICES

1 determine fatores genéticos que possam estimar a chance de um indivíduo
2 desenvolver a doença ou a chance de um indivíduo previamente com a doença em
3 desenvolver quadros clínicos mais graves como a nefrite lúpica.

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

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

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

16
17 Londrina, ____ de _____ de 2012.

18
19
20
21 _____
22 **Pesquisador Responsável: Profa. Dra. Andrea Name Colado Simão,**

23 RG: 6226736-4.

24
25
26 _____, tendo sido devidamente esclarecido
27 sobre os procedimentos da pesquisa, concordo em participar **voluntariamente** da
28 pesquisa descrita acima.

1

2

Assinatura (ou impressão dactiloscópica): _____

3

Data: _____

4

5

6

7

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

10

1 **APÊNDICE 2 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (para grupo**
2 **controle)**

3

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

7

8 Prezado(a) Senhor(a):

9

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

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

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

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

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

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

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

22 Londrina, ____ de _____ de 2012.

23 **Pesquisador Responsável**

24 RG: _____

25

26

27

28

29

--

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

4
5 Assinatura (ou impressão dactiloscópica): _____

6 Data: _____
7
8

9
10
11 Obs: Caso o participante da pesquisa seja menor de idade, deve ser incluído o
12 campo para assinatura do menor e do responsável.
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28

1

APÊNDICE 3 - Questionário Controles

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

Pós Menopausa	() Sim () Não	Data última menstruação:
---------------	-----------------	--------------------------

- 1
- 2
- 3
- 4
- 5
- 6

1

APÊNDICE 4 - Ficha de avaliação pacientes - Projeto LES

2

NOME:	PRONTUÁRIO:
DATA NASC:	CAUCASIANO () NAO CAUC ()
END:	TEL:
<p>MEDICAMENTOS</p> <p>PREDNISONA:</p> <p>HIDROXICLOROQUINA/CLOROQUINA:</p> <p>METOTREXATE:</p> <p>AZATIOPRINA:</p> <p>MICOFENOLATO MOFETIL:</p> <p>OUTROS IMUNOSSUPRESSORES:</p> <p>OUTROS:</p>	
<p>OUTRAS DOENÇAS:</p> <p>HAS SIM () NÃO ()</p> <p>DIABETES SIM () NÃO ()</p> <p>AVC/IAMSIM () NÃO ()</p> <p>OUTROS:</p>	
<p>NEFRITE LÚPICA</p> <p>SIM () NÃO ()</p>	

OBS:
TEMPO DE DOENÇA:
ESCORE SLEDAI:
TABAGISMO: SIM () NÃO ()
ATIVIDADE FÍSICA: SIM () NÃO ()

1

PESO	ALTURA	IMC	CIRC. ABDOMINAL	PRESSÃO ARTERIAL

2

3