

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica**

**AMANDA FIGUEIREDO BARBOSA AZEVEDO**

**Avaliação dos níveis séricos de IL-17, IL-22, IL-23p19, IL-27 e  
TGF- $\beta$  em pacientes no Lúpus Eritematoso Sistêmico**

**Recife**  
**2017**

**AMANDA FIGUEIREDO BARBOSA AZEVEDO**

**Avaliação dos níveis séricos de IL-17, IL-22, IL-23p19, IL-27 e  
TGF- $\beta$  em pacientes no Lúpus Eritematoso Sistêmico**

**Tese de Doutorado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Inovação  
Terapêutica da Universidade Federal de  
Pernambuco, para a obtenção do Título de  
Doutor em Inovação Terapêutica**

**Orientadora: Profa. Dra.Tatiane Almeida de Menezes**

**Co-orientadora: Profa. Dra.Maira Galdino da Rocha Pitta**

**Recife**

**2017**

Catálogo na Fonte:  
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Azevedo, Amanda Figueiredo Barbosa

Avaliação dos níveis séricos de IL-17, IL-22, IL-23p19, IL-27 e TGF- $\beta$  em pacientes no Lúpus Eritematoso Sistêmico / Amanda Figueiredo Barbosa Azevedo. – Recife: O Autor, 2017.

123 f.: il.

Orientadores: Tatiane Almeida de Menezes, Maria Galdino da Rocha Pitta

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica, 2017.

*Inclui referências e anexos*

1. Lúpus eritematoso sistêmico 2. Doenças autoimunes I. Menezes, Tatiane Almeida de (orient.) II. Pitta, Maria Galdino Rocha (coorient.) III. Título.

616.772

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2017-169

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica**

**REITOR**

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

**VICE-REITORA**

Profa. Dra. Florisbela de Arruda Câmara e Siqueira Campos

**PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

Prof. Dr. Ernani Rodrigues de Carvalho Neto

**DIRETORA DO CENTRO DE BIOCÊNCIAS**

Profa. Dra. Maria Eduarda Lacerda de Larrazabal

**VICE- DIRETORA DO CENTRO DE BIOCÊNCIAS**

Profa. Dra. Oliane Maria Correia Magalhães

**COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA**

Profa. Dra. Maíra Galdino da Rocha Pitta

**VICE- COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA**

Prof. Dr. Luiz Alberto Lira Soares

# FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: AZEVEDO, Amanda Figueiredo Barbosa. Título: Avaliação dos níveis séricos de IL-17, IL-22, IL-23p19, IL-27 e TGF- $\beta$  em pacientes no Lúpus Eritematoso Sistêmico.

Tese apresentada à Universidade Federal de Pernambuco para a obtenção do título de Doutor em Inovação Terapêutica

Aprovada em: 20/02/2017

## Banca Examinadora

Profa. Dra. Luiza Rayanna Amorim de Lima

Faculdade Integradas de Patos

Assinatura: \_\_\_\_\_

Profa. Dra. Michelly Cristiny Pereira

Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Pernambuco

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Mardonny Bruno de Oliveira Chagas

Universidade Federal de Pernambuco

Assinatura: \_\_\_\_\_

Profa. Dra. Maíra Galdino da Rocha Pitta

Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco

Assinatura: \_\_\_\_\_

Profa. Dra. Mariana Brayner Cavalcanti Freire Bezerra

Departamento de Energia Nuclear, Universidade Federal de Pernambuco

Assinatura: \_\_\_\_\_

# DEDICATÓRIA

A Deus, em primeiro lugar por estar comigo em todos os momentos de minha vida, ajudando a me dar força para superar as dificuldades.

Ao meu esposo e filhos, Marconi e Lucas, Giovanna, cujo apoio e estímulo foram indispensáveis para que eu pudesse concluir mais esta etapa da minha vida, sempre me dando amor e carinho.

A minha mãe, Deise em retribuição a todo o carinho, amor e ensinamentos que ajudaram a formar quem eu sou.

A todos meus amigos, pelo apoio e carinho.

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus, que me deu a vida e a capacidade de ir à busca dos meus sonhos.

As Professoras Dra. Tatiane Menezes e Dra. Maira Pitta por ter acreditado em mim, orientando-me ao longo do estudo.

Aos Professores do Doutorado em Inovação Terapêutica - PPGIT pelos ensinamentos.

Aos colegas da Diretoria Geral da Assistência Farmacêutica do estado de Pernambuco, por sempre terem incentivado o meu crescimento profissional.

A todos que formam o LINAT, NUPIT-SG, em especial professor Moacyr Rêgo, Pablo Gualberto, Helena Lima e Sayonara Gonçalves que desde o início me apoiaram.

Aos meus amigos Mônica, José de Arimatea que me ajudaram em todos os momentos.

A equipe médica do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco pela colaboração na coleta dos dados em nome do Dr. Henrique Mariz.

Aos pacientes envolvidos na pesquisa que se doaram.

Aos colegas Rodrigo Arruda e Pablo Gualberto pelas avaliações estatísticas.

A Paulo Brito, secretário do PPGIT, o qual sempre se mostrou empenhado em resolver e ajudar sempre que solicitado.

A todos os meus colegas do doutorado, que sempre compartilharam os diferentes sentimentos vivenciados nessa caminhada.

A meu esposo, Marconi, com quem compartilho meus sonhos, pelo incentivo e por estar ao meu lado em todos os momentos.

A meus filhos, Lucas e Giovanna pela paciência e carinho.

A meus familiares, que sempre torcem por mim.

Enfim, agradeço a todos que de forma direta ou indireta me ajudaram na construção desse trabalho. A todos que vibraram e se emocionaram comigo nessa caminhada.

“Crescer custa, demora esfolar, mas compensa.  
É uma vitória secreta, sem testemunhas.  
O adversário somos nós mesmos”.

**MARTHA MEDEIROS**

## RESUMO

AZEVEDO, Amanda Figueiredo Barbosa. Avaliação dos níveis séricos de IL-17, IL-22, IL-23p19, IL-27 e TGF- $\beta$  em pacientes no Lúpus Eritematoso Sistêmico. 2016. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

O lúpus eritematoso sistêmico - LES é uma doença multifatorial com etiologia ainda não totalmente descrita. Sabe-se que o LES é um distúrbio que envolve a ativação das células B e T autorreativas contra uma variedade de componentes intracelulares. O objetivo deste estudo foi avaliar os níveis séricos de IL-17, IL-22, IL-23p19, IL-27 e TGF- $\beta$  em pacientes portadores do LES para um melhor entendimento da patogênese. Os níveis séricos das citocinas foram determinados por ELISA e avaliados em 81 pacientes com LES e 34 voluntários saudáveis. Os níveis séricos de IL-17, IL-22, IL-23p19, IL-27 foram significativamente maiores nos pacientes com LES (3,90; 80,24; 16,00; 494,00 pg/mL) em comparação com os controles (3,19; 7,81; 7,81; 62,5 pg/mL), não houve alteração nos níveis de TGF- $\beta$ . Não houve correlação entre as citocinas IL-17, IL-22, IL-23p19, IL-27, e a atividade da doença avaliada pelo escore SLEDAI. Na análise multivariada observou-se um aumento dos níveis de TGF- $\beta$  pode levar a uma redução do escore SLEDAI ( $p=0,04$ ). Houve uma correlação positiva entre IL-27 e níveis de C3 ( $p=0,0226$ ) e pacientes com nefrite apresentaram maiores níveis de IL-27 ( $p=0,016$ ). Também se observou uma correlação positiva significativa dos níveis de TGF- $\beta$  com C3 ( $p=0,0003$ ) e C4 ( $p=0,0397$ ) na análise univariada. Houve uma correlação positiva entre IL-22 e presença de alopecia ( $p=0,000$ ), ou seja, quanto maior a citocina, maior a probabilidade de alopecia. Estes dados demonstraram uma possível correlação protetora de IL-27 e TGF- $\beta$  em pacientes com LES. No entanto mais estudos são necessários para esclarecer o papel exato dessas citocinas, para no futuro desenvolver métodos de diagnósticos mais precisos, assim como indicar possíveis alvos terapêuticos para a doença.

**Palavras-chave:** Atividade da doença. Células T. Citocinas. Lúpus eritematoso sistêmico.

## ABSTRACT

AZEVEDO, Amanda Figueiredo Barbosa. Evaluation of serum levels of IL-17, IL-22, IL-23p19, IL-27 and TGF- $\beta$  in patients with Systemic Lupus Erythematosus. Thesis (Doctorate). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

Systemic lupus erythematosus - SLE is a multifactorial disease with etiology not yet fully described. It is known that SLE is a disorder involving the activation of the autoreactive B and T cells against a variety of intracellular components. The aim of this study was to evaluate the serum levels of IL-17, IL-22, IL-23p19, IL-27 and TGF- $\beta$  in patients with SLE for a better understanding of pathogenesis. Serum levels of the cytokines were determined by ELISA and evaluated in 81 patients with SLE and 34 healthy volunteers. Serum levels of IL-17, IL-22, IL-23p19, IL-27 were significantly higher in patients with SLE (3.90, 80.24, 16.00, 494.00 pg / mL) compared Controls (3.19, 7.81, 7.81, 62.5 pg / mL), there was no change in TGF- $\beta$  levels. There was no correlation between the cytokines IL-17, IL-22, IL-23p19, IL-27, and disease activity assessed by the SLEDAI score. In the multivariate analysis, an increase in TGF- $\beta$  levels could lead to a reduction in the SLEDAI score ( $p = 0.04$ ). There was a positive correlation between IL-27 and C3 levels ( $p = 0.0226$ ) and patients with nephritis had higher levels of IL-27 ( $p = 0.016$ ). A significant positive correlation of TGF- $\beta$  levels with C3 ( $p = 0.0003$ ) and C4 ( $p = 0.0397$ ) was also observed in the univariate analysis. There was a positive correlation between IL-22 and the presence of alopecia ( $p = 0.000$ ), that is, the higher the cytokine, the greater the probability of alopecia. These data demonstrated a possible protective correlation of IL-27 and TGF- $\beta$  in patients with SLE. However, more studies are needed to clarify the exact role of these cytokines in the future to develop more accurate diagnostic methods, as well as to indicate possible therapeutic targets for the disease.

**Keywords:** Disease activity. Cells T. Cytokine. Systemic lupus erythematosus.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Rash malar	26
<b>Figura 2</b>	História natural do LES	30
<b>Figura 3</b>	Mecanismo geral dos distúrbios de apoptose	35
<b>Figura 4</b>	Subpopulações dos linfócitos TCD4+	39
<b>Figura 5</b>	Alterações nos níveis séricos de IL-17, IL-22, IL-23p19, IL-27 e TGF- $\beta$ no grupo controle versus LES	52
<b>Figura 6</b>	Alterações no soro IL-27 e TGF- $\beta$ no grupo com LES comparado com C3 e C4	55
<b>Figura 7</b>	Resumo dos resultados obtidos no estudo	55

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Parâmetros clínicos e demográficos dos pacientes	51
<b>Tabela 2</b>	Correlação entre as manifestações clínicas e citocinas no LES	54
<b>Tabela 3</b>	Associação da atividade das citocinas IL-22, IL-27 e TGF- $\beta$ com as manifestações clínicas no LES	54

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b>	O Colégio Americano de Reumatologia (ACR) critérios classificatórios de LES	24
<b>Quadro 2</b>	Critérios Systemic Lupus International Collaborating Clinics (SLICC) para diagnóstico de LES	25
<b>Quadro 3</b>	Principais falhas encontradas no sistema imune de pacientes com LES.	31

## LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

ACR	Colégio Americano de Reumatologia, "American College of Rheumatology"
ANA	Anticorpo antinuclear
APC	Célula apresentadora de antígeno, "Antigen presentation cell"
CD4 +	Linfócito T CD4 positivo
CD8 +	Linfócito T CD8 positivo
CE	Corticosteride
DCs	Células dendrtricas, "Dendritic cells"
EDTA	cido etilenodiaminotetracético
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática, "Enzyme-linked Immunosorbent Assay"
eTreg	Células T regulatórias efetoras/ iTreg
EBV	Vírus Epstein-Barr
C2	Proteína do complemento 2
C3	Proteína do complemento 3
C4	Proteína do complemento 4
CH50	Proteína do complemento total CH50
CMV	Citomegalovírus
Fox P3	forkhead box p3
FAN	Fator antinúcleo
GN	Glomerulonefrite
GC	Glicocorticóide
HLA	Antígeno Leucocitário Humano, "Human leucocitary antigen"
iTreg	Células T regulatórias induzidas
IL	Interleucina
IL1 $\beta$	Interleucina 1 $\beta$
IL 2	Interleucina2
IL 6	Interleucina6
IL 10	Interleucina 10
IL 12	Interleucina 12

IL 17A	Interleucina 17 A
IL 17F	Interleucina 17 F
IL 21	Interleucina 21
IL 22	Interleucina 22
IL 23p19	Interleucina 23p19
IL 27	Interleucina 27
naïveTreg	Células T regulatórias imaturas
LES	Lúpus eritematoso sistêmico
NK	Célula exterminadora natural, “Natural Killer Cell”
PCR	Reação em cadeia de polimerase
SLEDAI	Índice de atividade do LES, “Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index”
SLICC	Índice de dano para LES, “Systemic Lupus International Collaborating Clinic/ACR Damage Index for Systemic Lupus Erythematosus”
SNC	Sistema nervoso central
tTreg	Células T regulatórias de origem tímica
IFN	Interferon
ROR-C	Receptor C órfão relacionado, “Related orphan receptor”
ROR $\gamma$ t	Receptor órfão nuclear gamat, “Orphan nuclear receptor ROR $\gamma$ mat”
SOCS3	Supressor de Sinalização de Citocina 3, “Suppressor of cytokine signaling 1”
STAT-1	Transdutor de sinal e ativador de transcrição, “Signal transducer and activator of transcription-1”
Th	Células T auxiliares, “T helper cells”
Th1	Células T auxiliares 1, “T helper cells 1”
Th2	Células T auxiliares 2, “T helper cells 2”
Th17	Células T auxiliares 17, “T helper cells 17”
Th22	Células T auxiliares 22, “T helper cells 22”
TGF- $\beta$	Fator de transformação do crescimento, “Transforming growth factor beta”
TNF	Fator de necrose tumoral, “Tumor necrosis factor”

T-best Fator de transcrição T-Box, "T-cell-specific T-box transcription fator  
TCR Receptor de célula T, "Tcell receptor

# SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>19</b>
<b>2.</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>22</b>
2.1	Definição.....	22
2.2	Epidemiologia.....	22
2.3	Crêterios classificatórios do LES.....	23
2.4	Manifesta�es clínicas no LES.....	26
2.5	Patog�nese.....	30
2.5.1	Herança genética.....	31
2.5.2	Produ�o de autoantígenos.....	32
2.5.3	Elementos ambientais.....	32
2.5.4	Sistema neuroendócrino.....	32
2.5.5	Produ�o de autoanticorpos.....	33
2.5.6	Aumento da atividade de células B e T.....	34
2.6	Altera�es Imunológicas no LES.....	35
2.7	Diferencia�o e Fun�o das células Th17.....	40
2.8	A Citocina IL-17.....	40
2.9	A Citocina IL-23.....	41
2.10	A Citocina IL-27.....	41
2.11	A Citocina IL-22.....	43
2.12	O TGF-�.....	43
<b>3.</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>46</b>
3.1	Objetivo geral.....	46
3.2	Objetivos específicos.....	46
<b>4.</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>48</b>
4.1	Local do estudo.....	48
4.2	Popula�o alvo.....	48
4.3	Coleta de dados.....	48
4.4	Determina�o de citocinas.....	49
4.5	Análise estatística.....	50
<b>5.</b>	<b>RESULADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>52</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>62</b>

<b>7.</b>	<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>64</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>66</b>
	<b>APÊNDICE A- Artigo. The analysis of IL-17, IL-22, IL-23p19, IL-27 and TGF- <math>\beta</math>'s role in the pathogenesis of SLE.....</b>	<b>95</b>
	<b>APÊNDICE B- Termo de consentimento livre esclarecido para cidadãos alfabetizado.....</b>	<b>111</b>
	<b>APÊNDICE C- Termo de consentimento livre esclarecido para cidadãos não alfabetizado.....</b>	<b>115</b>
	<b>APÊNDICE D- Ficha clínica.....</b>	<b>119</b>
	<b>ANEXO A- Comitê de Ética.....</b>	<b>122</b>
	<b>ANEXO B- Índice de atividade do LES-SLEDAI.....</b>	<b>123</b>
	<b>ANEXO C- Índice de Dano para LES-SLICC.....</b>	<b>124</b>

# *Introdução*

## 1. INTRODUÇÃO

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença inflamatória crônica autoimune que cursa com manifestações clínico-laboratoriais, evolução e prognóstico variável, com ampla variabilidade fenotípica, gravidade e curso clínico e evolui habitualmente com períodos de exacerbação e remissão. Sua etiologia permanece ainda pouco conhecida, porém sabe-se da importante participação de fatores hormonais, ambientais, genéticos e imunológicos para o surgimento da doença (Bernatsky et al., 2006; O'Neill et al., 2010). A maioria dos pacientes tem um curso relativamente benigno, porém a sobrevida global é menor quando comparada à da população geral, em pacientes com LES (Bernatsky et al., 2006). As principais causas de morte são: infecção, doença cardiovascular e lesão renal (Bernatsky et al., 2006; Souza et al., 2012; Telles et al., 2013).

Anormalidades imunológicas no LES incluem a hiperatividade funcional dos linfócitos T e B com grande produção de anticorpos policlonais autoreativos, deposição de complexos imunes no tecido conjuntivo, e outras alterações funcionais de linfócitos (Gaipal et al., 2006).

Embora vários grupos de pesquisa estudem a patogênese, poucos biomarcadores têm sido validados até o presente momento. Alguns autores consideram o anticorpo anti-DNAs ou diminuição de complementos como indicadores de atividade renal, embora não haja consenso sobre isto (Ilei et al., 2004).

As citocinas são mediadores inflamatórios determinantes na resposta imunológica. Apresentam papel importante no dano tecidual, decorrente da resposta inflamatória local e sistêmica (Yap et al., 2010; Ronnblom et al., 2010; Apostolidis et al., 2011). A análise detalhada dos níveis dessas citocinas, as suas inter-relações e como estas se relacionam com a atividade da doença e da acumulação de danos, pode permitir-nos para melhor prever o curso da doença, uma vez que existem poucos estudos e também contraditórios (Chun et al., 2007).

A ausência de biomarcadores dificulta não somente a avaliação precisa de atividade de doença, mas também dificulta identificação de pacientes com

riscos de agudização e da ocorrência de lesão cumulativa em órgãos alvos. O interesse em identificar biomarcadores que se correlacionem com a atividade sistêmica do LES e que possam prever um envolvimento orgânico futuro é crescente, assim como também novos alvos terapêuticos (Chun et al., 2007).

Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar os níveis séricos de IL-17, IL-22, IL-23p19, IL-27 e TGF- $\beta$ , em pacientes com LES, o estudo da associação das citocinas com as características clínicas da doença, poderá levar, a uma melhor compreensão da doença. Os resultados obtidos irão fundamentar futuras pesquisas que desenvolvam métodos de diagnósticos mais precisos, assim como indicar possíveis alvos terapêuticos para a doença.

*Revisão da Literatura*

## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 Definição**

O Lupus eritematoso sistêmico é uma doença com manifestações clínicas distintas, marcada por períodos de remissão e exacerbação, com participação intensa do sistema imune (O'Neill et al., 2010). É uma doença autoimune que afeta diversos órgãos e sistemas. Embora os fatores que contribuem para a patogenia da doença não estejam totalmente esclarecidos, sabe-se que o LES é um distúrbio multifatorial que envolve a ativação de células B e T autorreativas contra uma variedade de componentes intracelulares (West et al., 1994; Ruiz-Irastorza, 2001; Rahman et al., 2008; O'Neill et al., 2010).

### **2.2 Epidemiologia**

A prevalência mundial pode variar entre 20 a 150 casos a cada 100.000 pessoas (Tsokos et al., 2011), enquanto a incidência varia aproximadamente de 1 a 10 novos casos a cada 100.000 pessoas por ano (Kandala et al., 2013).

Os indivíduos de todas as raças podem ser afetados, sendo 9 a 10 vezes mais frequente em mulheres durante a idade reprodutiva, quando a produção de estrógeno (hormônio feminino) é alta (D'Cruz et al., 2007; Borba et al., 2008; Schur et al., 2011), com uma taxa que varia de 6 a 14 mulheres afetadas para cada homem afetado (Jakes et al., 2012).

Estima-se uma incidência de LES em torno de 8,7 casos para cada 100.000 pessoas por ano, de acordo com um estudo realizado em Natal na região Nordeste. (Vilar et al., 2002). Estudo realizado no Sul do Brasil, em Cascavel, no Paraná, mostrou uma incidência de 4,8 casos por 100.000 habitantes/ano (Nakashima et al., 2011). Essa diferença presente nas incidências entre as cidades estudadas pode ser elucidada pela localização geográfica de Natal, pois essa cidade recebe altas taxas de raios ultravioletas, em comparação a Cascavel (Vilar & Sato, 2002; Nakashima et al., 2011).

A doença está atrelada a atividade inflamatória da enfermidade, especialmente quando há acometimento renal e do sistema nervoso central (SNC), ocorre maior risco de infecções graves em decorrência da utilização de imunossuppressores, mais tarde, às complicações da própria doença e do tratamento, sendo a doença cardiovascular um dos mais importantes fatores de morbidade e mortalidade dos pacientes (Pistiner, et al. 1991; Boumpas, et al. 1995, Manzi, et al.1999; Chogle, et al., 2007).

### **2.3 Critérios classificatórios do LES**

Para o diagnóstico do LES, não existem critérios definitivos. O Colégio Americano de Reumatologia (ACR) definiu critérios classificatórios de LES, segundo os quais são necessários no mínimo quatro critérios clínicos e/ou laboratoriais entre onze (Tan et al., 1982), após cuidadosa averiguação e exclusão de doenças infecciosas e neoplásicas, entre outras. Estes critérios foram revisados em 1997, e o item “presença de células LE”, constante do critério “alterações imunológicas”, foi excluído, e o teste falso positivo para sífilis foi trocado pela presença de anticorpos antifosfolípides (Hochberg, 1997) (Tabela 1). Apesar de amplamente utilizados, estes critérios têm suas limitações e novas mudanças estão sendo estudadas (Petri et al., 2012).

Os critérios diagnósticos de LES foram recentemente revisados, com o objetivo de aumentar a acurácia diagnóstica (Tabela 2), em que a presença de quatro ou mais critérios clínico-laboratoriais é definidora de LES. O índice SLICC (Systemic Lupus International Collaborating Clinics, 2012) (Petri et al., 2012).

A atividade da doença pode ser avaliada pela combinação de anamnese, exame físico e exames laboratoriais. Existem vários índices com sensibilidade semelhante (Griffiths et al., 2005) para avaliar a atividade da doença, tais como: SLEDAI (Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index) (Bombardier et al., 1992, Petri et al., 1991), SLAM (Systemic Lupus Activity Measure) (Liang et al., 1989) e BILAG (British Isles Lupus Assessment Group) (Symmans et al., 1988). A detecção de lesão irreversível ou sequela decorrente da doença pode ser medida por meio do SLICC/ACR DAMAGE

INDEX (SLICC/ACR: Systemic Lupus International Colaborating Clinics/ American College of Rheumatology) (Gladman et al., 1996).

**Quadro 1:** Critérios utilizados para diagnóstico do Lúpus Eritematoso revisado por Rochberg (1997)

<b>Critério</b>	<b>Definição</b>
Eritema malar	Eritema fixo, plano ou elevado nas eminências malares, tendendo a poupar a região nasolabial.
Lesão discoide	Lesão eritematosa, infiltrada, com escamas queratóticas aderidas e tampões foliculares, que evolui com cicatriz atrófica e discromia.
Fotossensibilidade	Eritema cutâneo resultante de reação incomum ao sol, por história do paciente ou observação do médico.
Úlcera oral	Úlceração oral ou nasofaríngea, geralmente não dolorosa, observada pelo médico.
Artrite	Artrite não erosiva envolvendo dois ou mais articulações periféricas, caracterizada por dor à palpação, edema ou derrame.
Serosite	a) pleurite - história convincente de dor pleurítica ou atrito auscultado pelo médico ou evidência de derrame pleural; ou b) pericardite - documentada por eletrocardiografia ou atrito ou evidência de derrame pericárdico.
Alteração renal	a) proteinúria persistente de mais de 0,5 g/dia ou acima de 3+ (+++) se não quantificada; ou b) cilindros celulares - podem ser hemáticos, granulares, tubulares ou mistos.
Alteração neurológica	a) convulsão - na ausência de fármacos implicados ou alterações metabólicas conhecidas (por exemplo, uremia, cetoacidose, distúrbios hidroeletrólíticos); ou b) psicose - na ausência de fármacos implicados ou alterações metabólicas conhecidas (por exemplo, uremia, cetoacidose, distúrbios hidroeletrólíticos).
Alterações hematológicas	a) anemia hemolítica com reticulocitose; ou b) leucopenia de menos de 4.000/mm <sup>3</sup> em duas ou mais ocasiões; ou c) linfopenia de menos de 1.500/mm <sup>3</sup> em duas ou mais ocasiões; ou d) trombocitopenia de menos de 100.000/mm <sup>3</sup> na ausência de uso de fármacos

	causadores.
Alterações imunológicas	a) presença de anti-DNA nativo; ou b) presença de anti-Sm; ou c) achados positivos de anticorpos antifosfolípídios baseados em concentração sérica anormal de anticardiolipina IgG ou IgM, em teste positivo para anticoagulante lúpico, usando teste-padrão ou em VDRL falso-positivo, por pelo menos 6 meses e confirmado por FTA-Abs negativo.
Anticorpo antinuclear (FAN)	Título anormal de FAN por imunofluorescência ou método equivalente em qualquer momento, na ausência de fármacos sabidamente associados ao lúpus induzido por fármacos.

Fonte: Hochberg (1997).

**Quadro 2:** Critérios Systemic Lupus International Collaborating Clinics (SLICC) para diagnóstico de LES (adaptado por Petri,2012).

<b>Critérios</b>
1. Lúpus cutâneo agudo: inclui rash malar, lúpus bolhoso, e rash fotossensível;
2. Lúpus cutâneo crônico: rash discoide, hipertrófico ou paniculite lúpica;
3. Úlceras orais: palato, boca e língua; ou úlceras nasais;
4. Alopecia não cicatricial;
5. Sinovite de duas ou mais articulações, com edema ou derrame articular (ou artralgia, e rigidez matinal maior que 30 minutos);
6. Serosite: dor pleurítica típica por mais de um dia ou derrame pleural ou atrito pleural; dor pericárdica típica por mais de um dia ou efusão pericárdica ou atrito pericárdico ou eletrocardiograma com sinais de pericardite;
7. Renal: relação entre proteína e creatinina urinárias (ou proteinúria de 24 horas) com mais de 500 mg de proteínas nas 24 horas, ou cilindros hemáticos;
8. Neurológico: convulsão, psicose, mielite; mononeurite múltipla, neuropatia cranial ou periférica, estado confusional agudo;
9. Anemia hemolítica;
10. Leucopenia <4 000/mm <sup>3</sup> ou linfopenia <1 000/mm <sup>3</sup> , na ausência de outra

causa conhecida;
11. Trombocitopenia <100 000/mm <sup>3</sup> , na ausência de outra causa conhecida;
12. Fator antinuclear positivo;
13. Anticorpo anti-DNA positivo;
14. Anticorpo anti-Sm positivo;
15. Positividade de anticorpos antifosfolídeos;
16. Complemento reduzido (frações C3, C4, CH50);
17. Coombs direto positivo (na ausência de anemia hemolítica).

Fonte: Petri et al (2012).

## 2.4 Manifestações clínicas no LES

As apresentações clínicas variam desde manifestações muco cutâneas a manifestações do SNC, como convulsões e psicose. Sintomas como fadiga, perda de peso e febre são frequentemente notados e tem um impacto expressivo na qualidade de vida dos pacientes (Tench et al., 2000; Kuhn et al., 2011).

No LES o envolvimento cutâneo é muito comum, afetando até 90% dos pacientes. Após exposição à radiação solar ou artificial (lâmpadas fluorescentes ou halógenas), a maioria apresenta fotossensibilidade. A clássica lesão em asa de borboleta (Figura 1), caracterizada por eritema malar e no dorso do nariz, preservando o sulco nasolabial, é identificada em menos de 50% dos casos (Schur, et al., 2012).

**Figura 1.** Paciente com Rash malar (Uva et al., 2012)



Alopecia pode ocasionar cicatrizes quando associada a lesões discóides. Na experiência clínica, alopecia é geralmente difusa ou frontal, muito frequente, constituindo-se assim em um bom marcador para o LES. A alopecia se manifesta por placas eritematosas cobertas por uma escama aderente, envolvendo comumente o couro cabeludo, as orelhas, a face e o pescoço, as lesões do lúpus discoide, inicialmente, essas lesões são hiperpigmentadas e evoluem com uma área central atrófica, com ausência de pelos (Schur, et al., 2012).

No lúpus cutâneo, as lesões são simétricas, superficiais, não cicatriciais, localizadas em áreas expostas a luminosidade. Elas iniciam como pequenas pápulas eritematosas, evoluindo para lesões anulares policíclicas ou papulo escamosas (psoriasiformes) e costumam cursar com a presença do anticorpo anti-Ro/SSA (Schur, et al., 2012).

O fenômeno de Raynaud, está presente em cerca de 16% a 40% dos pacientes e caracteriza-se por alterações vasculares (vasoconstrição e vasodilatação) que determinam mudança na coloração das extremidades (palidez, cianose e rubor), geralmente se associa com estresse emocional ou frio (Cervera, et al., 2003).

O acometimento articular é outra manifestação frequente, sendo detectado em mais de 90% dos pacientes durante o desenvolvimento da doença. (Schur, et al., 2012). Artralgia e mialgia acometem a maioria dos pacientes. Artrite afeta, geralmente as pequenas articulações da mão e não evoluindo para erosões. A clássica "Artropatia de Jaccoud", resulta em deformidade e incapacidade funcional significativa, embora não causada por artrite destrutiva (Manson et al., 2006; Rahman et al., 2008; Ball et al., 2011). Necrose asséptica de múltiplas articulações, especialmente da cabeça do fêmur, pode ocorrer, particularmente nos pacientes em uso de glicocorticoide (GC) em dose elevada por extensos períodos (Cronin et al., 1988). Perda de massa óssea com aumento do risco de osteoporose e fraturas geralmente está associada com uso crônico de GC e em decorrente da baixa exposição solar a deficiência de vitamina D (Lee et al., 2007; Ruiz et al., 2008).

Alterações renais ocorrem em cerca de 50% dos pacientes, sendo hematúria e proteinúria persistentes nos achados mais notados. É mais comum nos primeiros anos da doença, o desenvolvimento da nefrite lúpica. A mesma é

caracterizada por proteinúria (> 0,5 g/24 horas), presença de sedimentos urinários (hemácias dismórficas, leucócitos) e ainda achados histológicos, pode cursar com síndrome nefrítica ou nefrótica, consumo de complementos, positividade do anti-DNA nativo e, nas formas mais graves, trombocitopenia e perda de função renal. Como o envolvimento renal é muitas vezes assintomático, o exame de urina regular e monitoramento da pressão arterial tornam-se decisivos (O'Neill et al., 2010; Sigdel et al., 2016).

Anemia, trombocitopenia e leucopenia são algumas alterações hematológicas. Doença hematológica grave pode ocorrer, mas é relativamente rara (Sultan et al., 2003; Rahman et al., 2008). A anemia comumente é normocítica e normocrômica, e surge dependendo da seriedade e duração da doença (Sultan et al., 2003). Outro achado frequente no LES é a trombocitopenia, cujo grau é variável. A trombocitopenia transitória muitas vezes aparece durante uma fase de exacerbação da doença sem causar tendência hemorrágica (Sultan et al., 2003; Rahman et al., 2008). Leucopenia é comum e pode resultar de doença ativa ou devido à reação a drogas (Sultan et al., 2003; Rahman et al., 2008).

Pleurite, causando dor torácica, tosse e dispneia é a manifestação pulmonar mais comum no LES (Paran et al., 2004), ocorre em cerca de 50% dos pacientes, com derrame de baixo a moderado volume, geralmente dos dois lados; menos comumente, hipertensão pulmonar e pneumonite lúpica. A intensidade da hipertensão pulmonar é geralmente de leve a moderada, ocorrendo em 12% a 23% dos casos. O quadro agudo de pneumonite cursa com febre, tosse, hemoptise, pleurisia e dispneia, detectada em até 10% dos pacientes (Orens et al., 1994). Mais raramente, encontram-se síndrome do pulmão encolhido e hemorragia alveolar aguda (Karim et al., 2002; Badsha et al., 2004). Embora os sintomas possam estar relacionados diretamente à atividade da doença, embolia pulmonar deve ser sempre considerada, principalmente naqueles que têm anticorpos antifosfolípidos positivos. As infecções são comuns, e qualquer lesão parenquimatosa deve ser tratada como infecciosa até que se prove o contrário (Paran et al., 2004; Torre et al., 2011).

As complicações cardíacas incluem pericardite, doenças valvares, endocardite de Libman-Sacks, miocardite, cardiomiopatia, doenças da artéria

coronária e distúrbios da condução (Yeh et al., 2007). Pericardite é a ocorrência cardíaca mais comum, podendo ser clínica ou subclínica, e ocorre em até 55% dos pacientes (Moder et al., 1999; Khamashta et al., 1996). O derrame pericárdico geralmente é baixo e detectável apenas por ecocardiografia, raramente evoluindo para tamponamento cardíaco ou pericardite constrictiva. Miocardite está frequentemente acompanhada à pericardite, ocorrendo em cerca de 25% dos casos. Acometimento valvar é na maioria das vezes detectado por ecocardiografia e o espessamento valvar é a alteração mais encontrada. Endocardite de Libman- Sacks caracteriza-se por danos verrucosos, encontrados especialmente nas valvas aórtica e mitral, sendo apresentadas em até 43% dos pacientes (Roldam et al., 1996; Khamashta et al., 1996). Episódios tromboembólicos também podem estar associados à presença de anticorpos antifosfolípidios e ao uso crônico de GC ou de anticoncepcional oral (Khamashta et al., 1996; Yeh et al., 2007) Doença arterial coronariana, outra manifestação muito importante, levando a morbidade e mortalidade precoce (Mucenic et al., 2009).

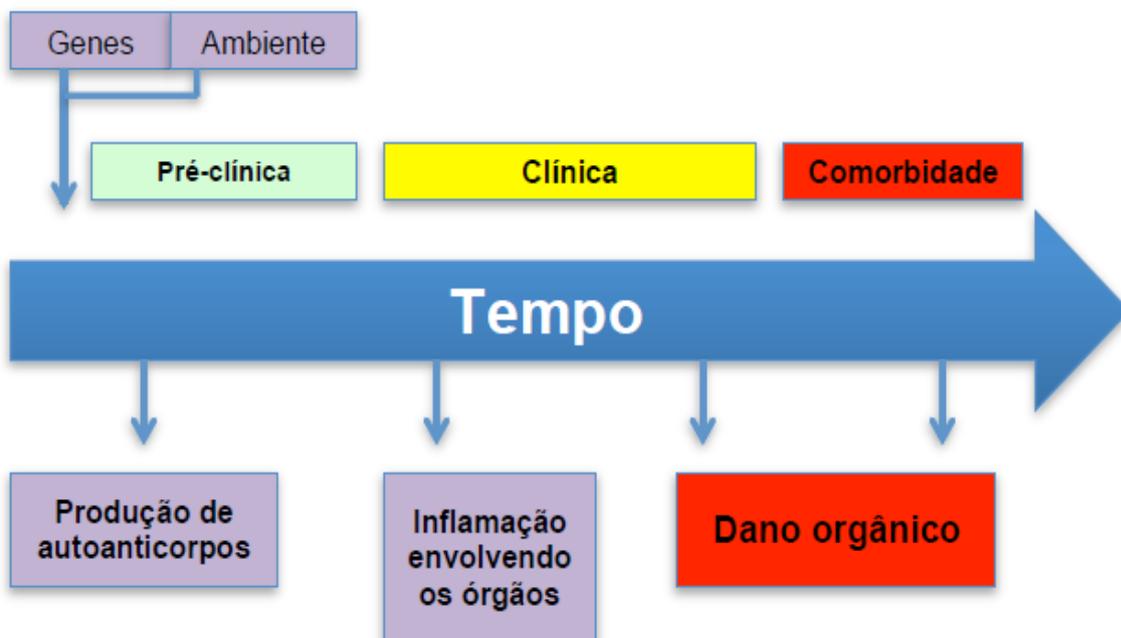
Podem ocorrer nos pacientes com LES, sintomas neuropsiquiátricos, como danos imunomediados no SNC, repercussão da doença em outros órgãos ou complicações terapêuticas. As alterações clínicas do lúpus neuropsiquiátrico incluem síndrome cerebral orgânica, psicose, quadros depressivos, déficits funcionais, acidentes vasculares encefálicos, neuropatias periféricas, neuropatias cranianas, mielite transversa e convulsões. Convulsão e psicose podem constituir-se na primeira manifestação isolada da doença (Schenatto et al., 2006).

Sintomas de depressão e ansiedade são frequentemente relatados em pacientes com LES e é, possivelmente, devido ao déficit físico e ao estresse de viver com uma doença crônica (Seawell et al., 2004; Postal et al., 2011). Pacientes com transtornos de depressão e ansiedade, muitas vezes sentem vergonha de assumir publicamente os seus sintomas; alguns métodos de avaliação, como questionários podem ser úteis na identificação desses sintomas nos pacientes (Bachen et al., 2009).

## 2.5 Patogênese

As características principais dos indivíduos que desenvolvem LES são a produção de autoanticorpos e o clearance prejudicado de corpos apoptóticos. É uma doença multifatorial, incluindo fatores genéticos, ambientais e hormonais (Figura 2). Além disso, alteração nas linhagens de células B e T também colabora para o desenvolvimento da doença (Ruiz et al., 2001; Rahman et al., 2008; O'Neill et al., 2010). De maneira simples, os mecanismos envolvidos na patogênese são: herança genética, produção de autoantígenos, elementos ambientais, sistema neuroendócrino, produção de autoanticorpos e aumento da atividade de células B e T (Rahman et al., 2008; O'Neill et al., 2010).

**Figura 2.** História natural do LES (Bertsias et al., 2010).



**Quadro 3:** Principais falhas encontradas no sistema imune de pacientes com LES.

<b>Células</b>	<b>Falha/Alteração funcional</b>
Macrófagos	Redução na habilidade de fagocitar células apoptóticas
Células dendríticas	Apresentação anormal de antígenos próprios
Células B	Taxa de proliferação e produção de autoanticorpos aumentada Ativação policlonal e sinalização anormal Defeito na tolerância celular Hiperreatividade e hiperresponsividade
Células T	Padrão de expressão gênica alterado levando a alterações funcionais Diminuição do número de células T regulatória e capacidade diminuída de suprimir a imunidade Hiperreatividade e hiperresponsividade
Sistema de complemento	Deficiência do complemento com consequente falha na depuração de complexos imunes.

Fonte: Crispín et al (2011).

### 2.5.1 Herança genética

A expectativa de desenvolvimento do LES em gêmeos monozigóticos e dizigóticos são de 24-57% e 2-5%, respectivamente, sugerindo que a genética tem uma atuação importante na patogênese da doença (Rhodes et al., 2008; Muñoz et al., 2010; Askanase et al., 2012). Genes do antígeno leucocitário humano (HLA), particularmente HLA-DRB1 e HLA-DQB1 têm sido conectados à susceptibilidade ao LES (Reveille 1991; Muchinechi et al., 1998; Gladman et al., 1999; Wakeland et al., 2001; Graham et al., 2002; Smikle et al., 2002; Farabosco et al., 2006; Graham et al., 2007; Fu et al., 2011). O perfil HLA-DRB1\*0301 tem sido associado à susceptibilidade em pessoas latino-americanas (Fu et al., 2011). Análises sorológicas específicas apontam que tanto o HLA-DR3 como o HLA-DR2 também são fatores de risco (Fu et al., 2011). Já o HLA-DR3-DQ2 é um haplótipo que tem forte associação no desenvolvimento do LES em caucasianos (Fu et al., 2011).

### 2.5.2 Produção de autoantígenos

É possivelmente uma das principais fontes de autoantígenos no LES, o mecanismo de ativação induzida pela morte celular programada (apoptose) (Levine et al., 1999; Mevorache et al., 2010; Rastin et al., 2011). Uma célula em apoptose forma vesículas de superfície resultante dos antígenos que se deslocam do núcleo para a membrana celular. Próximo à superfície das células, o antígeno pode ativar a resposta imune. Células não apoptóticas são achadas continuamente em indivíduos saudáveis, mas em pacientes com LES este mecanismo se torna patogênico, devido ao acréscimo na quantidade e duração de células apoptóticas em circulação (Herrmann et al., 1998; Gaipal et al., 2006).

### 2.5.3 Elementos ambientais

Existem evidências de que a exposição à radiação ultravioleta (UV) altera a estrutura química do ácido desoxirribonucleico (DNA) e sua localização, bem como a disponibilidade dos antígenos ribonucleoprotéicos (RNP) (Sontheimer et al., 1996). Outro fator ambiental envolvido é a exposição a determinados vírus como o Epstein-Bar (EBV) e citomegalovírus (CMV). Após infecção, ocorre um mecanismo chamado de mimetismo molecular entre os antígenos próprios e externos, acompanhado da ativação inespecífica de linfócitos T e B, resultando na liberação de autoantígenos mais imunogênicos (Zandman et al., 2008).

### 2.5.4 Sistema neuroendócrino

Contribuem para a patogênese do LES, as anormalidades na função do hipotálamo e/ou hipófise. Foi verificado que alguns pacientes têm hiperprolactinemia e outros têm níveis inadequados do hormônio antidiurético (Chrousos et al., 1995; Jara et al., 2001; Méndez et al., 2004).

### 2.5.5 Produção de autoanticorpos

São frequentes em pacientes com LES, os anticorpos antinucleares - ANA, originalmente narrados em 1957 através de um ensaio de imunofluorescência com o tecido do fígado de roedores como substrato (Ippolito et al., 2011; Radic et al., 2011). Mais de 90% dos pacientes com LES têm ANA positivo. Valores de 1/80 ou maiores são aceitos como títulos significativos. Embora sensíveis estes autoanticorpos não são específicos para o LES (Ippolito et al., 2011).

Um autoanticorpo altamente específico para o LES é o Anti-dsDNA, presente em até 70% dos pacientes, mas em menos de 0,5% dos indivíduos saudáveis ou pacientes com outras doenças autoimunes (Isenberg et al., 1985; Ippolito et al., 2011). Entre os pacientes que têm títulos elevados de anti-dsDNA e doença clinicamente quiescente, 80% têm a doença que se torna clinicamente ativa dentro de cinco anos após a detecção de títulos elevados deste autoanticorpo (Ng et al., 2006). Quase 70% dos pacientes com lesões subagudas possuem anticorpo anti-Ro (SSA), que pode estar associado a anticorpos anti-La (SSB) (Castellino et al., 2007). O anti-Ro e o anti-La são imunoglobulinas específicas contra as proteínas do RNA, sendo que o anti-La normalmente coexiste com o anti-Ro, raramente sendo encontrado sozinho. Além disso, a presença de anti-Ro e anti-La, ou ambos durante a gravidez confere um risco de 1 a 2% maior de bloqueio cardíaco fetal (Buyon et al., 2003).

Os anticorpos anti-receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), NR2a e NR2b têm sido observados em pacientes com manifestações neuropsiquiátricas (NP). Embora anticorpos anti-NR2 tenham sido estudados em pacientes com LES, apenas anticorpos anti-NR2 no líquido cefalorraquidiano (LCR), e não no soro, estão associados com manifestações NP difusas no LES (Arinuma et al., 2008). Os anticorpos anti-receptores NMDA no LCR acometem o SNC independente de eventos trombóticos ou vasculite (DeGiorgio et al., 2001). Estes anticorpos no LCR foram associados com manifestações NP em geral e manifestações NP difusas (Arinuma et al., 2008); já no soro, foram descritas associações com distúrbio cognitivo (Omdal et al.,

2005), depressão (Omdal et al., 2005), déficit de memória recente e de aprendizado (Omdal et al., 2005).

Proteína P ribossomal é um pentâmero composto por três fosfoproteínas diferentes, formando o monômero P0 e os dímeros P1 e P2. Ela exerce um papel enorme em todas as etapas da síntese proteica. A presença de anticorpos anti-P pode estar associada ao comprometimento do SNC (Tzioufas et al., 2000; Abdel et al., 2008; Hirohata et al., 2007; Briani et al., 2009), rins (Hulsey et al., 1995; Chindalore et al., 1998; Monova et al., 2001) e/ou danos no fígado (Koren et al., 1993; Arnett et al., 1995; Koscec et al., 1997).

#### 2.5.6 Aumento da atividade de células B e T

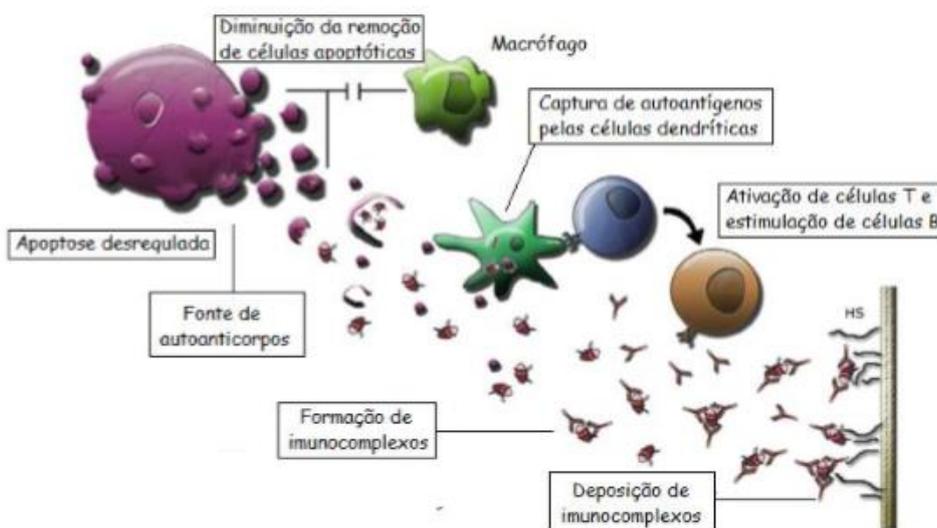
Os mecanismos de aumento da atividade de células B e T envolvem a produção de autoantígenos, que está relacionada ao aumento da apoptose e ao *clearance* prejudicado de corpos apoptóticos fornecidos continuamente pelo dano tecidual ( Figura 3). Um único antígeno inicia uma resposta, mas na ausência do mecanismo de tolerância imunológica, a resposta imune torna-se ininterrupta, envolvendo mais células B e T com especificidade relacionada ao antígeno inicial, até que ambas sejam ativadas por antígenos múltiplos, muitos dos quais são antígenos próprios (Chan et al., 1999; GaipI et al., 2006).

Outro mecanismo importante sobre hiperatividade é a expressão aumentada de moléculas de superfície que participam da ativação de células em ambas as populações de células (células B e T). Autoanticorpos podem ativar células T e ajudam na sua diferenciação. O estímulo aumentado na diferenciação e maturação de células T leva a uma produção anormal de citocinas em pacientes com LES (Chan et al., 1999; GaipI et al., 2006; Choi et al., 2017).

As citocinas são proteínas de baixo peso molecular, produzidas por diferentes células do sistema imunológico inato e adaptativo (Yap et al., 2010). Elas mediam a ativação e regulação funcional do sistema imunológico através da ligação aos receptores de superfície celular, desempenhando um papel fundamental na diferenciação, maturação e ativação de várias outras células (Wozniacka et al., 2006; Yap et al., 2010).

No LES, o perfil de citocinas pode determinar alguns aspectos disfuncionais do sistema imunológico e o envolvimento de vários órgãos. Perfis alterados de citocinas podem ser responsáveis pela heterogeneidade do LES quanto à apresentação, gravidade e resposta ao tratamento (Yap et al., 2010).

**Figura 3.** Mecanismo geral dos distúrbios de apoptose e alteração na remoção de células apoptóticas, resultando na deposição de imunocomplexos (Tiffin et al., 2013).



## 2.6 Alterações Imunológicas no LES

As citocinas são proteínas secretadas pelas células do sistema imunológico e podem ter resultados tanto estimulatórios, participando da propagação, ativação e quimiotaxia, quanto supressores, beneficiando a diminuição de respostas imunes indesejadas ou inadequadas. Dessa forma, alterações nessas proteínas têm sido implicadas na patogênese do LES, uma vez que elas exercem papel importante na modulação da resposta imunológica (Apostolidis et al., 2011).

Secretada por células T, a Interleucina-2, desempenha funções imunorreguladoras importantes sobre essas células. No LES, há uma redução na produção dessa citocina (Alarcón et al., 2005), o que pode contribuir para a redução do número de células T reguladoras (Tregs), uma vez que a IL-2 é necessária para a sobrevivência e funcionamento dessas células (Lieberman et

al., 2010). A redução dos níveis de IL-2 também resulta em baixa atividade de células T citotóxicas, elevando o risco de infecção em pacientes debilitados pela doença. Por fim, a deficiência de IL-2 no LES implica na supressão do mecanismo de morte celular induzida por ativação, e consequente aumento da longevidade de células T autorreativas (Tsokos et al., 2011).

Produzida principalmente por células T, a Interleucina-17 (IL-17), tem uma importante ligação entre a imunidade adaptativa mediada por células T e os componentes inflamatórios da imunidade inata, exercendo papel essencial na resposta imune contra certas bactérias e fungos (Abbas et al., 2008). As células produtoras de IL-17, células Th17, têm sido implicadas na patogênese de várias doenças autoimunes, incluindo o LES. O soro de indivíduos com a doença contém níveis anormalmente elevados dessa citocina e, tais pacientes, também secretam a IL-17 através de células T CD4+ e CD4-CD8- (duplo negativo) (Crispín et al., 2008; Nalbandian et al., 2009). Pacientes com nefrite lúpica, umas das manifestações clínicas mais recorrentes nesses indivíduos, apresentam células secretoras de IL-17 em infiltrados nos rins. O acréscimo da produção de IL17 está correlacionado com a atividade da doença, isto é, a liberação dessa citocina amplifica a resposta inflamatória, recrutando células efetoras aos órgãos alvos (Yang et al., 2008; Sigdel et al., 2016).

O Interferon tipo I (IFN $\alpha$  e IFN $\beta$ ) participa de várias funções, como antiviral, antiproliferativa e imunomoduladora. Devido a isso, essa citocina foi relacionada com o processo patogênico de diversas doenças autoimunes, incluindo o LES (Apostolidis et al., 2011). Estudos avaliando os níveis séricos de IFN I em pacientes com LES mostraram que tanto os pacientes quanto os indivíduos saudáveis de uma mesma família têm produção elevada de IFN I (Niewold et al., 2007; 2008). Isso sugere que o controle genético do IFN I é expressivo para a susceptibilidade à doença. Contudo para o desenvolvimento das manifestações clínicas, são requeridas associações com outros fatores como, por exemplo, polimorfismos genéticos em outros genes, fatores ambientais e hormonais (Apostolidis et al., 2011). Além disso, um estudo de análise de expressão gênica de IFN I mostrou que 90% dos pacientes exibiram altos níveis séricos dessa citocina, levando ao que se chama de assinatura de IFN, mas apenas 40% a 50% dos pacientes tinham uma atividade significativa

de IFN, sugerindo que fatores adicionais são necessários para uma sensibilidade aos sinais liberados pelo IFN (Apostolidis et al., 2011).

As células dendríticas (CDs) são células apresentadoras de antígenos provenientes do mesmo precursor de monócitos. São largamente difundidas pelos vários tecidos do corpo, permitindo a imunovigilância contra patógenos invasores, sendo responsáveis por induzir a resposta imune contra partículas estranhas e por manter a autotolerância (Seitz et al., 2010). As CDs têm ação importante no desenvolvimento do LES e podem influenciar no aparecimento da doença através da apresentação de autoantígenos, secreção de citocinas pró-inflamatórias, como o IFN I, e induzindo a produção de autoanticorpos pelas células B (Choi et al., 2012).

Alguns dos principais eventos que ocorrem no LES são os distúrbios no mecanismo de apoptose ou desregulação na remoção de células apoptóticas (Rastin et al., 2013). Normalmente, essas células são ligeiramente removidas por fagócitos e seus conteúdos – proteínas e material nuclear – são internalizados e digeridos. Nos pacientes com LES, os corpos apoptóticos permanecem no meio extracelular e são expostos ao sistema imune que não reconhece tais estruturas como próprias, levando ao surgimento exacerbado de antígenos autólogos (Abbas et al., 2008). Esses autoantígenos são responsáveis por ativar CDs, as quais apresentam tais antígenos às células T que estimulam células B, levando a produção de auto anticorpos (Tiffin et al. 2013).

A desregulação das imunidades inata e adaptativa promove a liberação de autoanticorpos contra, aproximadamente, 150 tipos diferentes de antígenos autólogos, dando início às lesões teciduais (Fortuna & Brennan, 2013). A produção de autoanticorpos causa a formação de imunocomplexos, os quais se depositam nos tecidos e ativam o sistema complemento, caso não sejam removidos há o desencadeamento da resposta inflamatória, causando o dano tecidual (Kytтары et al, 2010). Essa hipótese foi confirmada uma vez que diversos componentes do sistema complemento se mostraram alterados e tiveram seus genes associados com a susceptibilidade ao LES. Indivíduos com deficiência de C1, C2 ou C4 apresentaram um risco maior de desenvolver LES do que pessoas saudáveis. Pessoas com deficiência de C1 mostraram um risco de 90% de desenvolvimento do LES, enquanto pessoas com níveis de C2

diminuídos e total ausência de C4, mostraram um risco de 10% e 75%, respectivamente (Tsokos et al, 2011).

Estas descobertas mostram a importância do complemento tanto como primeira linha de defesa contra patógenos, quanto no processo de desenvolvimento da autoimunidade, já que o sistema complemento opsoniza os imunocomplexos, promovendo a sua remoção, prevenindo, assim, o desencadeamento de uma resposta inflamatória (Kyttaris et al., 2010).

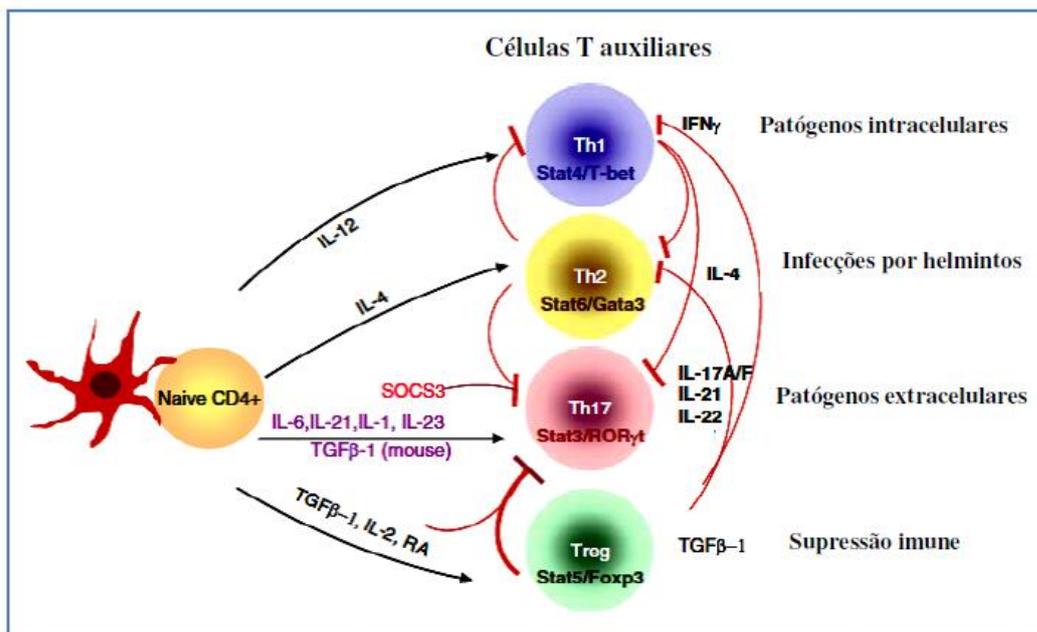
Os autoanticorpos são produzidos por células B autorreativas, as quais fazem parte do conjunto normal de células num organismo saudável. Contudo, nos pacientes com LES, essas células cumprem uma função inadequada, provavelmente devido ao seu processo de maturação defeituoso (Kyttaris et al., 2010). As células B imaturas, que normalmente reconhecem e são ativadas contra autoantígenos durante seu processo de maturação, são submetidas aos mecanismos de tolerância imunológicos, evitando a presença dessas células autorreativas em órgãos do sistema imune periférico (Yurasov et al., 2006).

Populações de células B inativas em pacientes com LES apresentam mais da metade dessas células autorreativas antes mesmo do primeiro encontro com antígenos, o que indica falhas dos pontos de verificação durante a maturação desses linfócitos, resultando em um maior número de células B autorreativas produzindo auto-anticorpos (Yurasov et al., 2005). Entretanto, as células B não têm apenas a função de produzir autoanticorpos. Tais células também podem provocar a autoimunidade promovendo a apresentação de antígenos autólogos às células T, funcionando assim como APC (Tobón et al., 2013).

Os linfócitos T, principalmente os T helper (Th), são responsáveis por estimular reações inflamatórias, secretando citocinas e recrutando mais leucócitos (Figura 4). Nas doenças autoimunes, como no LES, a interação de células T autorreativas, que fugiram dos mecanismos de autotolerância, com autoantígenos, promove a inflamação exacerbada característica dessas doenças (Abbas et al., 2008). Quando acoplado ao seu ligante, quer seja antígeno ou autoantígeno, o receptor de célula T (TCR) provoca, intracelularmente, uma cascata de sinalização, sendo que no LES, essa sinalização é precoce e amplificada (Kyttaris et al., 2010). Uma vez que o complexo CD3 do TCR é ativado, sinais intracelulares são desencadeados e

podem bloquear a transcrição do gene da IL-2, levando a uma deficiência dessa citocina e, conseqüente redução de Tregs e supressão da ativação da morte celular de células T autorreativas (Crispín et al., 2010; Lieberman et al., 2010; Tsokos et al., 2011). Linfócitos Tregs participam do controle da tolerância periférica e desordens nessas células podem contribuir para o desenvolvimento do LES. (Chavele et al., 2011) verificaram uma relação inversa entre a habilidade de supressão dos Tregs e a atividade da doença, uma vez que no LES, a ativação descontrolada das células autorreativas B e T pode ser parcialmente atribuída à defeitos nos Tregs. O desequilíbrio entre células B e T autólogas e Tregs leva à autoimunidade (Chavele et al., 2011).

**Figura 4.** Subpopulações dos linfócitos TCD4+. As funções, produção de citocinas, seus fatores de transcrição: ROR $\gamma$ t; T-bet; Foxp3; GATA-3; Stat. (Zhu et al., 2006).



Essas alterações imunológicas, tanto da imunidade inata quanto da adaptativa, contribuem, em conjunto, para a patogênese do LES. Dessa maneira, as interações entre células dendríticas, células B e T autorreativas, auxiliam na produção de autoanticorpos, no desequilíbrio das citocinas e na infiltração tecidual de células inflamatórias, provocando o surgimento das manifestações clínicas do LES (Kyttaris et al., 2010).

## 2.7 Diferenciação e Função das células Th17

Vários grupos mostraram de forma convincente que o TGF- $\beta$  e IL-6, citocinas com efeitos opostos, tem efeito sinérgico para induzir receptor nuclear órfão ROR $\gamma$ t, que coordena a expressão de IL-17A e IL-17F em células T naíve (Veldhoen et al., 2006; Bettelli et al., 2006; Mangan et al., 2006). TGF- $\beta$  é produzido em várias linhagens de leucócitos e células estromais, uma importante fonte autócrina ou parácrina de TGF- $\alpha$  para a diferenciação *in vivo* Th17 (Bettelli et al., 2006; Veldhoen et al., 2006 b; Gutcher et al., 2011). Assim, TGF- $\beta$  derivado de Treg permite a diferenciação de células Th17 quando as células T virgens são co-cultivadas com DCs. Células Th17 também podem expressar grandes quantidades de TGF- $\beta$ , e essa citocina pode atuar de uma forma autócrina para manter as células Th17 *in vivo* (Gutcher et al., 2011). Além disso, o TNF e IL-1 $\beta$  aumentam a diferenciação das células Th17 mediada por TGF- $\beta$  e IL-6 (Veldhoen et al., 2006).

A diferenciação das células T para o subconjunto Th17 é induzida quando iniciação ocorre na presença de TGF- $\beta$  e certas citocinas inflamatórias, tais como IL-1 $\beta$ , IL-6 ou IL-2. Curiosamente, tem sido proposta que a diferenciação de células naíve para este subconjunto pró-inflamatório ocorra de uma forma recíproca com o desenvolvimento de células T reguladoras (Treg) e a presença de um sinal inflamatório supõe-se que sejam o fator que determina se células pró-inflamatórias ou células supressoras são geradas (Yang et al., 2008).

As células Th17 são responsáveis por montar resposta imune contra bactérias extracelulares e fungos. Elas também estão envolvidas na geração de doenças autoimunes (Ivanov et al., 2006; Weaver et al., 2006). As principais citocinas efectoras incluem IL-17A, IL-17F, IL-21 e IL-22.

## 2.8A Citocina IL-17

A Interleucina-17 (IL-17) é produzida principalmente por células T e é importante elo entre a imunidade adaptativa mediada por células T e os componentes inflamatórios da imunidade inata, desempenhando papel essencial na resposta imune contra certas bactérias e fungos (Abbas et al., 2008).

As células produtoras de IL-17, células Th17, têm sido implicadas na patogênese de várias doenças autoimunes, incluindo o LES. O soro de indivíduos com a doença contém níveis anormalmente elevados dessa citocina e, tais pacientes, também secretam a IL-17 através de células T CD4+ e CD4-CD8- (duplo negativas) (Nalbandian et al., 2009; Crispín et al., 2010).

Pacientes com nefrite lúpica, umas das manifestações clínicas mais recorrentes nesses indivíduos, apresentam células secretoras de IL-17 em infiltrados nos rins. O aumento da produção de IL-17 está correlacionado com a atividade da doença, isto é, a liberação dessa citocina amplifica a resposta inflamatória, recrutando células efetoras aos órgãos alvos (Yang et al., 2009; Sigdel et al., 2016).

### **2.9A Citocina IL-23**

A IL-23 é expressa principalmente por células dendríticas apresentadoras de antígenos e macrófagos, composta por duas subunidades (IL-12p40 e IL-23p19). Ela é reconhecida por estimular a proliferação e manutenção de células Th17, estimuladas inicialmente por TGF- $\beta$ , IL-6 e IL-22 (Xu et al. 2010).

Apesar das muitas semelhanças estruturais das citocinas e os seus receptores e componentes de sinalização a *downstream* da família IL-12, elas possuem diferentes atividades biológicas. IL-12 e IL-23 são principalmente citocinas pró-inflamatórias e pró-estimulatórias com papéis chave no desenvolvimento dos subconjuntos Th1 e Th17 de células T respectivamente (Langrish et al., 2004; Hunter et al., 2005; Kastelein et al., 2007).

No entanto, estudos recentes revelaram que estas novas proteínas tem um papel limitado na promoção da imunidade mediada pelas células clássicas (Th1 e Th2). Sua capacidade é mais associada em estimular as células T CD4+ em produzir IL-17 que tem um papel dominante no desenvolvimento e na manutenção da inflamação autoimune (Vignali & Kuchroo, 2012).

O eixo de IL-23, IL-17 tem um papel central na inflamação autoimune. A IL-23 é necessária para a expansão de células patogênicas Th-17 e é necessária para a sua manutenção (Apostolidis et al., 2011). A IL-17 é responsável pelo o recrutamento de células inflamatórias e facilita a infiltração

de células T no local da inflamação (Kolls et al., 2004). As interações entre a IL-23 e IL-17 são essenciais não só para a fase de início, mas também para a fase avançada do LES, o qual é caracterizado pela ativação mediada por células T de osteoclastogênese (Nalbandian et al., 2009). A presença excessiva destas citocinas conduz a um desequilíbrio entre a pró-inflamatória e células T reguladoras em favor das células Th17 no LES (Yang et al., 2011).

## **2.10 A Citocina IL-27**

A Interleucina-27 é um membro da família das interleucinas 6 e 12, fazendo parte de um grupo que é fundamental em processos biológicos como crescimento neuronal, a manutenção óssea, desenvolvimento cardíaco e regulação imune. Ele é produzido por células apresentadoras de antígenos ativadas e desempenha um papel importante na regulação da diferenciação de células T CD4 + e a resposta imune. IL-27 ativa várias cascatas de sinalização, incluindo as JAK-STAT e p38 MAPK (Xia et al., 2015; Shaltout et al., 2016)

Foi demonstrado que a IL-27 previne a geração de células Th17 através da inibição de ROR $\gamma$ t, gene promotor desta linhagem celular. Nas inflamações crônicas, a IL-27 é secretada para suprimir células Th17 através da regulação de IL-17A e a indução de IL-10 (Diveu et al., 2009).

Foi demonstrado que a administração de IL-27 suprimia *in vitro* a produção de citocinas de células T ativadas (Pan et al., 2010; Stumhofer et al., 2008; Yoshimura et al., 2006). A IL-27 e o seu receptor, IL-27R (composto por WSX-1 e a glicoproteína gp130), desempenham um papel imunossupressor e na supressão da produção de citocinas pró-inflamatórias. Ambos os compostos do receptor foram encontrados expressos em células T, células B, células NK, monócitos, mastócitos, células dendríticas (DCs), e células endoteliais (Hibbert et al., 2003; Takeda et al., 2003; Artis et al., 2004; Wang et al., 2007). Coletivamente, estes resultados revelaram um novo papel para IL-27 / WSX-1 como um atenuador na produção de citocina pró-inflamatória, o que é importante para prevenir a excessiva inflamação (Yoshida et al., 2009).

## **2.11 A Citocina IL-22**

A IL-22 é um membro da família das citocinas da IL-10 e podem ser produzidos por células como os Th17, Th22, linfócitos T e as células NKT (Dudakov et al., 2015; Pan et al., 2013).

O emprego da IL-22 parece estar relacionado com a resposta imune inata epitelial e com a fisiopatologia de pele em doenças inflamatórias. Pode mediar a proliferação de queratinócitos cutâneos e hiperplasia epidérmica, tendo um papel fundamental nas doenças inflamatórias com acantose epidérmica, além do Lúpus, outras doenças podem estar relacionadas a IL-22, como esclerose sistêmica (Truch et al., 2011), Psoríase (Luan et al., 2014) e Dermatite atópica (Gittler et al., 2012; Niebuhr et al., 2011), artrite reumatóide (AR) (Konya et al., 2014), doença de Behçet, espondilite anquilosante (Qin et al., 2011).

## **2.12 O TGF- $\beta$**

O Fator de crescimento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) tem sido revelado como um regulador essencial de ambas as funções inata e adaptativa em doenças autoimunes. Uma das funções do TGF- $\beta$  é a de suprimir a inflamação (Maloy et al., 2001), pode regular as respostas das células T auto agressivas por prevenção da maturação da APC e pode inibir a diferenciação de CD4+ em células Th1 ou Th2 (Gorelik & Constant, 2002; Gorelik et al., 2002; Heath et al., 2000).

TGF- $\beta$  é produzida por células NK e tem um efeito inibidor potente na produção de IL6, IL-1 e TNF $\alpha$ , citocinas envolvidas na patogênese do LES, por macrófagos in vitro. TGF- $\beta$  suprime a secreção IgG por linfócitos B de através de co-estimulação de células CD8 + com IL-2 (Horwitz et al., 1997).

O TGF- $\beta$  tem um papel importante no controle da autoimunidade. No LES, além de um aumento nos mediadores inflamatórios com atividade da doença, são diminuídas vias reguladoras, incluindo diminuição de TGF- $\beta$  (Becker et al., 2010) e o potencial de alteração de populações de células T (Alexander et al., 2013; Golding et al., 2013) e ou a atividade (Vargas et al., 2008), sugerindo um desequilíbrio entre mediadores inflamatórios e de

regulação (Ma et al., 2010), o que pode associar a susceptibilidade à doença, atividade e danos em órgãos no LES (Dijke et al., 2004; Letterio et al., 1998).

*Objetivos*

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar os níveis séricos das citocinas IL-17, IL-22, IL-23p19, IL-27 e TGF- $\beta$  para um melhor entendimento do lupus eritematoso sistêmico.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Avaliar os níveis séricos de IL-17, IL-22, IL-23p19, IL-27 e TGF- $\beta$ , em pacientes com LES e indivíduos saudáveis;
- Verificar a associação das citocinas IL-17, IL-22, IL-23p19, IL-27 e TGF- $\beta$  com a atividade da doença;
- Verificar a associação das citocinas IL-17, IL-22, IL-23p19, IL-27 e TGF- $\beta$  com as manifestações clínicas do LES.

*Metodologia*

## **4. METODOLOGIA**

### **4.1 Local do estudo**

Os pacientes foram recrutados no ambulatório de Reumatologia do Hospital das Clínicas (HC) da Universidade Federal de Pernambuco (HC-UFPE) e o estudo foi realizado no NUPIT-SG (Núcleo de Pesquisa em Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas Suely Galdino) / LINAT (Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas).

### **4.2 População alvo**

Foram selecionados 81 pacientes de ambos os sexos portadores de Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES), atendidos no ambulatório de Reumatologia do HC-UFPE. Todos os pacientes tinham idade  $\geq 18$  anos e preencherem os critérios de classificação do ACR (American College of Rheumatology) para LES. Foram selecionados também 34 voluntários sadios que constituíram o grupo controle.

### **4.3 Coleta de dados**

Após esclarecimentos sobre o projeto de pesquisa, aqueles que concordaram quanto às propostas foram convidados a participar do estudo, com inclusão dos mesmos apenas após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (CEP/CCS/UFPE N<sup>o</sup>145/09) (Anexo A). Uma via do TCLE ficou sob posse do paciente e a segunda via com a equipe de pesquisadores.

Os pacientes foram submetidos a uma avaliação clínica detalhada, com coleta de dados demográficos e referentes à doença e ao tratamento, para preenchimento de ficha clínica específica (Apêndice C). No mesmo dia da coleta de sangue foi aplicado o escore de SLEDAI (*Systemic Lupus Erythematosus Diseases Activity Index*) (Anexo B) para avaliação da atividade da doença (Gladman et al., 2002.) e o SLICC/ACR-D (*Systemic Lupus International Collaborating Clinic/ACR Damage Index for Systemic Lupus Erythematosus*) (Anexo C) para avaliação do dano cumulativo (Gladman et al., 1997). Foram excluídos todos os pacientes sob tratamento de

pulsoterapia com glicocorticoide há menos de 30 dias ou pulsoterapia com ciclofosfamida há menos de três meses ou dose atual de prednisona  $\geq 1$  mg/kg/dia e diagnóstico de infecção no momento da coleta. Os pacientes foram subdivididos, de acordo com os escores de SLEDAI, em ativos (SLEDAI $\geq 6$ ) e remissão (SLEDAI $<6$ ).

O grupo controle consta de 34 voluntários saudáveis, pareados por idade, sem diagnóstico de outra doença reumatológica imunoinflamatória ou de imunodeficiências, escolhidos aleatoriamente no HC-UFPE. Todos os voluntários foram informados previamente sobre os procedimentos e objetivos do estudo e só foram incluídos na pesquisa após leitura e assinatura do TCLE.

#### **4.4 Determinação de citocinas**

Pacientes com LES e voluntários sadios foram submetidos à coleta de 8 mL de sangue em veia periférica, que foi imediatamente processado para coleta do soro, as amostras foram divididas em alíquotas e armazenadas congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  até à utilização. As citocinas (IL-17A, IL-22, IL-23p19, IL-27 e TGF- $\beta$ ) no soro dos pacientes e dos controles foram quantificadas por ELISA sanduíche (*Enzyme-linked immunosorbent assay*), seguindo as informações recomendadas pelos fornecedores (Biosciences BD). A Absorvância utilizada foi a diferença entre 570 e 450 nm. O limite de detecção dos kits de ELISA utilizados no experimento foram 3.9pg / mL para IL-17A, 15.63pg / mL para IL-22, 15.62 pg / mL para IL-23p19, 62.5 pg / mL para IL-27 and 7.81 pg / mL para TGF- $\beta$ . Quanto a dosagem dos fatores do complemento (C3, C4 e CH50) e anti-DNA as amostras foram enviadas para análise no laboratório Marcelo Magalhães utilizando os seguintes métodos: imunoturbidimétrico – COBAS 6000 para C3 e C4 ( imunohemolise para CH50), de acordo com os critérios ACR para classificação do LES.

#### 4.5 Análise estatística

Foram realizadas as análises estatísticas por meio do GraphPad PRISM 6.01 software. Os resultados foram expressos como mediana, máxima e mínima (max-min) para dados não paramétricos. Média e desvio padrão foram utilizadas para amostras de distribuição normal e o teste de D'Agostino foi aplicado para avaliar a normalidade das amostras. O teste de Mann-Whitney foi utilizado para dados não paramétricos comparados em dois grupos, ordinais e não pareados. O teste de regressão linear de Pearson foi utilizado para verificar as correlações das citocinas mensuradas com os dados clínicos. Para dados não paramétricos, a correlação de Spearman foi utilizada, julgando a força da correlação pelo valor de  $R^2$  sendo:  $0 < R^2 \leq 0,35$  = correlação fraca;  $0,35 < R^2 \leq 0,67$  = correlação moderada;  $0,67 < R^2 \leq 1$  = correlação forte. Para as associações e correlações citadas, foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor de  $p \leq 0,05$ . Para a regressão linear múltipla, foram realizadas as análises por meio do STATA/SE 13.0, utilizando o modelo PROBIT. Foi aceita significância estatística quando  $p \leq 0,05$ .

## *Resultados e Discussão*

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Características clínicas dos pacientes com LES

Foram avaliados 81 pacientes com idade média de 36,7 (20-65) anos, sendo 33,3% classificados com doença ativa (SLEDAI $\geq$ 6), dos 34 voluntários a idade média foi de 39,6 (22 - 55). Os dados demográficos dos pacientes, as características da doença e os tratamentos atuais no momento da inclusão do estudo estão resumidos na Tabela 1.

**Tabela 1:** Características demográficas e clínicas:

<b>Parametros clínicos</b>	<b>Data</b>
<b>Grupo controle, n</b>	34
Idades (anos) (min-max)	39,6 (22 – 55)
Masculino	2
Feminino	32
<b>Pacientes (Grupo LES), n</b>	81
Idades (anos) (min-max)	36,75 (20 – 65)
Masculino	3
Feminino	78
<b>SLEDAI</b>	
>6	27 (33,3%)
$\leq$ 6	54 (66,7%)
<b>Tratamento</b>	
Pred	67
Antimalarico	54
Aza	26
MMF	21
<b>Nefrite</b>	
Ativo	16 (19,7%)
Inativo	65 (80,3%)
<b>Proteinuria</b>	20 (24,7%)
<b>Alopecia</b>	15 (18,5%)

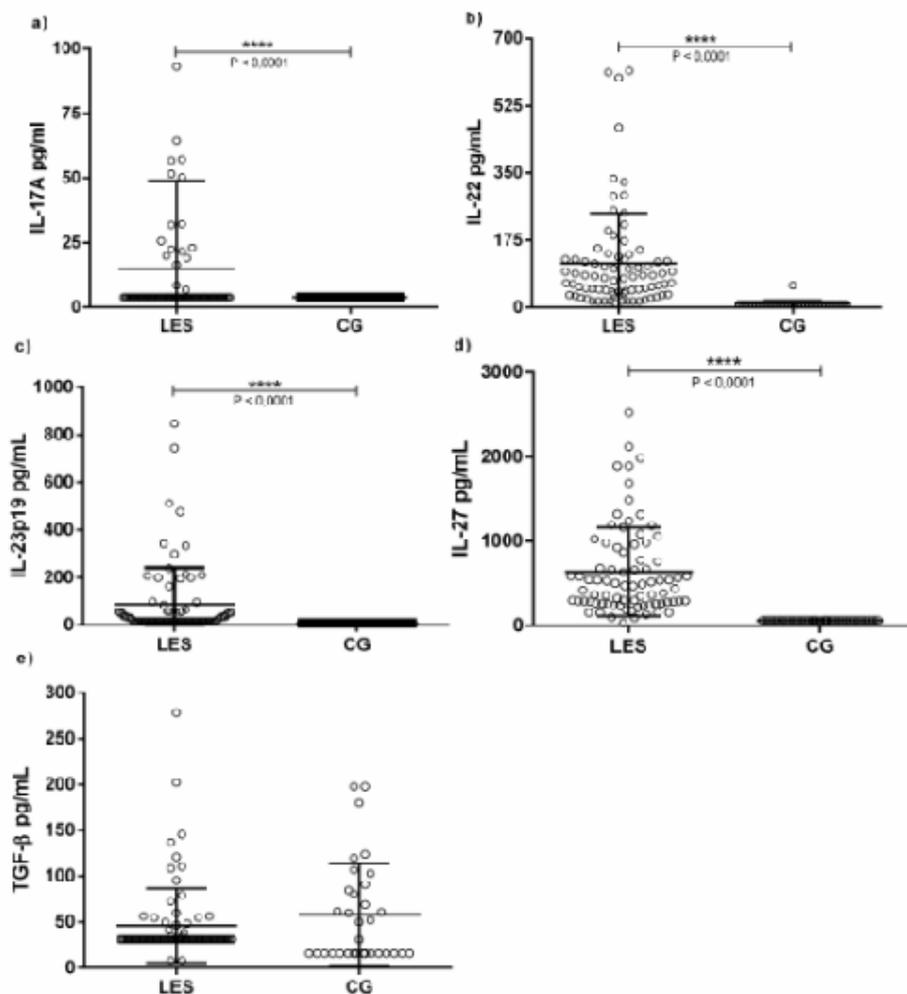
\*Pred –prednisona, AZA – azatioprina, MMF – micofenolato de mofetila.

### 5.2 Pacientes com LES apresentam alterações nos níveis séricos de IL-17, IL-22, IL-23p19 e IL-27.

Pacientes com LES apresentaram níveis séricos de IL-17 com mediana de 3,90 (3,90 – 1202,20pg/mL) ( $p < 0,0001$ ), IL-22 mediana de 80,24 (10,82 – 735,75 pg/mL) ( $p < 0,0001$ ), IL-23p19 mediana de 16,00 (15,63 – 1630,29 pg/mL)

( $p < 0,0001$ ) e IL-27 mediana de 494,00 (31,22 – 2794,00 pg/mL) ( $p < 0,0001$ ) mais elevados do que o grupo controle IL-17 = 3,19 (3,90 – 3,92 pg/mL), IL-22 = 7,81 (7,81 – 57,26 pg/mL), IL-23p19 = 7,8125 (7,81 – 10,40 pg/mL) e IL-27 = 62,5 (62,00 – 63,00 pg/mL), respectivamente. Em análise equivalente, os níveis de TGF- $\beta$  encontrados nos pacientes com LES, mediana de 31,25 (7,81 – 7022,40) e controles com mediana de 40,5 (15,63 – 798,00 pg/mL) não divergiram (Figura 5).

**Figura 5:** Alteração nos níveis séricos de IL-17, IL-22, IL-23p19, IL-27 e TGF- $\beta$ .



### **5.3 Análise dos níveis de IL-17, IL-22, IL-23p19, IL-27 e TGF- $\beta$ de acordo com a atividade do LES**

As análises de correlação linear univariada não demonstraram diferença nos níveis séricos de IL-17, IL-22, IL-23p19, IL-27 e TGF- $\beta$  quando comparados os pacientes com doença ativa SLEDAI  $\geq 6$  e o grupo com SLEDAI  $< 6$  ( $p > 0,05$ ) (Tabela 2).

No entanto, a análise de correlação multivariada mostrou correlação negativa entre TGF- $\beta$  e SLEDAI  $\geq 6$  ( $p = 0,04$ ) (Tabela 3).

### **5.4 IL-22 e IL-27 aumentaram em pacientes com LES e alopecia**

Em análises específicas, primeiramente univariadas e, posteriormente, multivariadas, em relação à alopecia em pacientes com LES, foram encontradas associações positivas. Níveis séricos elevados de IL-22 foram descritos em pacientes com LES quando comparados com pacientes sem alopecia ( $p = 0,04$ ). Além disso, análises multivariadas demonstraram que a probabilidade da alopecia aumentar com aumento dos níveis séricos de IL-22 ( $p < 0,001$ ). Em relação aos níveis de IL-27, houve associação negativa significativa com a análise multivariada ( $p = 0,004$ ), quanto maior o aumento do nível de IL-27, menor a probabilidade de alopecia. No entanto, outras citocinas avaliadas não variaram significativamente (Tabela 2 e 3).

### **5.5 Os níveis IL-27 e TGF- $\beta$ são mais baixos em pacientes com LES e nefrite**

Os pacientes com nefrite apresentaram níveis séricos baixos de IL-27 ( $p = 0,022$ ) em relação ao grupo de pacientes que não apresentavam esta condição. Além disso, análises multivariadas apresentaram correlação negativa significativa entre nefrite e IL-27 ( $p = 0,02$ ). Em relação ao TGF- $\beta$  ( $p = 0,05$ ), observou-se correlação significativamente negativa exclusivamente em análises multivariadas. (Tabelas 2 e 3). No entanto, os níveis séricos de outras citocinas avaliadas não variaram significativamente nos grupos com e sem nefrite.

**Tabela 2:** Correlação entre as manifestações clínicas e citocinas no LES

Comorbidades/Citocina	IL-17A	IL-22	IL-23p19	IL-27	TGF- $\beta$
<b>Nefrite</b>	0,216	0,527	0,233	0,022*	0,750
<b>Proteinuria</b>	0,308	0,855	0,397	0,091	0,212
<b>Alopecia</b>	0,525	0,049*	0,901	0,186	0,757
<b>C3</b>	0,815	0,846	0,149	0,022*	0,0006*
<b>C4</b>	0,270	0,328	0,347	0,050	0,039*
<b>Anti-DNA</b>	0,977	0,344	0,075	0,523	0,903

\*Nível de significância =  $p \leq 0.05$  (Análise univariada)

**Tabela 3:** Associação da atividade das citocinas IL-22, IL-27 e TGF- $\beta$  com as manifestações clínicas no LES

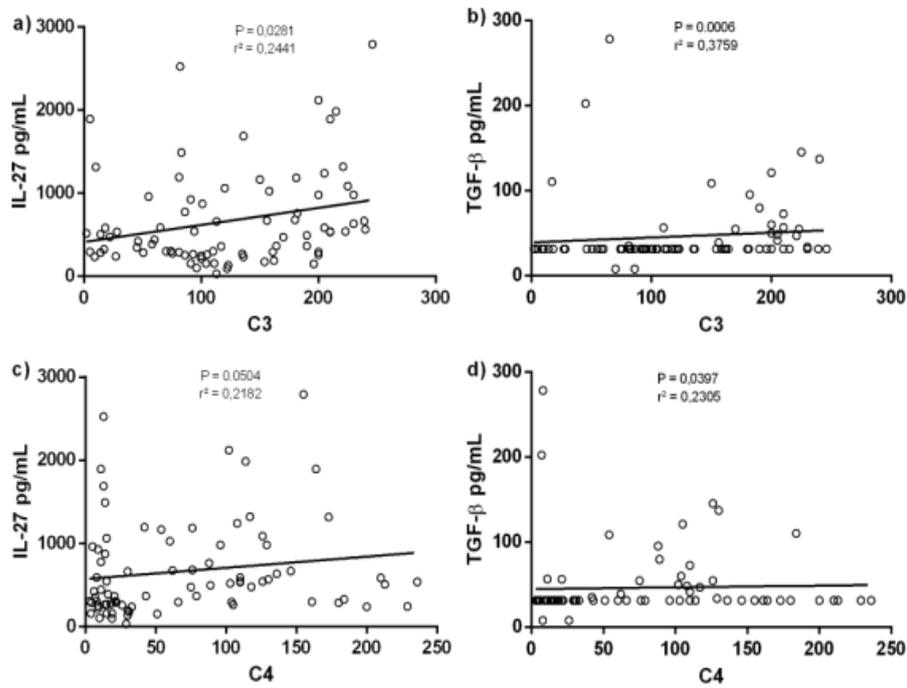
	<b>Nefrite</b>		<b>Proteinuria</b>		<b>Alopecia</b>		<b>Anti-DNA</b>		<b>Sledai<math>\geq</math>6</b>	
	Coef	p	Coef	p	Coef	p	Coef	p	Coef	p
<b>Constante</b>	-0,23137	0,71	0,15715	0,77	0,06445	0,38	0,76763	0,20	0,98628	0,09
<b>IL-22</b>	0,00084	0,38	9.91e-06	0,99	0,00357	0,00*	0,00058	0,56	-0,00008	0,93
<b>IL-27</b>	-0,00126	0,02*	-0,00053	0,12	-0,00161	0,004*	0,00020	0,43	-0,00032	0,26
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	-0,00017	0,05*	-0,00028	0,19	-0,00003	0,75	-0,00016	0,12	-0,00020	0,04*

\*Nível de significância =  $p \leq 0.05$  (Análise multivariada)

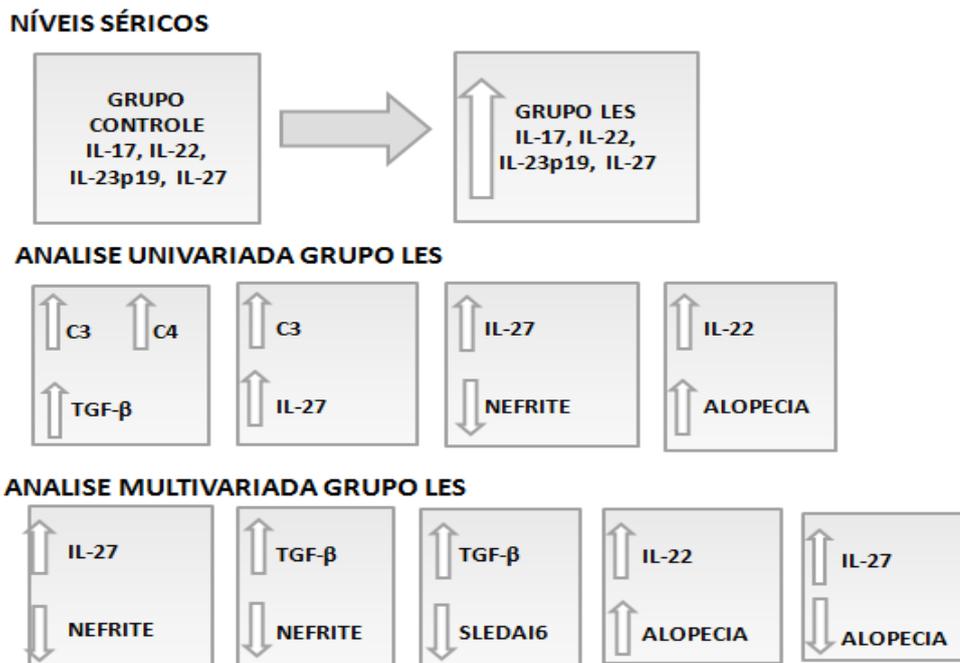
## 5.6 IL-27 e TGF- $\beta$ correlacionaram-se com níveis séricos de C3 e C4

Na análise univariada, os níveis séricos de IL-27 detectados no grupo LES apresentaram correlação positiva com C3 ( $p = 0,02$ ). Adicionalmente, o TGF- $\beta$  também apresentou correlação positiva com C3 ( $p = 0,0006$ ) e C4 ( $p = 0,03$ ). Não houve correlação entre as outras citocinas avaliadas (Figura 6).

**Figure 6:** Alterações com IL-27 e TGF- $\beta$  no grupo com LES comparado com C3 e C4



**Figura 7:** Resumo dos resultados obtidos no estudo



## Discussão

O presente estudo demonstrou que em comparação com o grupo controle, houve um aumento das citocinas IL-17, IL-22, IL-23p19, no grupo do LES, o que corrobora com trabalhos já descritos na literatura (Abou et al., 2012; Wong et al., 2008). No entanto em relação ao IL-27 nosso trabalho mostrou um aumento da citocina em relação ao controle, em outros trabalhos descritos ocorreu o contrario com a diminuição da citocina no grupo LES, isso pode ser explicado pela gravidade da doença no grupo LES nesses trabalhos, com pacientes mais graves a tendência seria menor presença da citocina IL-27(Li et al., 2010; Gaber et al., 2012;), já com o TGF- $\beta$  não foi significativamente diferente entre os grupos (Jin et al., 2012; Metawie et al., 2015). Correlacionando a via Th17, em especial as citocinas estudadas na patogênese do LES.

Evidências sugerem que a IL-22 desempenha um papel importante na patogênese de doenças autoimunes e inflamatórias (Wolk et al., 2006; Wolk et al., 2007; Ikeuchi et al., 2005). No LES o envolvimento cutâneo é muito comum, afetando até 90% dos pacientes.

Nosso estudo demonstrou aumento dos níveis sanguíneos da IL-22 em pacientes com LES quando comparados a controles sadios e uma correlação significativa entre a IL-22 e alopecia, evidenciando os dados da literatura, indicando a participação desta citocina na patogênese do LES, mais não houve correlação com outras manifestações clínicas. No entanto, o mecanismo exato do papel da IL-22 no desenvolvimento e patogênese do LES não foram ainda elucidados. Alopecia é frequentemente associada à atividade da doença, mas pode ocasionar cicatrizes quando associada a lesões discoides (Manson et al., 2006; Rahman et al., 2008; Kuhn et al., 2011).

A função da IL-22 parece estar relacionada com a resposta imune inata epitelial e com a fisiopatologia de pele em doenças inflamatórias. Pode mediar a proliferação de queratinócitos cutâneos e hiperplasia epidérmica, tendo um papel fundamental nas doenças inflamatórias com acantose epidérmica, além do Lúpus, outras doenças podem estar relacionadas a IL-22, como esclerose sistêmica (Truchetet et al., 2011), Psoríase (Luan et al., 2014) e Dermatite

atópica(Niebuhr et al., 2011; Gittler et al., 2012), artrite reumatóide (AR) (Konya et al., 2014), doença de Behçet, espondilite anquilosante (Qin et al., 2011).

Seu papel na patogênese do LES ainda é controverso com diferentes resultados descrito na literatura. Nosso estudo demonstrou aumento dos níveis de IL-22, assim como em outros trabalhos descritos (Pan et al., 2013; Zhao et al., 2013; Zhao et al., 2014). Entretanto, alguns estudos encontraram níveis sanguíneos da IL-22 diminuídos em pacientes com LES quando comparados a controles sadios (Cheng et al., 2009; Pan et al., 2009), isso se deva talvez ao tempo da doença e gravidade no grupo de pacientes com LES. Outros trabalhos descreveram que IL-22 apresentaram correlação positiva com nefrite e com escores de SLEDAI, sugerindo sua participação na patogênese da doença (Qin et al., 2011).

Em relação à citocina IL-27, o presente estudo obteve correlação significativa entre o aumento da citocina e o C3, já em relação à alopecia houve uma correlação negativa, com a redução da probabilidade da ocorrência da alopecia com o aumento da citocina IL-27. A análise estatística também evidenciou significância com a redução da probabilidade de nefrite no grupo com Lupus, com o aumento da IL-27, demonstrando uma ação protetora, resultado também encontrado em outros estudos (Xia et al., 2015; Duarte et al., 2013).

O papel da citocina na resposta imune não é totalmente compreendido desde respostas pró e anti-inflamatórias já foram descritas. Em geral, a atividade pró / anti-inflamatório de IL-27 é influenciado pelas vias efetoras imunes subjacentes, a fase da doença, a presença ou ausência de citocinas contra-reguladores / subconjuntos de células T, e do tipo de tecido / célula em estudo. Apesar dos resultados de um espectro de várias doenças auto-imunes, na maior parte os efeitos anti-inflamatórias e imunomoduladoras de IL-27 foram observados nesta categoria de doenças (Xia et al., 2015; Meka et al., 2015).

Há evidências que WSX-1(subunidade do receptor da IL-27) pode inibir o processo inflamatório através de IL-10, via células CD4+, via STAT-1 e STAT-3(Stumhofer et al., 2006; Kido et al., 2011). Além disso, estudos mostram que IL-27 suprime citocinas pró-inflamatórias, como IL-2, IL-6 e IL-17(Batten et al., 2007).

No nosso estudo houve aumento da IL-17 nos pacientes com LES em comparação ao controle. Outros estudos demonstraram que a produção de IL-17, por células Th17, foi reduzida devido à presença de IL-27. A correlação foi realizada com camundongos deficientes de IL-27R onde ocorreu maior frequência da produção de células Th17 em presença de TGF- $\beta$  e IL-6 (Bettelli et al., 2006; Stumhofer et al., 2006).

Foi demonstrado também que a IL-27 previne a geração de células Th17 através da inibição de ROR $\gamma$ t, gene promotor desta linhagem celular. Nas inflamações crônicas, IL-27 é secretada para suprimir células Th17 através da regulação de IL-17A e a indução de IL-10 (Diveu et al., 2009).

Em relação ao TGF- $\beta$  nosso estudo não encontrou alteração significativa entre o grupo controle e LES, dado encontrado também em outros estudos (Maryam et al., 2006; Liu et al., 2015). No entanto em nosso estudo obteve correlação significativa entre o aumento entre TGF- $\beta$  e C3, C4, anti-DNA, também análise estatística significativa com a redução da probabilidade de nefrite no grupo com Lupus, redução do escore do SLEDAI 6 com o aumento do TGF- $\beta$ , demonstrando uma ação protetora (Horwitz et al., 1997).

O papel protetor do TGF- $\beta$  no lúpus pode ser observado também através de um modelo knock out para TGF- $\beta$ . Esse modelo apresentou as características clássicas dos pacientes com lúpus como, por exemplo, ambos atingem múltiplos órgãos em doenças inflamatórias; produção de auto-anticorpos (anticorpos anti-Sm e anti-ds DNA) é detectada em ambas as doenças; e há a ativação espontânea de células T auto-reactivas (Ohtsuka et al., 1998).

TGF- $\beta$  é produzida por células NK e tem um efeito inibidor potente na produção de IL6, IL-1 e TNF $\alpha$ , citocinas envolvidas na patogênese do LES, por macrófagos in vitro. TGF- $\beta$  suprime a secreção IgG por linfócitos B de através de co-estimulação de células CD8 + com IL-2. Os níveis de TGF $\beta$  são mais baixos em pacientes com LES e esta é provavelmente por causa dos altos níveis de IL-10 que suprimem a produção de TGF- $\beta$  por NK. Parece que a elevada produção de IgG, observada em pacientes com LES, é atribuível, em parte, a baixos níveis de TGF- $\beta$  e a supressão inadequada da produção de IgG (Horwitz et al., 1997).

TGF- $\beta$  tem sido revelado como um regulador essencial de ambas as funções inata e adaptativa em doenças auto-imunes. Uma das funções do

TGF- $\beta$  é a de suprimir a inflamação (Maloy et al., 2001), pode regular as respostas das células T auto agressivas por prevenção da maturação da APC e pode inibir a diferenciação de CD4+ em células Th1 ou Th2 (Gorelik & Flavell., 2002; Gorelik et al., 2002; Heath et al., 2000).

A concentração sérica de TGF- $\beta$ 1 é diminuída em pacientes com LES ativo, e os níveis de TGF- $\beta$ 1 urinário são aumentados em pacientes com nefrite (Xing et al., 2011; Hammad et al., 2006). Estudos descritos na literatura obtiveram redução do TGF $\beta$ 1 do grupo do lúpus quando comparado ao controle, nesse mesmo estudo os níveis totais de TGF- $\beta$ 1 foram menores nos pacientes com alta atividade da doença (SLEDAI > 10). Os níveis totais de TGF- $\beta$ 1 foram menores em pacientes com LES com alta atividade da doença e danos graves em órgãos. A gravidade do dano renal foi associado com os níveis séricos reduzidos de total de TGF- $\beta$ 1, sugerindo que o TGF- $\beta$ 1 pode estar envolvida na patogénese da lesão renal causada por nefrite lúpica (Jin et al., 2012; Metawie et al., 2015).

*Conclusão*

## 6. CONCLUSÃO

- Aumento dos níveis séricos das citocinas IL-17, IL-22, IL-23p19 e IL-27 em comparação ao grupo controle, não havendo alteração com o TGF- $\beta$ .
- De acordo com a atividade do LES avaliada pelo SLEDAI 6 as análises demonstraram correlação com o TGF- $\beta$ , quanto maior a concentração da citocina menor probabilidade do SLEDAI>6.
- Não foi encontrado associação entre os níveis das citocinas IL-27 e TGF- $\beta$  correlacionaram-se com níveis séricos de proteínas do complemento (C3) e com pacientes LES com nefrite, a relação com C4 somente ocorreu com TGF- $\beta$ .
- Associação com alopecia ocorreu positivamente com IL-22 e negativamente com IL-27.
- Uma melhor compreensão das citocinas e importância na resposta imune irá permitir a criação de novos marcadores e agentes terapêuticos úteis no diagnóstico precoce e tratamento melhorado de LES.

*Perspectivas*

## **7. PERSPECTIVAS**

- Dosar estas citocinas, IL-17, IL-22, IL-23p19, IL-27 e TGF- $\beta$ , em outras doenças autoimunes para avaliar a possibilidade destas como marcadores do LES.
- Realizar a fenotipagem das células produtoras das citocinas, IL-17, IL-22, IL-23p19, IL-27 e TGF- $\beta$ .

## *Referências*

## REFERÊNCIAS

- Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia celular e molecular*. 6ª Ed. Elsevier.2008; 4-5.
- Abou Ghanima AT, Elolimy GG, Ganeb SS, Abo Elazem AA, Abdelgawad ER. Role of T helper 17 cells in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Egypt J Immunol*. 2012;19:25-33.
- Abdel-Nasser AM, Ghaleb RM, Mahmoud JA, Khairy W, Mahmoud RM. Association of anti-ribosomal P protein antibodies with neuropsychiatric and other manifestations of systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol*. 2008; 27:1377-1385.
- Afkarian M, Sedy JR, Yang J, Jacobson NG, Cereb N, Yang SY, Murphy TL, Murphy KM. T-bet is a STAT1- induced regulator for IL-12R expression in naïve CD4+ T cells. *Nat. Immunol*.2002; 3:549–557.
- Alarcon S D, Alarcon ME, Cardiel MH, Caeiro F, Massardo L, Villa AR, Pons BA. Familial aggregation of systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, and other autoimmune diseases in 1,177 lupus patients from the GLADEL cohort. *Arth.& Rheum*.2005; 52:4.
- Alexander T, Sattler A, Templin L, Kohler S, Gross C, Meisel A, et al. Foxp3+ Helios+ regulatory T cells are expanded in active systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*. 2013; 72:1549– 1558.
- Angan PR, Harrington LE, O'Quinn B, Helms WS, Bullard C, Elson CO, Hatton RD, Wahl SM, Schoeb TR, Weaver CT. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature*.2006; 441:231–234.
- Apostolidis SA, Lieberman L, Kis-Toth K, Crispin JC, Tsokos G. The dysregulation of cytokine networks in systemic lupus erythematosus. *J Interf Cytok Res*. 2011; 31: 769–779

- Apostolidis SA, Crispín JC, Tsokos GC. IL-17-producing T cells in lupus nephritis. *Lupus* 2011; 20: 120–124.
- Arinuma Y, Yanagida T, Hirohata S. Association of cerebrospinal fluid anti-NR2 glutamate receptor antibodies with diffuse neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2008; 58:1130-1135.
- Arnett FC, Reichlin M. Lupus hepatitis: an under-recognized disease feature associated with autoantibodies to ribosomal P. *Am J Med.* 1995; 99:465-472.
- Artis D, Villarino A, Silverman M. The IL-27 receptor (WSX-1) is an inhibitor of innate and adaptive elements of type 2 immunity. *Journal of Immunology.* 2004; 173:5626–5634.
- Askanase A, Shum K, Mitnick H. Systemic lupus erythematosus: an overview. *Soc Work Health Care.* 2012; 51:576-586.
- Aune TM, Collins PL, Chang S. Epigenetics and T helper 1 differentiation. *Immunology.* 2009; 126:299–305.
- Bachen EA, Chesney MA, Criswell LA. Prevalence of mood and anxiety disorders in women with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2009; 61:822-829.
- Badsha H, Teh CL, Kong KO, et al. Pulmonary hemorrhage in systemic lupus erythematosus. *Semin Arthritis Rheum.* 2004; 33:414-421.
- Beck LH Jr, Salant DJ. Treatment of membranous lupus nephritis: where are we now? *J Am Soc Nephrol.* 2009; 20:690-691.
- Becker A, Eilertsen GO, Nossent JC. Levels of Transforming Growth Factor- $\beta$  Are Low in Systemic Lupus Erythematosus Patients with Active Disease. *J Rheumatol.* 2010.

Bernatsky S, Boivin JF, Joseph L, Manzi S, Ginzler E, Gladman DD, et al. Mortality in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.*2006; 54:2550-2557.

Bertsias GK, Salmon JE, Boumpas DT. Therapeutic opportunities in systemic lupus erythematosus: state of the art and prospects for the new decade. *Ann Rheum Dis* 2010; 69:1603-1611.

Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL, Kuchroo VK. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature.*2006; 441:235–238.

Batten M, Ghilardi N. The biology and therapeutic potential of interleukin 27. *J Mol Med (Berl).*2007; 85:661-672.

Boehm U, Klamp T, Groot M and Howard JC. Cellular responses to interferon gamma. *Annual Review of Immunology.*1997; 15:749–795.

Bombardier C, Gladman DD, Urowitz MB, et al. Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE. *Arthritis Rheum.*1992; 35:630-640.

Borba EF, Brenol JCT, Latorre LC, et al. Consensus of systemic lupus erythematosus. *Rev Bras Reum.* 2008; 48:196-207.

Borchers AT, Naguwa SM, Shoenfeld Y and Gershwin ME. The epidemiology of systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity reviews* 2010; 9:277–287.

Boumpas DT, Austin HA, 3rd, Fessler BJ, et al. Systemic lupus erythematosus: emerging concepts. Part 1: Renal, neuropsychiatric, cardiovascular, pulmonary, and hematologic disease. *Ann Intern Med.* 1995; 22:940-950.

Briani C, Lucchetta M, Ghirardello A, Toffanin E, Zampieri S, Ruggiero S, et al. Neurolupus is associated with anti-ribosomal P protein antibodies: an inception cohort study. *J Autoimmun.*2009; 32:79-84.

Buyon JP, Clancy RM. Maternal autoantibodies and congenital heart block: mediators, markers, and therapeutic approach. *Semin Arthritis Rheum.*2003; 33:140-154.

Castellino G, Corallini F, Trotta F, Secchiero P. Elevated levels of TRAIL in systemic lupus erythematosus are associated to the presence of anti-SSA/SSB antibodies. *Lupus.*2007; 16:479-482.

Cervera R, Khamashta MA, Font J, et al. Morbidity and mortality in systemic lupus erythematosus during a 10-year period: a comparison of early and late manifestations in a cohort of 1,000 patients. *Medicine (Baltimore).* 2003;82:299-308.

Chakravarty EF, Bush TM, Manzi S, et al. Prevalence of adult systemic lupus erythematosus in California and Pennsylvania in 2000: estimates obtained using hospitalization data. *Arthritis Rheum.*2007; 56:2092-2094.

Chan OT, Madaio MP, Sholmchik MJ. The central and multiple roles of B cells in lupus pathogenesis. *Immunol Rev.* 1999; 169: 107-121.

Chavele KM and Ehrenstein MR. Regulatory T-cells in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis.*FEBS letters.*2011; 585: 3603–3610.

Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, McGrady G, Wahl SM. Conversion of peripheral CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> naive T cells to CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells by TGF- $\beta$  induction of transcription factor foxp3. *Journal of Experimental Medicine.*2008; 198:1875– 1886.

Cheng F, Guo Z, Xu H, Yan D, Li Q. Decreased plasma IL22 levels, but not increased IL17 and IL23 levels, correlate with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis.* 2009; 68:604-6.

Chiang EY, Kolumam GA, Yu X, Francesco M, Ivelja S, Peng I, Gribling P, Shu J, Lee WP, Refino CJ et al. Targeted depletion of lymphotoxin-a-expressing

TH1 and TH17 cells inhibits autoimmune disease. *Nature Medicine*.2009; 15:766–773.

Chindalore V, Neas B, Reichlin M. The association between anti-ribosomal P antibodies and active nephritis in systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol Immunopathol*. 1998; 87:292-296.

Chogle AR, Chakravarty A. Cardiovascular events in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis: emerging concepts, early diagnosis and management. *J Assoc Physicians India*.2007; 55:32-40.

Choi J, Kim ST, Craft J. The pathogenesis of systemic lupus erythematosus-an update.*Current opinion in immunology*.2012; 24:651–657.

Choi SC, Morel L. B cell contribution of the CD4+ T cell inflammatory phenotypes in systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity*. 2017; 50: 37-41.

Chrousos GP. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation.*N Engl J Med*. 1995; 332:1351-1362.

Chun HY, Chung JW, Kim HA, et al. Cytokine IL-6 and IL-10 as biomarkers in systemic lupus erythematosus. *J Clin Immunol*.2007; 27:461-466.

Crispín JC, Liossis SN, Kis-Toth K, Lieberman LA, Kyttaris VC, Juang YT, Tsokos GC. Pathogenesis of human systemic lupus erythematosus: recent advances. *Trends in molecular medicine*.2010; 16:47–57.

Crispín JC, Oukka M, Bayliss G, Cohen RA, Van Beek CA, Stillman IE, Kyttaris VC, Juang YT, Tsokos GC. Expanded double negative T cells in patients with systemic lupus erythematosus produce IL-17 and infiltrate the kidneys. *The Journal of Immunology*.2008; 181:8761–8766.

Crispín JC, Tsokos GC. Pathogenesis of lupus. In: Hochberg MC; Silman AJ, Smolen JS, Weinblatt ME, Weisman MH editors. *Textbook of Rheumatology* 5ed., Philadelphia; Elsevier, 2011.

Cronin ME. Musculoskeletal manifestations of systemic lupus erythematosus. *Rheum Dis Clin North Am.* 1988; 14:99- 116.

D'Cruz DP, Khamashta MA, Hughes GR. Systemic lupus erythematosus. *Lancet.* 2007; 369:587-596.

DeGiorgio LA, Konstantinov KN, Lee SC, Hardin JA, Volpe BT, Diamond B. A subset of lupus anti-DNA antibodies cross-reacts with the NR2 glutamate receptor in systemic lupus erythematosus. *Nat Med.* 2001; 7:1189-1193.

Del Prete G. Human Th1 and Th2 lymphocytes: their role in the pathophysiology of atopy. *Allergy.* 1992; 47:450–455.

Diehl S and Rincón M. The two faces of IL- on Th1/Th2 differentiation,” *Molecular Immunology.* 2002;39: 531–536.

Diehl S, Anguita J, Hoffmeyer A, Zapton T, Ihle JN, Fikrig E, Rincón M. Inhibition of Th1 differentiation by IL-6 is mediated by SOCS1. *Immunity.* 2000; 13:805–815.

Dijke P, Hill CS. New insights into TGF-beta-Smad signalling. *Trends Biochem Sci* 2004; 29: 265–273.

Diveu C, Mcgeachy MJ, Boniface K, Stumhofer JS, Sathe M, Joyce-shaikm B, Chen Y, Tato CM, Mcclanahan TK, De wall, Malefyt R, Hunter CA, Cua DJ, Kastelein RA. IL-27 blocks RORc expression to inhibit lineage commitment of Th17 cells. *J Immunol.* 2009; 182:5748-5756.

Djuretic IM, Levanon D, Negreanu V, Groner Y, Rao A, Ansel KM. Transcription factors T-bet and Runx3 cooperate to activate Ifng and silence Il4 in T helper type 1 cells. *Nature Immunology.* 2007; 8:145–153.

Duarte AL, Dantas AT, de Ataíde Mariz H, Santos FA, Silva JC, Rocha LF Jr, Galdino SL, Galdino da R P M. Decreased serum interleukin 27 in Brazilian systemic lupus erythematosus patients. *Mol Biol Rep.* 2013; 40:4889-9

- Dubois EL, Tuffanelli DL. Clinical manifestations of systemic lupus erythematosus. Computer analysis of 520 cases. *JAMA*. 1964; 190:104-11.
- Dudakov JA, Hanash AM, van den Brink MR. Interleukin-22: immunobiology and pathology. *Annu Rev Immunol*. 2015; 33:747-785.
- Esplugues E, Huber S, Gagliani N, Hauser AE, To n T, Wan YY, O'Connor W Jr, Rongvaux A, Van Rooijen N, Haberman AM, et al. Control of TH17 cells occurs in the small intestine. *Nature*. 2011; 475:514–518.
- Farabosco P, Gorman JD, Cleveland C, Kelly JA, Fisher SA, Ortmann WA, et al. Meta-analysis of genome-wide linkage studies of systemic lupus erythematosus. *Genes Immun* 2006; 7:609–614.
- Fu SM, Deshmukh US, Gaskin F. Pathogenesis of systemic lupus erythematosus revisited 2011: end organ resistance to damage, autoantibody initiation and diversification, and HLA-DR. *J Autoimmun*. 2011; 37:104-112.
- Gaber W, Sayed S, Rady HM, Mohey AM. Interleukin-27 and its relation to disease parameters in SLE patients. *The Egyptian Rheumatologist*. 2012; 34:99-105.
- Gaffen SL. Structure and signalling in the IL-17 receptor family. *Nature Reviews Immunology*. 2009; 9:556– 567.
- Gaipl US, Kuhn A, Sheriff A, Munoz LE, Franz S, Voll RE, et al. Clearance of apoptotic cells in human SLE. *Curr Dir Autoimmun*. 2006; 9:173-187.
- Gittler JK, Shemer A, Suarez-Farinas M, Fuentes-Duculan J, Gulewicz KJ, Wang CQ, et al. Progressive activation of T(H)2/T(H)22 cytokines and selective epidermal proteins characterizes acute and chronic atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2012; 130:1344-1354.

Golding A, Hasni S, Illei G, Shevach EM. The Percentage of FoxP3+Helios+ Treg Cells Correlates Positively With Disease Activity in Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheum.*2013; 65:2898–2906.

Gorelik L, Flavell RA. Transforming growth factor- $\beta$  in T-cell biology. *Nature Reviews Immunology.*2002; 2:46–53.

Gorelik L, Constant S, Flavell RA. Mechanism of transforming growth factor  $\beta$ -induced inhibition of T helper type1 differentiation. *Journal of Experimental Medicine.*2002; 195:1499–1505.

Gladman D, Ginzler E, Goldsmith C, et al. The development and initial validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology damage index for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1996;39:363-369.

Gladman DD, Urowitz MB, Darlington GA. Disease expression and class II HLA antigens in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 1999; 8:466–470.

Glimcher LH, Murphy KM. Lineage commitment in the immune system: the T helper lymphocyte grows up. *Genes and Development.*2000; 14:1693–1711.

Graham RR, Ortmann W, Rodine P, Espe K, Langefeld C, Lange E, et al. Specific combinations of HLA-DR2 and DR3 class II haplotypes contribute graded risk for disease susceptibility and autoantibodies in human SLE. *Eur J Hum Genet* 2007; 15:823-830.

Graham RR, Ortmann WA, Langefeld CD, Jawaheer D, Selby SA, Rodine PR, et al. Visualizing human leukocyte antigen class II risk haplotypes in human systemic lupus erythematosus. *Am J Hum Genet* 2002; 71:543-553.

Griffiths B, Mosca M, Gordon C. Assessment of patients with systemic lupus erythematosus and the use of lupus disease activity indices. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2005; 19:685-708.

Gutcher I, Donkor MK, Ma Q, Rudensky AY, Flavell RA, Li MO. Autocrine transforming growth factor-beta1 promotes in vivo Th17 cell differentiation. *Immunity*.2011; 34:396–408.

Halonen SK, Taylor GA, Weiss LM. Gamma interferon-induced inhibition of *Toxoplasma gondii* in astrocytes is mediated by IGTP. *Infection and Immunity*.2001; 69:5573–5576.

Hammad AM, Youssef HM, El-Arman MM. Transforming growth factor  $\beta$  1 in children with systemic lupus erythematosus: a possible relation with clinical presentation of lupus nephritis. *Lupus*.2006;15:608–612.

Heath VL, Murphy EE, Crain C, Tomlinson MG, O'Garra A. TGF- $\beta$ 1 down-regulates Th2 development and results in decreased IL-4-induced STAT6 activation and GATA-3 expression. *European Journal of Immunology*. 2000;30: 2639–2649.

Herrmann M, Voll RE, Zoller OM, Hagenhofer M, Ponner BB, Kalden JR. Impaired phagocytosis of apoptotic cell material by monocyte-derived macrophages from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*.1998; 41:1241-1250.

Hibbert L, Pflanz S, Waal R, Kastelein RA. IL-27 and IFN- $\alpha$  signal via STAT1 and STAT3 and induce TBet and IL-12R $\beta$ 2 in naive T cells. *Journal of Interferon and Cytokine Research*.2003; 23:513–522.

Hirohata S, Arinuma Y, Takayama M, Yoshio T. Association of cerebrospinal fluid anti-ribosomal p protein antibodies with diffuse psychiatric/neuropsychological syndromes in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther*. 2007; 9:R44.

Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*.1997; 40:1725.

Horwitz DA, Gray JD, Ohtsuka K, Hirokawa M, Takahashi T. The immunoregulatory effects of NK cells: the role of TGF-beta and implications for autoimmunity. *Immunol Today*. 1997; 18:538-542.

Houssiau FA, Vasconcelos C, D'Cruz D, Sebastiani GD, De Ramon Garrido E, Danieli MG, et al. The 10-year follow-up data of the Euro-Lupus Nephritis Trial comparing low-dose and high-dose intravenous cyclophosphamide. *Ann Rheum Dis*. 2010; 69:61-64.

Hulsey M, Goldstein R, Scully L, Surbeck W, Reichlin M. Anti-ribosomal P antibodies in systemic lupus erythematosus: a case-control study correlating hepatic and renal disease. *Clin Immunol Immunopathol*. 1995; 74:252-256.

Hunter CA. (2005) New IL-12-family members: IL-23 and IL-27, cytokines with divergent functions. *Nat. Rev. Immunol*. 5:521–531.

Hwang ES, Szabo SJ, Schwartzberg PL, Glimcher LH. T helper cell fate specified by kinase-mediated interaction of T-bet with GATA-3. *Science*. 2005; 307:430–433.

Illei G, Tackey E, Lapteva L, et al. Biomarkers in systemic lupus erythematosus. I. General overview of biomarkers and their applicability. *Arthritis Rheum* 2004; 50:1709–1720.

Ikeuchi H, Kuroiwa T, Hiramatsu N, et al. Expression of interleukin-22 in rheumatoid arthritis: potential role as a proinflammatory cytokine. *Arthritis Rheum*. 2005; 52:1037–1046.

Ippolito A, Wallace DJ, Gladman D, Fortin PR, Urowitz M, Werth V, et al. Autoantibodies in systemic lupus erythematosus: comparison of historical and current assessment of seropositivity. *Lupus*. 2011; 20:250-255.

Isenberg DA, Shoenfeld Y, Walport M, Mackworth-Young C, Dudeney C, Todd-Pokropek A, et al. Detection of cross-reactive anti-DNA antibody idiotypes in the serum of systemic lupus erythematosus patients and of their relatives. *Arthritis Rheum*. 1985; 28:999-1007.

Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, Cua DJ, Littman DR. The Orphan Nuclear Receptor ROR $\gamma$ t Directs the Differentiation Program of Proinflammatory IL-17+ T Helper Cells. *Cell*.2006; 126:1121-1133.

Iwasaki A. and Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nature Immunology*.2004; 5:987-995.

Jacobsen S, Petersen J, Ullman S, Junker P, Voss A, Rasmussen JM, et al. A multicentre study of 513 Danish patients with systemic lupus erythematosus. II. Disease mortality and clinical factors of prognostic value. *Clin Rheumatol*. 1998;17:478-484.

Jakes RW, Bae SC, Louthrenoo W, Mok CC, Navarra SV and Kwon N. Systematic review of the epidemiology of systemic lupus erythematosus in the Asia-Pacific region: prevalence, incidence, clinical features, and mortality. *Arthritis care & research*. 2012;64:159-168.

Jara LJ, Vera O, Miranda JM, Alcalá M, Alvarez J. Prolactin in human systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2001;10:748-756.

Jin T, Almeshed K, Carlsten H, Forsblad-d'Elia H. Decreased serum levels of TGF- $\beta$ 1 are associated with renal damage in female patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*.2012; 21:310–318.

Jonsson H, Nived O, Sturfelt G. Outcome in systemic lupus erythematosus: a prospective study of patients from a defined population. *Medicine (Baltimore)*. 1989;68:141-150.

Kandala NB, Connock M, Grove A, Sutcliffe P, Mohiuddin S, Hartley L, Court R, et al. Belimumab: a technological advance for systemic lupus erythematosus patients? Report of a systematic review and meta-analysis. *BMJ open*. 2013;3, 1–12.

Kang KY, Kwok SK, Ju JH, Park KS, Cho CS, Kim HY, Park SH. The causes of death in Korean patients with systemic lupus erythematosus over 11 years. *Lupus*. 2011; 20:989-997.

Kaplan MH, Sun YL, Hoey T, Grusby MJ. Impaired IL-12 responses and enhanced development of TH2 cells in Stat4-deficient mice. *Nature*.1996; 382, 174–177.

Karim MY, Miranda LC, Tench CM, et al. Presentation and prognosis of the shrinking lung syndrome in systemic lupus erythematosus. *Semin Arthritis Rheum*.2002; 31:289-298.

Kastelein RA, Hunter CA, Cua DJ. Discovery and biology of IL-23 and IL-27: related but functionally distinct regulators of inflammation. *Annu. Rev. Immunol*. 2007; 25: 221–242.

Kido M, Takeuchi S, Sugiyama N, Esaki H, Nakashima H, Yoshida H, Furue M. T cell-specific overexpression of interleukin-27 receptor  $\alpha$  subunit (WSX-1) prevents spontaneous skin inflammation in MRL/lpr mice.*Br J Dermatol*. 2011; 164:1214-1220.

Kim HP, Imbert J, Leonard WJ. Both integrated and differential regulation of components of the IL-2/IL-2 receptor system.*Cytokine and Growth Factor Reviews*.2006; 17:349–366.

Khamashta MA. Management of thrombosis in the antiphospholipid syndrome.*Lupus*.1996; 5:463-466.

Kolls JK, Lindén A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity* 2004; 21: 467–476.

Konya C, Paz Z, Tsokos GC.The role of T cells in systemic lupus erythematosus: an update.*Curr Opin Rheumatol*. 2014;26:493-501.

Koren E, Schnitz W, Reichlin M. Concomitant development of chronic active hepatitis and antibodies to ribosomal P proteins in a patient with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1993;36:1325-1328.

Korn T, Bettelli E, Gao W, Awasthi A, Jäger A, Strom TB, Oukka M, Kuchroo VK  
IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T H17 cells.  
Nature.2007; 448:484–487.

Koscec M, Koren E, Wolfson-Reichlin M, Fugate RD, Trieu E, Targoff IN, et al.  
Autoantibodies to ribosomal P proteins penetrate into live hepatocytes and  
cause cellular dysfunction in culture. J Immunol.1997; 159:2033-2041.

Kuhn A, Ruland V, Bonsmann G. Cutaneous lupus erythematosus: update of  
therapeutic options part I. J Am Acad Dermatol. 2011; 65:179-193.

Kyttaris VC, Zhang Z, Kuchroo KV, et al. Cutting Edge: IL:23 Receptor  
Deficiency prevents the development of Lupus Nephritis in C57BL/6-*ipr/ipr*  
Mice. J Immunol.2010; 184:4605-4609.

Langrish CL, McKenzie BS, Wilson NJ, de Waal Malefyt R, Kastelein RA, Cua  
DJ. (2004) IL-12 and IL-23: master regulators of innate and adaptive immunity.  
Immunol. Rev. 202, 96–105.

Lawrence RC, Helmick CG, Arnett FC, et al. Estimates of the prevalence of  
arthritis and selected musculoskeletal disorders in the United States. Arthritis  
Rheum.1998; 41:778-799.

Lazarevic V, Chen X, Shim JH, Hwang ES, Jang E, Bolm AN, Oukka M,  
Kuchroo VK, Glimcher LH. T-bet represses TH 17 differentiation by preventing  
Runx1-mediated activation of the gene encoding ROR $\gamma$ t. Nature  
Immunology.2011; 12:96–104.

Lee C, Almagor O, Dunlop DD, et al. Self-reported fractures and associated  
factors in women with systemic lupus erythematosus. J Rheumatol.  
2007;34:2018-2023.

Leonard WJ and Spolski R. Interleukin-21: a modulator of lymphoid  
proliferation, apoptosis and differentiation. Nature Reviews Immunology.2005;  
5:688–698.

Letterio JJ, Roberts AB. Regulation of immune responses by TGFbeta. *Annu Rev Immunol* 1998; 16:137–161.

Levine JS, Koh JS. The role of apoptosis in autoimmunity: immunogen; antigen and accelerant. *Semin Nephrology*. 1999; 19: 34-47

Li TT, Zhang T, Chen GM, Zhu QQ, Tao JH, Pan HF, Ye DQ. Low level of serum interleukin 27 in patients with systemic lupus erythematosus. *J Investig Med*. 2010; 58:737-739.

Liang MH, Socher SA, Larson MG, et al. Reliability and validity of six systems for the clinical assessment of disease activity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*.1989; 32: 1107- 1118.

Lieberman LA, Tsokos GC. The IL-2 defect in systemic lupus erythematosus disease has an expansive effect on host immunity. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*.2010; 1-6.

Lighvani AA, Frucht DM, Jankovic D, Yamane H, Aliberti J, Hissong BD, Nguyen BV, Gadina M, Sher A, Paul WE, et al. T-bet is rapidly induced by interferon- $\gamma$  in lymphoid and myeloid cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.2001;98:15137–15142.

Liu J, Wang X, Yang X, Yan Q, Wang S, Han W. Investigating the role of angiogenesis in systemic lupus erythematosus. *Lupus*.2015; 24:621-627.

Luan L, Ding Y, Han S, Zhang Z, Liu X. An increased proportion of circulating Th22 and Tc22 cells in psoriasis. *Cellular immunology*.2014; 290: 196-200.

Luckheeram RV, Zhou R, Verma AD, Xia B. CD4+T cells: differentiation and functions. *Clinical & developmental immunology*, 2012, 925135.

Lugo G, Maldonado R, Possemato R, Penaranda C, Glimcher LH. T-bet is required for optimal production of IFN- $\gamma$  and antigen-specific T cell activation by

dendritic cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.2003;100:7749–7754.

Ma J, Yu J, Tao X, Cai L, Wang J, Zheng SG. The imbalance between regulatory and IL-17secreting CD4+ T cells in lupus patients. Clin Rheumatol. 2010; 29:1251–1258.

Maloy JK, Powrie F. Regulatory T cells in the control of immune pathology. Nature Immunology.2001; 2:816–822.

Manson JJ, Rahman A. Systemic lupus erythematosus. Orphanet J Rare Dis. 2006; 1:6

Manzi S, Selzer F, Sutton-Tyrrell K, et al. Prevalence and risk factors of carotid plaque in women with systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum. 1999;42:51-60.

Maryam R, Samaneh S, Fatemeh N, Maryam S, Seiede ZM, Nafiseh T, Mahmoud M. Expression of T Helper 17 and Regulatory T Cell Cytokines and Molecules in Glomerulonephritis Class IV Systemic Lupus Erythematosus. Iranian Journal of Kidney.2006; 10: 113-118.

Martin JC, Baeten DL, Josien R. Emerging role of IL-17 and Th17 cells in systemic lupus erythematosus.Clin Immunol. 2014; 154:1-12.

Meka RR, Venkatesha SH, Dudics S, Acharya B, Moudgil KD. IL-27-induced modulation of autoimmunity and its therapeutic potential. Autoimmun Rev. 2015; 44:200-205.

Méndez I, Alcocer-Varela J, Parra A, Lava-Zavala A, de la Cruz DA, Alarcón-Segovia D, et al. Neuroendocrine dopaminergic regulation of prolactin release in systemic lupus erythematosus: a possible role of lymphocyte-derived prolactin. Lupus.2004; 13:45-53.

Metawie AS, Elrefai RM, Eladle SS, Sahahin RMH. Transforming growth factor- $\beta$ 1 in systemic lupus erythematosus patients and its relation to organ damage and disease activity. *The Egyptian Rheumatologist*. 2015; 27:49-54.

Mevorach D. Clearance of dying cells and systemic lupus erythematosus: the role of C1q and the complement system. *Apoptosis*. 2010; 15:1114-1123.

Miossec P, Korn T, Kuchroo VK. Interleukin-17 and type 17 helper T cells. *N Engl J Med*. 2009; 361:888–898.

Moder KG, Miller TD, Tazelaar HD. Cardiac involvement in systemic lupus erythematosus. *Mayo Clin Proc*. 1999; 74:275-284.

Monova D, Argirova T, Monov S. Antiribosomal P antibodies in patients with lupus glomerulonephritis. *Clin Nephrol*. 2001; 55:425-426.

Moseley TA, Haudenschild DR, Rose L and Reddi AH. Interleukin-17 family and IL-17 receptors. *Cytokine and Growth Factor Reviews*. 2003; 14:155–174.

Mucenic T, Brenol JC, Bredemeier M, et al. Glu298Asp eNOS polymorphism is not associated with SLE. *Lupus*. 2009; 18:448-451.

Muchinechi SR, Persoli LB, Dutra SB, Lavras LT. HLA antigens and susceptibility to systemic lupus erythematosus in Brazilian patients. *Rev Bras Reumatol* 1998; 38:332–336.

Muñoz LE, Janko C, Schulze C, Schorn C, Sarter K, Schett G, et al. Autoimmunity and chronic inflammation - two clearance-related steps in the etiopathogenesis of SLE. *Autoimmun Rev*. 2010; 10:38-42.

Murray HW, Rubin BY, Carriero SM. Human mononuclear phagocyte antiprotozoal mechanisms: Oxygen- dependent vs oxygen-independent activity against intracellular *Toxoplasma gondii*. *Journal of Immunology*. 1985; 134:1982–1988.

Nakashima K, Galhardo AP, Ferreira J, Fiorenzano GR, Bozzo A, Fernando M, et al. Incidência e aspectos clínico-laboratorias do lúpus eritematoso sistêmico em cidade do Sul do Brasil. 2011;51: 235–239.

Nalbandian A, Crispín JC, Tsokos GC. Interleukin-17 and systemic lupus erythematosus: current concepts. Clin Exp Immunol.2009; 157:209–215.

Niebuhr M, Gathmann M, Scharonow H, Mamerow D, Mommert S, Balaji H, et al. Staphylococcal alpha-toxin is a strong inducer of interleukin-17 in humans. Infect Immun. 2011; 79: 1615-1622.

Ng KP, Manson JJ, Rahman A, Isenberg DA. Association of antinucleosome antibodies with disease flare in serologically active clinically quiescent patients with systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum.2006; 55:900-904.

Niewold TB, Adler JE, Glenn SB, Lehman TJ, Harley JB, Crow MK. Age- and sex-related patterns of serum interferon-alpha activity in lupus families. Arthritis Rheum.2008; 58:2113-2119.

Niewold TB, Hua J, Lehman TJ, Harley JB, Crow MK. High serum IFN-alpha activity is a heritable risk factor for systemic lupus erythematosus. Genes Immun. 2007; 8:492-502.

Ohtsuka K, Gray JD, Stimmler MM, Toro B, Horwitz DA. Decreased production of TGF-beta by lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. J Immunol 1998; 160:2539–2545.

Omdal R, Brokstad K, Waterloo K, Koldingsnes W, Jonsson R, Mellgren SI. Neuropsychiatric disturbances in SLE are associated with antibodies against NMDA receptors. Eur J Neurol. 2005; 12:392-398.

O'Neill S, Cervera R. Systemic lupus erythematosus. Best Pract Res Clin Rheumatol. 2010; 6:841-855.

- Orens JB, Martinez FJ, Lynch JP, 3rd. Pleuropulmonary manifestations of systemic lupus erythematosus. *Rheum Dis Clin North Am.* 1994; 20:159-93.
- Pai SY, Truitt ML, Ho IC. GATA-3 deficiency abrogates the development and maintenance of T helper type 2 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2004; 101:1993-1998.
- Pan HF, Zhao XF, Yuan H, Zhang WH, Li XP, Wang GH, et al. Decreased serum IL-22 levels in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Chim Acta.* 2009; 401:179-180.
- Pan HF, Tao JH, Ye DQ. Therapeutic potential of IL-27 in systemic lupus erythematosus. *Expert Opinion on Therapeutic Targets.* 2010; 14:479-484.
- Pan HF, Li XP, Zheng SG, Ye DQ. Emerging role of interleukin-22 in autoimmune diseases. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2013; 24:51-57.
- Paran D, Fireman E, Elkayam O. Pulmonary disease in systemic lupus erythematosus and the antiphospholipid syndrome. *Autoimmun Rev.* 2004; 3:70-75.
- Petri M, Genovese M, Engle E, et al. Definition, incidence, and clinical description of flare in systemic lupus erythematosus. A prospective cohort study. *Arthritis Rheum.* 1991; 34:937-944.
- Petri M, Orbai AM, Alarcón G, Gordon C, Merrill J, Fortin P et al. Derivation and Validation of Systemic Lupus International Collaborating Clinics Classification Criteria for Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheumatism.* 2012; 64:2677-2686.
- Pistiner M, Wallace DJ, Nessim S, et al. Lupus erythematosus in the 1980s: a survey of 570 patients. *Arthritis Rheum.* 1991; 21:55-64.
- Pons-Estel GJ, Alarcon GS, Scofield L, et al. Understanding the epidemiology and progression of systemic lupus erythematosus. *Semin Arthritis Rheum.* 2010; 39:257-268.

Postal M, Appenzeller S. The role of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Cytokine*. 2011; 56:537-554.

Qin H, Wang L, Feng T, Elson CO, Niyongere SA, Lee SJ, Reynolds SL, Weaver CT, Roarty K, Serra R, et al. TGF- $\beta$  promotes Th17 cell development through inhibition of SOCS3. *Journal of Immunology*. 2009; 183:97–105.

Qin WZ, Chen LL, Pan HF, Leng RX, Zhai ZM, Wang C, et al. Expressions of IL-22 in circulating CD4+/CD8+ T cells and their correlation with disease activity in SLE patients. *Clin Exp Med*. 2011; 11:245-250.

Radic M, Herrmann M, van der Vlag J, Rekvig OP. Regulatory and pathogenetic mechanisms of autoantibodies in SLE. *Autoimmunity*. 2011; 44:349-356.

Rahman A, Isenberg DA. Systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med*. 2008; 358:929-39.

Rastin M, Hatef MR, Tabasi N, Mahmoudi M. The pathway of estradiol-induced apoptosis in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol*. 2011 Aug 12. [Epub ahead of print]

Rastin M, Mahmoudi M, Hatef M, Sahebari M, Tabasi N, Haghmorad D, Nosratabadi R et al. T lymphocyte apoptosis in systemic lupus erythematosus patients. *Iranian journal of basic medical sciences*. 2013; 16: 936– 941.

Renner R, Sticherling M. The different faces of cutaneous lupus erythematosus. *G Ital Dermatol Venereol*. 2009; 144:135-147.

Reveille JD, Macleod MJ, Whittington K, Arnett FC. Specific amino acid residues in the second hypervariable region of HLA-DQA1 and DQB1 chain genes promote the Ro (SS-A)/La (SS-B) autoantibody responses. *J Immunol* 1991; 146:3871–3876.

Rhodes B, Vyse TJ. The genetics of SLE: an update in the light of genome-wide association studies. *Rheumatology (Oxford)* 2008; 47:1603–1611.

- Ribeiro FM, Fabris CL, Bendet I, Lugon JR. Survival of lupus patients on dialysis: a Brazilian cohort. *Rheumatol.*2013; 52:494-500.
- Roldan CA, Shively BK, Crawford MH. An echocardiographic study of valvular heart disease associated with systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med.* 1996; 7;335:1424-1430.
- Ronnblom L, Elkon KB. Cytokines as therapeutic targets in SLE. *Nat Rev Rheumatol.* 2010; 6:339-347.
- Ruiz-Irastorza G, Egurbide MV, Olivares N, et al. Vitamin D deficiency in systemic lupus erythematosus: prevalence, predictors and clinical consequences. *Rheumatology (Oxford).* 2008;47:920-923.
- Ruiz-Irastorza G, Khamashta MA, Castellino G, Hughes GR. Systemic lupus erythematosus. *Lancet.*2001; 357:1027-32. Review
- Shaltout AS, Sayed D, Badary MS, Nafee AM, El Zohri MH, Bakry R, Ahmed SH. Effect of IL6 and IL23 on double negative T cells and anti ds-DNA in systemic lupus erythematosus patients. *Hum Immunol.* 2016;859:30116-1.
- Schenatto CB, Xavier RM, Bredemeier M, et al. Raised serum S100B protein levels in neuropsychiatric lupus. *Ann Rheum Dis.* 2006;65:829-831.
- Schur PH, Gladman DD. Overview of the clinical manifestations of systemic lupus erythematosus in adults. *UpToDate [Internet].* 2013; 19(2). Available from: [http:// www. uptodate. com/ contents/ overview- of- the- clinical- manife stations- of-systemic-lupus-erythematosus-in-adults.](http://www.uptodate.com/contents/overview-of-the-clinical-manifestations-of-systemic-lupus-erythematosus-in-adults)
- Seawell AH, Danoff-Burg S. Psychosocial research on systemic lupus erythematosus: a literature review. *Lupus* 2004; 13: 891-899.
- Seitz H, Matsushima GK. Dendritic Cells in Systemic Lupus Erythematosus Heather. *Int Rev Immunol.*2010; 29: 1–21.

Sigdel KR, Duan L, Wang Y, Hu W, Wang N, Sun Q, Liu Q, Liu X, Hou X, Cheng A, Shi G, Zhang Y. Serum Cytokines Th1, Th2, and Th17 Expression Profiling in Active Lupus Nephritis-IV: From a Southern Chinese Han Population. *Mediators Inflamm.* 2016; 2016:1-10.

Smikle M, Christian N, DeCeulaer K, Barton E, Roye-Green K, Dowe G, et al. HLA-DRB alleles and systemic lupus erythematosus in Jamaicans. *South Med J* 2002; 95:717–719.

Sokol CL, Chu NQ, Yu S, Nish SA, Laufer TM, Medzhitov R. Basophils function as antigen-presenting cells for an allergen-induced T helper type 2 response. *Nature Immunology.* 2009; 10:713–720.

Sontheimer RD. Photoimmunology of lupus erythematosus and dermatomyositis: a speculative review. *Photochem Photobiol.* 1996; 42:583-94

Souza DC, Santo AH, Sato EI. Mortality profile related to systemic lupus erythematosus: a multiple cause-of-death analysis. *Journal of Rheumatology.* 2012; 39:496-503.

Steinke JW and Borish L. Th2 cytokines and asthma. Interleukin-4: its role in the pathogenesis of asthma, and targeting it for asthma treatment with interleukin-4 receptor antagonists. *Respiratory Research.* 2001; 2:66–70.

Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells. *Annual Review of Immunology.* 2003; 21:685–711.

Stumhofer JS, Laurence A, Wilson EH, Huang E, Tato CM, Johnson LM, Villarino AV, Huang Q, Yoshimura A, Sehy D, Saris CJ, O'shea JJ, Hennighausen L, Ernst M, Hunter CA. Interleukin 27 negatively regulates the development of interleukin 17-producing T helper cells during chronic inflammation of the central nervous system. *Nat Immunol.* 2006;7:937-945.

Stumhofer JS, Hunter CA. Advances in understanding the anti-inflammatory properties of IL-27. *Immunology Letters.* 2008; 117: 123-130.

Sultan SM, Begum S, Isenberg DA. Prevalence, patterns of disease and outcome in patients with systemic lupus erythematosus who develop severe hematological problems. *Rheumatology (Oxford)*.2003; 42:230-234.

Symmons DP, Coppock JS, Bacon PA, et al. Development and assessment of a computerized index of clinical disease activity in systemic lupus erythematosus. Members of the British Isles Lupus Assessment Group (BILAG). *Q J Med*. 1988;69:927-937.

Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*.1982; 25:1271-1277.

Takeda A, Hamano S, Yamanaka A. Cutting edge: role of IL-27/WSX-1 signaling for induction of T-bet through activation of STAT1 during initial Th1 commitment. *Journal of Immunology*.2003; 170: 4886-4890.

Telles RW, Lanna CCD, Souza FL, Rodrigues LA, Reis RCP, Ribeiro AL. Causes and predictors of death in Brazilian lupus patients. *Rheumatol Int*. 2013; 33:467-473.

Tench CM, McCurdie I, White PD, D'Cruz DP. The prevalence and associations of fatigue in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)* 2000; 39:1249-1254

Thierfelder WE, van Deursen JM, Yamamoto K, Tripp RA, Sarawar SR, Carson RT, Sangster MY, Vignali DA, Doherty PC, Grosveld GC, et al. Requirement for Stat4 in interleukin- 12-mediated responses of natural killer and T cells. *Nature*.1996; 382: 171–174.

Tiffin N, Adeyemo A, Okpechi I. A diverse array of genetic factors contribute to the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Orphanet journal of rare diseases*.2013; 8: 2.

Tobón GJ, Izquierdo JH, Cañas CA. B Lymphocytes: Development, Tolerance, and Their Role in Autoimmunity-Focus on Systemic Lupus Erythematosus. *Autoimmune diseases*, 2013.

Torre O, Harari S. Pleural and pulmonary involvement in systemic lupus erythematosus. *Presse Med.* 2011; 40:19-29.

Trinchieri G and Sher A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nature Reviews Immunology.*2007; 7:179–190.

Trinchieri G, Pflanz S, Kastelein RA. The IL- 12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. *Immunity.*2003; 19:641–644.

Trinchieri, G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptative immunity.*Immunology.*2003; Dardilly. 3:133-146.

Truchetet ME, Brembilla NC, Montanari E, Allanore Y, Chizzolini C. Increased frequency of circulating Th22 in addition to Th17 and Th2 lymphocytes in systemic sclerosis: association with interstitial lung disease. *Arthritis research & therapy.* 2011; 13:R166.

Tsokos GC. Systemic lupus erythematosus.*The New England journal of medicine.*2011; 365: 2110–2121.

Tsokos GC. Systemic lupus erythematosus.*The New England journal of medicine.* 2001; 1:365: 2110-2121.

Tzioufas AG, Tzortzakis NG, Panou PE, Boki KA, Sakarellos D M, Sakarellos C. The clinical relevance of antibodies to ribosomal-P common epitope in two targeted systemic lupus erythematosus populations: a large cohort of consecutive patients and patients with active central nervous system disease. *Ann Rheum Dis.* 2000; 59:99-104.

Vargas MI, Crispin JC, Richaud Y, Alcocer J. Quantitative and qualitative normal regulatory T cells are not capable of inducing suppression in SLE patients due to T-cell resistance. *Lupus*.2008; 17:289–294.

Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGF- $\beta$  in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity*.2006; 24:179–189.

Veldhoen M, Hocking RJ, Flavell RA, Stockinger B. Signals mediated by transforming growth factor- $\beta$  initiate autoimmune encephalo- myelitis, but chronic inflammation is needed to sustain disease. *Nat Immunol*, 2006; 7:1151–1156.

Vignali DAA, Kuchroo VK. (2012) IL-12 family cytokines: immunological playmakers. *Nature immunology*. 13:722-728.

Vilar MJ, Sato EI. Estimating the incidence of systemic lupus erythematosus in a tropical region (Natal, Brazil).*Lupus*.2002; 11: 528- 532.

Wakeland EK, Liu K, Graham RR, Behrens TW. Delineating the genetic basis of systemic lupus erythematosus. *Immunity* 2001; 15:397–408.

Walport MJ, Black CM, Batchelor JR. The immunogenetics of SLE. *Clin Rheum Dis*. 1982; 8: 3-21

Wang S, Miyazaki Y, Shinozaki Y, Yoshida H. Augmentation of antigen-presenting and Th1-promoting functions of dendritic cells by WSX-1(IL-27R) deficiency.*Journal of Immunology*.2007; 179: 6421-6428.

Weaver CT, Harrington LE, Mangan PR, Gavrieli M, Murphy KM. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T Cell ties. *Immunity*.2006; 24:677-688.

Wei G, Wei L, Zhu J, Zang C, Hu-Li J, Yao Z, Cui K, Kanno Y, Roh TY, Watford WT et al. Global mapping of H3K4me3 and H3K27me3 reveals specificity and

plasticity in lineage fate determination of differentiating CD4<sup>+</sup> T cells. *Immunity*.2009; 30:155–167.

West SG. Neuropsychiatric lupus. *Rheum Dis Clin North Am*. 1994; 20:129-58.

Williams MA, Tyznik AJ, Bevan MJ. Interleukin-2 signals during priming are required for secondary expansion of CD8<sup>+</sup> memory T cells. *Nature*.2006; 441:890–893.

Wolk K, Witte E, Wallace E, et al. IL-22 regulates the expression of genes responsible for antimicrobial defense, cellular differentiation, and mobility in keratinocytes: a potential role in psoriasis. *Eur J Immunol*. 2006; 36:1309–1323.

Wolk K, Witte E, Hoffmann U, et al. IL-22 induces lipopolysaccharide-binding protein in hepatocytes: a potential systemic role of IL-22 in Crohn's disease. *J Immunol*.2007; 178:5973–5981.

Wong CK, Lit LC, Tam LS, Li EK, Wong PT, Lam CW. Hyperproduction of IL-23 and IL-17 in patients with systemic lupus erythematosus: implications for Th17-mediated inflammation in auto-immunity. *Clin Immunol*. 2008;127:385-393.

Wozniacka A, Lesiak A, Narbutt J, McCauliffe DP, Sysa-Jedrzejowska A. Chloroquine treatment influences proinflammatory cytokine levels in systemic lupus erythematosus patients. *Lupus*.2006; 15:268-275.

Xia LP, Li BF, Shen H, Lu J. Interleukin-27 and interleukin-23 in patients with systemic lupus erythematosus: possible role in lupus nephritis. *Scand J Rheumatol*. 2015;44:200-205.

Xing Q, Su H, Cui J, Wang B. Role of Treg cells and TGF- $\beta$ 1 in patients with systemic lupus erythematosus: a possible relation with lupus nephritis. *Immunological Investigations*. 2011.

Xu M, Mizoguchi I, Morishima N, Chiba Y, Mizuguchi J, Yoshimoto T. (2010) Regulation of antitumor responses by the IL-12 Family cytokines, IL-12, IL-23, and IL-27. *Clinical and Developmental Immunology*.2010: 9.

Yang XO, Chang SH, Park H, Nurieva R, Shah B, Acero L, Wang YH, Schluns KS, Broaddus RR, Zhu Z, et al. Regulation of inflammatory responses by IL-17F. *J Exp Med*.2008; 205:1063–1075.

Yang XO, Panopoulos AD, Nurieva R, Chang SH, Wang D, Watowich SS, Dong C. STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells. *Journal of Biological Chemistry*.2007; 282:9358–9363.

Yang J, Chu Y, Yang X, Gao D, Zhu L, Yang X, Wan L. Th17 and natural Treg cell population dynamics in systemic lupus erythematosus. *Arthritis and rheumatism* 2009;60: 1472–1483.

Yang J, Yang X, Zou H, Chu Y, Li M. Recovery of the immune balance between Th17 and regulatory T cells as a treatment for systemic lupus erythematosus. *Rheumatology* 2011; 50: 1366–1372.

Yap DY, Lai KN. Cytokines and their roles in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus: from basics to recent advances. *J Biomed Biotechnol*. 2010; 2010:365083.

Yap DY, Yu X, Chen XM, Lu F, Chen N, Li XW, et al. Pilot 24 month study to compare mycophenolate mofetil and tacrolimus in the treatment of membranous lupus nephritis with nephrotic syndrome. *Nephrology*.2012; 17:352-357.

Yeh TT, Yang YH, Lin YT, Lu CS, Chiang BL. Cardiopulmonary involvement in pediatric systemic lupus erythematosus: a twenty-year retrospective analysis. *J Microbiol Immunol Infect*. 2007; 40:525-531.

Yoshida H, Nakaya M, Miyazaki Y. Interleukin 27: a double-edged sword for offense and defense. *Journal of Leukocyte Biology*.2009; 86: 1295-1303.

Yoshimura T, Takeda A, Hamano S. Two-sided roles of IL-27: induction of Th1 differentiation on naive CD4<sup>+</sup> T cells versus suppression of proinflammatory cytokine production including IL-23-induced IL-17 on activated CD4<sup>+</sup> T cells partially through STAT3-dependent mechanism. *Journal of Immunology*.2006; 177: 5377-5385.

Yurasov S, Tiller T, Tsuiji M, Velinzon K, Pascual V, Wardemann H, Nussenzweig MC. Persistent expression of autoantibodies in SLE patients in remission. *The Journal of experimental medicine*.2006; 203: 2255– 2261.

Yurasov S, Wardemann H, Hammersen J, Tsuiji M, Meffre E, Pascual V, Nussenzweig MC. Defective B cell tolerance checkpoints in systemic lupus erythematosus. *The Journal of experimental medicine*.2005; 201: 703–711.

Zandman-Goddard G, Berkun Y, Barzilai O, Boaz M, Ram M, Anaya JM, Shoenfeld Y. Neuropsychiatric lupus and infectious triggers. *Lupus*.2008; 17:380-384.

Zhao L, Ma H, Jiag Z, Jiang Y, Ma N. Immunoregulation therapy changes the frequency of interleukin (IL)-22<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells in systemic lupus erythematosus patients. *The Journal of Translational Immunology*.2014; 177:212-218.

Zhao L, Jiang Z, Jiang Y, Ma N, Wang K, Zhang Y, Feng L.IL-22+CD4<sup>+</sup> T-cells in patients with active systemic lupus erythematosus. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2013;238:193-199.

Zhou L, Lopes JE, Chong MMW, Ivanov II, Min R, Victora GD, Shen Y, Du J, Rubtsov YP, Rudensky AY, et al. TGF- $\beta$ -induced Foxp3 inhibits TH17 cell differentiation by antagonizing ROR $\gamma$  function. *Nature*.2008; 453:236–240.

Zhu J, Guo L, Watson CJ, Hu-Li J, Paul WE. Stat6 is necessary and sufficient for IL-4's role in TH2 differentiation and cell expansion. *Journal of Immunology*.2001; 166:7276–7281.

Zhu J, Min B, Hu-Li J, Watson CJ, Grinberg A, Wang Q, Killeen N, Urban JF Jr, Guo L, Paul WE. Conditional deletion of Gata3 shows its essential function in TH1-TH2 responses. *Nature Immunology*.2004; 5:1157–1165.

Zhu J, Yamane H, Cote-Sierra J, Guo L, Paul WE. GATA-3 promotes Th2 responses through three different mechanisms: induction of Th2 cytokine production, selective growth of Th2 cells and inhibition of Th1 cell-specific factors. *Cell Research*.2006; 16:3–10.

Zhu J. Paul WE. CD4 T cells: fates, functions and faults. *Bood*. 2008; 112: 1557-1569.

*Apêndices*

## **APÊNDICE A- Artigo.**

### **The analysis of IL-17, IL-22, IL-23p19, IL-27 and TGF- $\beta$ 's role in the pathogenesis of SLE.**

#### **Abstract**

Systemic lupus erythematosus is a multifactorial disease with its etiology still not fully described. It is known that SLE is multifactorial disorder which involves the activation of autoreactive T and B cells against a variety of intracellular components. The objective of this study was to evaluate serum levels of IL-17, IL-22, IL-23p19, IL-27 and TGF- $\beta$  to a better understanding of SLE's pathogenesis. Serum levels of cytokines were determined by ELISA and evaluated in 81 patients with SLE. The serum levels of IL-17, IL-22, IL-23p19, IL-27 e TGF- $\beta$  were in SLE patients (3.90; 80.24; 16.00; 494.00 e 31.25) . There was a positive correlation between IL-27 and C3 levels ( $p = 0.0226$ ), and patients with nephritis presented higher IL-27 levels ( $p = 0.016$ ). A significant positive correlation between TGF- $\beta$  levels with C3 ( $p = 0.0003$ ) and C4 ( $p = 0.0397$ ) was also observed in the univariate analysis. The IL-17, IL-22, IL-23p19 and IL-27 cytokines were not associated with disease activity measured by the SLEDAI score. Multivariate analysis revealed that an increase in TGF- $\beta$  levels leads to a reduction in the SLEDAI score ( $p = 0.04$ ) with the increase of TGF- $\beta$ . These data have demonstrated a protective correlation of IL-27 and TGF- $\beta$  in SLE patients, but more studies are needed to clarify the exact role of this cytokine and its potential use as a therapeutic target.

**Keywords:** Systemic lupus erythematosus, disease activity, cytokine.

## Introduction

Systemic Lupus Erythematosus (SLE) is an autoimmune mediated disease characterized by a wide phenotypic variability<sup>1</sup>. Its clinical course usually evolves with periods of exacerbation and remission and most patients have a relatively benign course, but the overall survival is lower when compared to the general population<sup>2</sup>.

Immunologic abnormalities in SLE include functional hyperactivity of T and B lymphocytes with large production of autoreactive polyclonal antibodies, immune complex deposition in the connective tissue, and other functional changes in natural killer lymphocyte<sup>3, 4</sup>. Although recent advances, SLE etiopathogenesis is still not fully understood.

Cytokines are key inflammatory mediators in SLE immune response. They play an important role in tissue damage, resulting from local and systemic inflammatory response<sup>5,6,7</sup>.

Since serum and plasma cytokines levels are usually elevated in active SLE patients, these molecules are potential biomarkers and therapeutic target.

Cytokines as biomarkers is another important aspect, because their production is increased in serum and plasma of active SLE raising the possibility that these molecules may become potential therapeutic targets<sup>5,8,9</sup>

Produced mainly by T cells, Interleukin-17 (IL-17) has an important link between the T cell mediated adaptive immunity and inflammatory components of innate immunity. IL -17 is a pleiotropic cytokine that stimulates T lymphocytes, endothelial cells, epithelial cells and fibroblasts to produce proinflammatory cytokines such as IL-1, IL-6, TNF and chemokines<sup>9</sup>. IL-17 is classified into six subtypes (A, B, C, D, E and F), but IL-17A and F have been related to autoimmunity, while IL-17B, C, D and E still need to be better characterized<sup>9</sup>. IL-17 is produced by Th17 lymphocytes, but other cells may also produce it, such as  $\gamma\delta$  T cells, NK cells, double-negative lymphocytes, mast cells and neutrophils<sup>9</sup>.

The IL-23 is mainly expressed in antigen-presenting dendritic cells and also in macrophages. IL-23 is known to stimulate the proliferation and maintenance of Th17 cells, initially stimulated by TGF- $\beta$ , IL-6 and IL-22. Some studies have described correlation with the pathogenesis of SLE<sup>10,11</sup>.

Interleukin-27 (IL-27) is the last described member of the IL-12 family. It is produced by activated antigen presenting cells and it plays an important role in regulating cell differentiation of CD4 + T cells and the immune response. IL-27 activates several signaling cascades, including the JAK-STAT and p38 MAPK<sup>10,11</sup>.

The transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) has an important role in controlling autoimmunity, and its production is reduced in lupus, which can associate with the disease susceptibility, activity and organ damage in SLE<sup>12,13</sup>.

Detailed analysis of cytokine levels, their interrelationships and how they relate to disease activity and the accumulation of damage may help us predict the course of the disease. Thus, the main objective of this study is to explore the relationship between pro inflammatory cytokines, IL-17 and IL-23p19, IL-27 anti-inflammatory and IL-22 pleiotropic cytokines and TGF $\beta$  involved in the etiology and pathogenesis of SLE<sup>12,13</sup>.

## **Materials and methods**

### Population study

81 patients of both sexes with Systemic Lupus Erythematosus (SLE) were selected, treated in the rheumatology clinic of the Hospital das Clínicas (HC) of the Federal University of Pernambuco (HC-UFPE). All patients were aged  $\geq$  18 years and fulfilled the ACR classification criteria (American College of Rheumatology) for SLE. Also, 34 healthy volunteers were selected to make the control group. The study has been approved by the Research and Ethics Committees from UFPE (CEP/CCS/UFPE N<sup>o</sup>145/09), and all participants have signed the free and informed consent. All patients receiving pulse therapy with glucocorticoids for less than 30 days or cyclophosphamide pulse therapy for

less than three months or current dose of prednisone  $\geq 1$  mg / kg / day and diagnosis of infection at the time of collection, were not included. 8 ml of blood in a peripheral vein were collected in SLE patients, which was immediately processed to isolate mononuclear cells. SLEDAI (Systemic Lupus Erythematosus Activity Index Diseases) score was applied on the same day of blood collection for evaluation of disease activity. Patients were subdivided according to the SLEDAI scores in active (SLEDAI $\geq$ 6) and inactive (SLEDAI = 0).

### **Determination of cytokines**

Cytokines (IL-17, IL-22, IL-23p19, IL-27 and TGF- $\beta$ ) in the serum of patients and controls were quantified by sandwich ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), following the information recommended by the suppliers. The absorbance used was the difference between 570 and 450 nm. The detection limit of the ELISA kits used in the experiment were 3.9pg / mL for IL-17A, 15.63pg / mL for IL-22, 15.62 pg / mL for IL-23p19 , 62.5 pg / ml for IL-27 and 7.81 pg / mL for TGF- $\beta$ .

### **Statistical analysis**

We used GraphPad PRISM software 6:01 to perform statistical analyzes. The results were expressed as median, maximum and minimum (max-min) for nonparametric data and mean and standard deviation for normal distribution samples. D'Agostino test has indicated the samples' normality. The Mann-Whitney test was used for nonparametric data compared in two groups, ordinal and unpaired. Pearson's linear regression test was used to verify the correlation of measured cytokines with clinical data. Spearman correlation was used for non-parametric data, judging by strength of the correlation  $R^2$  value being:  $0 \leq R^2 \leq 0.35$  weak correlation;  $0.35 < R^2 \leq 0.67$  = moderate correlation;  $0.67 \leq R^2 \leq 1$  strong correlation. For the cited associations and correlations, they were considered statistically significant when the p value  $\leq 0.05$ . Analyzes were performed using STATA / SE 13.0 for multiple linear regression, using the PROBIT model. Statistical significance was accepted when  $p \leq 0.05$ .

## RESULTS

### Demographic and clinical characteristics of SLE patients

We evaluated 81 SLE patients with mean age of 36.7(20-65) years with 33.3% of them were classified with active disease (SLEDAI $\geq$ 6). Patient demographics, disease characteristics and current treatments at time of study inclusion are summarized in Table 1.

### IL-17, IL-22, IL-23p19, IL-27 and TGF- $\beta$ serum levels according to SLE activity

Univariate linear correlation analyses demonstrated no difference of serum levels of IL-17, IL-22, IL-23p19, IL-27 and TGF- $\beta$  when comparing patients with active disease SLEDAI  $\geq$ 6 and remission group SLEDAI  $<$ 6 ( $p >$  0.05). Table 2 However, multivariate correlation analysis showed a negative correlation among TGF- $\beta$  and SLEDAI  $\geq$  6 ( $p =$  0.04) (Table 3).

### IL-22 and IL-27 increased in SLE patients with alopecia

In specific analyses, first univariate and then multivariate later, regarding alopecia in SLE patients, positive associations were found. Higher serum levels of IL-22 were described in SLE patients when compared with patients without alopecia ( $p=0.04$ ). In addition, multivariate analyses demonstrated that probability of present alopecia increases with higher serum IL-22 levels ( $p <$  0.001). Regarding IL-27 levels, there was significant negative association with the multivariate analysis with IL-27 ( $p =$  0.004). However, other cytokines evaluated did not vary significantly (Table 2 and 3).

### IL-27 and TGF- $\beta$ correlated with C3 and C4 serum levels

In univariate analysis, IL-27 serum levels detected in SLE group showed a positive correlation with C3 ( $p=0.02$ ). Additionally, TGF- $\beta$  also presented a positive correlation with C3 ( $p =$  0.0003) and C4 ( $p =$  0.03). There was no correlation between the other cytokines evaluated (Figure 1).

## Serum IL-27 and TGF- $\beta$ are lower in SLE patients with nephritis

Patients with nephritis presented lower IL-27 serum levels( $p=0,022$ ) compared to the group of patients who did not have this condition. Moreover, multivariate analyses presented a significantly negative correlation among nephritis and IL-27 ( $p=0.02$ )

Regarding TGF- $\beta$  ( $p=0.05$ ), we showed a significant negative correlation exclusively in multivariate analyses.(Tables 2 and 3).

However, serum levels of other evaluated cytokines did not vary significantly in groups with and without nephritis.

Table 1: Patients' clinical and demographic:

Clinical Parameters	Data
<b>Patients (LES Group), n</b>	81
Age (years) (min-max)	36.75 (20 – 65)
Male	3
Female	78
<b>SLEDAI</b>	
>6	27 (33.3%)
$\leq 6$	54 (66.7%)
<b>Treatment</b>	
Pred	67
Antimalarial	54
Aza	26
MMF	21
<b>Nephritis</b>	
Active	16 (19.7%)
Inactive	65 (80.3%)
<b>Proteinuria</b>	20 (24.7%)
<b>Alopecia</b>	15 (18.5%)

\*Pred –prednisone, AZA – azathioprine, MMF – mycophenolate mofetil

Table 2: Correlation of clinical manifestations and cytokines in SLE:

<b>Comorbidities/Cytokine</b>	<b>IL-17A</b>	<b>IL-22</b>	<b>IL-23p19</b>	<b>IL-27</b>	<b>TGF-β</b>
<b>Nephritis</b>	0.216	0.527	0.233	0.022*	0.750
<b>Proteinuria</b>	0.308	0.855	0.397	0.091	0.212
<b>Alopecia</b>	0.525	0.049*	0.901	0.186	0.757
<b>C3</b>	0,815	0,846	0.149	0.022	0.0006
<b>C4</b>	0.270	0.328	0.347	0.178	0.039
<b>Anti-DNA</b>	0.977	0.344	0.075	0.523	0.903

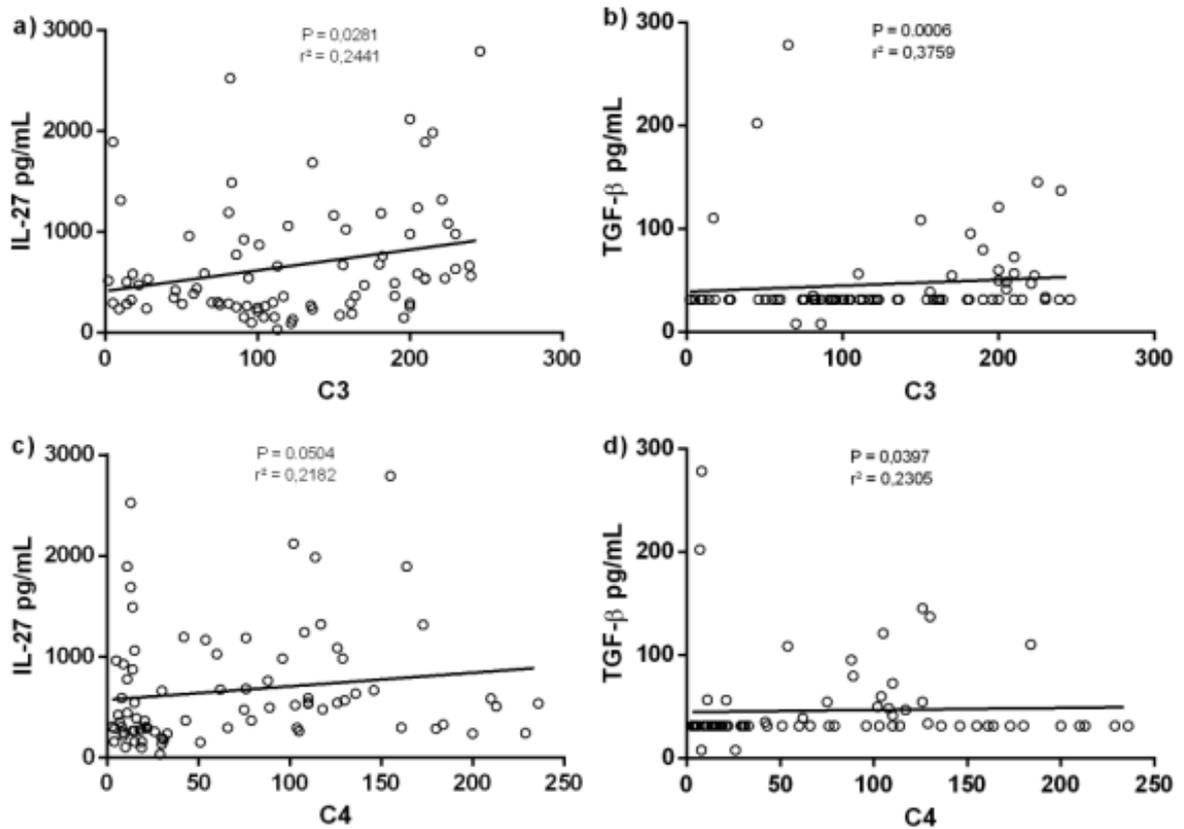
\*Level of significance =  $p \leq 0.05$  (Univariate linear analysis)

Table 3: Association of the activity of cytokines IL-22, IL-27, TGF-β and clinical manifestations in SLE.

	<b>Nephritis</b>		<b>Proteinuria</b>		<b>Alopecia</b>		<b>Anti-DNA</b>		<b>Sledai≥6</b>	
	Coef	P>[t]	Coef	P>[t]	Coef	P>[t]	Coef	P>[t]	Coef	P>[t]
<b>Constante</b>	- 0.23137	0.71	0.15715	0.77	0.06445	0.38	0.76763	0.20	0.98628	0.09
<b>IL-22</b>	0.00084	0.38	9.91e-06	0.99	0.00357	0.00*	0.00058	0.56	- 0.00008	0.93
<b>IL-27</b>	- 0.00126	0.02*	- 0.00053	0.12	- 0.00161	0.004*	0.00020	0.43	- 0.00032	0.26
<b>TGF-β</b>	- 0.00017	0.05*	- 0.00028	0.19	- 0.00003	0.75	- 0.00016	0.12	- 0.00020	0.04*

\*Level of significance =  $p \leq 0.05$  (Multivariate linear analysis)

Figure 1: Changes in serum levels of IL-27 and TGF- $\beta$  in the group with SLE compared to C3 and C4.



## DISCUSSION

This study demonstrates an increase in IL-17, IL-22 and IL-23p19 cytokines of the SLE group, which corroborates with works already described in this literature <sup>14,15</sup>. Evidence suggests that IL-22 plays an important role in the pathogenesis of autoimmune and inflammatory diseases <sup>16,17,18</sup>. In SLE, cutaneous involvement is very common, affecting up to 90% of patients.

Our study has shown an increase in the IL-22 blood levels in patients with SLE, when compared to healthy control and a significant correlation between IL-22 and alopecia, pointing the literature data, indicating this cytokine's role in SLE pathogenesis. But, there was no correlation with other clinical manifestations.

However, the exact mechanism of IL-22's role in the development and pathogenesis of SLE have not yet been elucidated<sup>19,20</sup>.

Alopecia is often associated with disease activity, but it can cause scarring when associated with discoid lesions. The role of IL-22 seems to be related to epithelial innate immune response and the pathophysiology of skin in inflammatory diseases. It can mediate the proliferation of skin keratinocytes and epidermal hyperplasia, and it has a key role in inflammatory diseases with epidermal acanthosis. Besides Lupus, other diseases may be related to IL-22, such as systemic sclerosis<sup>21</sup>, Psoriasis<sup>22</sup>, atopic dermatitis<sup>23,24</sup>, rheumatoid arthritis (RA)<sup>25</sup>, Behcet's disease, ankylosing spondylitis<sup>26</sup>.

Its role in the pathogenesis of SLE is still controversial with different results described in the literature. Our study has demonstrated an increase in the IL-22 levels, as well as in other described researches<sup>27, 28, 29</sup>, while some studies have found decreased IL-22 blood levels in patients when compared to healthy controls. Maybe, this happens due to the time of the disease and its severity in the SLE patients group. Other papers have shown IL-22 presents a positive correlation with nephritis and SLEDAI score, suggesting its participation in disease pathogenesis<sup>26</sup>.

Regarding IL-27 cytokine, this study got a significant correlation between the increase of the cytokine and C3, negative correlation with the reduction of alopecia occurrence probability. Also, the study has found a significant statistical analysis to reduce the probability of nephritis in the group with lupus, with the increase of IL-27, demonstrating a protective action, results also found in other studies<sup>30,31,32</sup>.

The role of cytokines in the immune response (immunity) is not fully understood. Their action can trigger responses that promote both inflammatory and anti-inflammatory responses. In general, the pro activity / anti-inflammatory of IL-27 is influenced by underlying immune effector pathways, the stage of the disease, the presence or absence of counter-regulatory cytokines / T cell subsets, and tissue type / cell being studied. In spite of the results of a spectrum

of various autoimmune diseases, most anti-inflammatory effects and immunomodulatory IL-27 were observed in this category of diseases<sup>10, 33</sup>.

There is evidence that WSX-1 (receptor subunit IL-27) might inhibit the inflammatory process through IL-10 via CD4+ cells, STAT-1 and via STAT-3<sup>34,35</sup>. Furthermore, studies show that IL-27 suppresses pro-inflammatory cytokines such as IL-2, IL-6 and IL-17<sup>36</sup>.

In our study, there was an increase of IL-17 in patients with SLE, compared to the control. Another study demonstrated that IL-17 production by Th17 cells has been reduced due to presence of IL-27. The correlation was performed with IL-27R deficient mice, which there was a higher frequency of Th17 cells in the presence of TGF $\beta$  production and IL-6<sup>37,34</sup>.

The study also showed IL-27 prevents the generation of Th17 cells by inhibiting ROR $\gamma$ t, promoter gene of this cell line. In chronic inflammation, IL-27 is secreted to suppress Th17 cells through IL-17A regulation and IL-10 induction<sup>38</sup>.

Regarding the TGF- $\beta$ , our study had no significant change between the control group and SLE, data also found in other studies<sup>39, 40</sup>. The study had significant correlation between the increase in TGF- $\beta$  and C3, C4, which is a statistically significant analysis with the reduction of nephritis probability in the group with lupus, the reduction SLEDAI 6 score with increasing TGF- $\beta$ , thus, demonstrating a protective action.

The protective role of TGF- $\beta$  in lupus can also be observed through a murine knockout model for TGF- $\beta$ . This model showed classic features of lupus patients, for example, both achieve multiple organs inflammatory diseases; production of autoantibodies (anti-Sm and anti-dsDNA antibody) is detected in both diseases; and there is the spontaneous activation of autoreactive T cells<sup>41</sup>.

TGF- $\beta$  is produced by NK cells and it has a potent inhibitory effect on the production of IL-6, IL-1 and TNF, which are cytokines involved in the

pathogenesis of SLE by macrophages in vitro. TGF- $\beta$  suppresses IgG secretion using B lymphocytes through co-stimulation of CD8 + cells with IL-2. TGF $\beta$  levels are lower in patients with SLE and this happens probably because of the high levels of IL10 that suppress the production of TGF- $\beta$  by NK. It seems that high IgG production observed in SLE patients is attributable, partially, to low levels of TGF- $\beta$  and inadequate suppression of IgG production<sup>42</sup>.

TGF- $\beta$  has been revealed as an essential regulator of both innate and adaptive functions in autoimmune diseases. One of the TGF- $\beta$  functions is to suppress inflammation<sup>43</sup>. Plus, it can regulate the auto aggressive T cells responses by preventing the maturation of APC and it may inhibit the differentiation of CD4+ in Th1 or Th2 cells<sup>44, 45, 46</sup>.

TGF- $\beta$ 1 serum concentration is decreased in patients with active SLE, and urinary TGF-  $\beta$ 1 levels are increased in patients with nephritis<sup>47, 48</sup>.

Studies in the area obtained a reduction of TGF $\beta$ 1 lupus group compared to control, in this very same study, total levels of TGF- $\beta$ 1 were lower in patients with high disease activity (SLEDAI > 10). The total TGF- $\beta$ 1 levels were lower in SLE patients with high disease activity and severe organ damage. The severity of renal damage was associated with decreased serum levels of TGF- $\beta$ 1's total, thus suggesting TGF- $\beta$ 1 might be involved in the pathogenesis of renal injury caused by lupus nephritis<sup>49,50</sup>.

## **Conclusion**

Our study showed an increase in serum levels of IL-17, IL-22, IL-23p19 and IL-27cytokines compared to the control group. IL-27 and TGF- $\beta$  correlated with serum levels of complement proteins (C3) and with SLE nephritispatients, the association with the C4 occurred only with TGF- $\beta$ . According to the SLE activity assessed by SLEDAI 6, analyses showed correlation with TGF- $\beta$ . Association with alopecia was positively with IL-22 and negatively with IL-27. A better understanding of the importance of cytokines and the immune response will allow the creation of new markers and useful therapeutic agents for the early diagnosis and an improved treatment of SLE.

## References

1. O'Neill S, Cervera R. Systemic lupus erythematosus. *Best Pract Res Clin Rheumatol.*2010; 6:841-55.
2. Bernatsky S, Boivin JF, Joseph L, Manzi S, Ginzler E, Gladman DD, et al. Mortality in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.*2006; 54:2550-7.
3. Tench CM, McCurdie I, White PD, D'Cruz DP. The prevalence and associations of fatigue in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)* 2000; 39:1249-1254.
4. Kuhn A, Ruland V, Bonsmann G. Cutaneous lupus erythematosus: update of therapeutic options part I. *J Am Acad Dermatol.* 2011; 65:179-193.
5. Yap DY, Lai KN. Cytokines and their roles in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus: from basics to recent advances. *J Biomed Biotechnol.* 2010; 2010:365083.
6. Ronnblom L, Elkon KB. Cytokines as therapeutic targets in SLE. *Nat Rev Rheumatol.*2010; 6:339-347.
7. Apostolidis S, Lieberman L, Kis-Toth K, Crispin J, Tsokos G. The dysregulation of cytokine networks in systemic lupus erythematosus. *J Interf Cytok Res.* 2011; 31: 769–779.
8. Ohl K, Tenbrock K. Inflammatory cytokines in systemic lupus erythematosus. *J Biomed Biotechnol.* 2011; 2011:432595.
9. Martin JC, Baeten DL, Josien R. Emerging role of IL-17 and Th17 cells in systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol.* 2014; 154:1-12.
10. Xia LP, Li BF, Shen H, Lu J. Interleukin-27 and interleukin-23 in patients with systemic lupus erythematosus: possible role in lupus nephritis. *Scand J Rheumatol.* 2015; 44:200-205.
11. Shaltout AS, Sayed D, Badary MS, Nafee AM, El Zohri MH, Bakry R, Ahmed SH. Effect of IL6 and IL23 on double negative T cells and anti ds-DNA in systemic lupus erythematosus patients. *Hum Immunol.* 2016;859: 30116-1.
12. Dijke P, Hill CS. New insights into TGF-beta-Smad signalling. *Trends Biochem Sci* 2004; 29: 265–273.
13. Letterio JJ, Roberts AB. Regulation of immune responses by TGFbeta. *Annu Rev Immunol* 1998; 16:137–161.

14. Abou Ghanima AT, Elolemy GG, Ganeb SS, Abo Elazem AA, Abdelgawad ER. Role of T helper 17 cells in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Egypt J Immunol.* 2012;19:25-33.
15. Wong CK, Lit LC, Tam LS, Li EK, Wong PT, Lam CW. Hyperproduction of IL-23 and IL-17 in patients with systemic lupus erythematosus: implications for Th17-mediated inflammation in auto-immunity. *Clin Immunol.* 2008;127:385-393.
16. Wolk K, Witte E, Wallace E, et al. IL-22 regulates the expression of genes responsible for antimicrobial defense, cellular differentiation, and mobility in keratinocytes: a potential role in psoriasis. *Eur J Immunol.* 2006; 36:1309–1323.
17. Wolk K, Witte E, Hoffmann U, et al. IL-22 induces lipopolysaccharide-binding protein in hepatocytes: a potential systemic role of IL-22 in Crohn's disease. *J Immunol.* 2007; 178:5973–5981.
18. Ikeuchi H, Kuroiwa T, Hiramatsu N, et al. Expression of interleukin-22 in rheumatoid arthritis: potential role as a proinflammatory cytokine. *Arthritis Rheum.* 2005; 52:1037–1046.
19. Manson JJ, Rahman A. Systemic lupus erythematosus. *Orphanet J Rare Dis.* 2006; 1-6.
20. Rahman A, Isenberg DA. Systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med.* 2008; 358:929-39.
21. Truchetet ME, Brembilla NC, Montanari E, Allanore Y, Chizzolini C. Increased frequency of circulating Th22 in addition to Th17 and Th2 lymphocytes in systemic sclerosis: association with interstitial lung disease. *Arthritis research & therapy.* 2011; 13:R166.
22. Luan L, Ding Y, Han S, Zhang Z, Liu X. An increased proportion of circulating Th22 and Tc22 cells in psoriasis. *Cellular immunology.* 2014; 290: 196-200.
23. Gittler JK, Shemer A, Suarez-Farinas M, Fuentes-Duculan J, Gulewicz KJ, Wang CQ, et al. Progressive activation of T(H)2/T(H)22 cytokines and selective epidermal proteins characterizes acute and chronic atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2012; 130:1344-1354.
24. Niebuhr M, Gathmann M, Scharonow H, Mamerow D, Mommert S, Balaji H, et al. Staphylococcal alpha-toxin is a strong inducer of interleukin-17 in humans. *Infect Immun.* 2011; 79: 1615-1622.

25. Konya C, Paz Z, Tsokos GC. The role of T cells in systemic lupus erythematosus: an update. *Curr Opin Rheumatol*.2014; 26:493-501.
26. Qin WZ, Chen LL, Pan HF, Leng RX, Zhai ZM, Wang C, et al. Expressions of IL-22 in circulating CD4+/CD8+ T cells and their correlation with disease activity in SLE patients. *Clin Exp Med*. 2011;11(4):245-50.
27. Zhao L, Ma H, Jiag Z, Jiang Y, Ma N. Immunoregulation therapy changes the frequency of interleukin (IL)-22<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells in systemic lupus erythematosus patients. *The Journal of Translational Immunology*.2014; 177:212-218.
28. Pan H-F, Li X-P, Zheng SG, Ye D-Q. Emerging role of Interleukin-22 in autoimmune diseases.*Cytokine & growth factor reviews*. 2013; 24:51-57.
29. Zhao L, Jiang Z, Jiang Y, Ma N, Wang K, Zhang Y, Feng L.IL-22+CD4+ T-cells in patients with active systemic lupus erythematosus. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2013;238:193-199.
30. Cheng F, Guo Z, Xu H, Yan D, Li Q. Decreased plasma IL22 levels, but not increased IL17 and IL23 levels, correlate with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*. 2009; 68:604-6.
31. Pan HF, Zhao XF, Yuan H, Zhang WH, Li XP, Wang GH, et al. Decreased serum IL-22 levels in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Chim Acta*. 2009; 401:179-180.
32. Duarte AL, Dantas AT, de Ataíde Mariz H, Santos FA, Silva JC, Rocha LF Jr, Galdino SL, Galdino da R P M. Decreased serum interleukin 27 in Brazilian systemic lupus erythematosus patients. *Mol Biol Rep*. 2013; 40:4889-9
33. Meka RR, Venkatesha SH, Dudics S, Acharya B, Moudgil KD. IL-27-induced modulation of autoimmunity and its therapeutic potential. *Autoimmun Rev*. 2015; 44:200-205.
34. Stumhofer JS, Laurence A, Wilson EH, Huang E, Tato CM, Johnson LM, Villarino AV, Huang Q, Yoshimura A, Sehy D, Saris CJ, O'shea JJ, Hennighausen L, Ernst M, Hunter CA. Interleukin 27 negatively regulates the development of interleukin 17-producing T helper cells during chronic inflammation of the central nervous system. *Nat Immunol*. 2006;7:937-945.
35. Kido M, Takeuchi S, Sugiyama N, Esaki H, Nakashima H, Yoshida H, Furue M. T cell-specific overexpression of interleukin-27 receptor  $\alpha$  subunit (WSX-1) prevents spontaneous skin inflammation in MRL/lpr mice.*Br J Dermatol*. 2011; 164:1214-1220.

36. Batten M, Ghilardi N. The biology and therapeutic potential of interleukin 27. *J Mol Med (Berl)*.2007; 85:661-672.
37. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*. 2006; 7090:235-238.
38. Diveu C, Mcgeachy MJ, Boniface K, Stumhofer JS, Sathe M, Joyce-shaikm B, Chen Y, Tato CM, Mcclanahan TK, De wall, Malefyt R, Hunter CA, Cua DJ, Kastelein RA. IL-27 blocks RORc expression to inhibit lineage commitment of Th17 cells. *J Immunol*.2009; 182:5748-5756.
39. Maryam R, Samaneh S, Fatemeh N, Maryam S, Seiede ZM, Nafiseh T, Mahmoud M. Expression of T Helper 17 and Regulatory T Cell Cytokines and Molecules in Glomerulonephritis Class IV Systemic Lupus Erythematosus. *Iranian Journal of Kidney*.2006; 10: 113-118.
40. Liu J, Wang X, Yang X, Yan Q, Wang S, Han W. Investigating the role of angiogenesis in systemic lupus erythematosus. *Lupus*.2015; 24:621-627.
41. Ohtsuka K, Gray JD, Stimmler MM, Toro B, Horwitz DA. Decreased production of TGF-beta by lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 1998; 160:2539–2545.
42. HorwitzDA, GrayJD, OhtsukaK, HirokawaM, TakahashiT. The immunoregulatory effects of NK cells: the role of TGF-beta and implications for autoimmunity. *Immunol Today*. 1997; 18:538-542.
43. Maloy JK, Powrie F. Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nature Immunology*.2001; 2:816–822.
44. Gorelik L, Flavell RA. Transforming growth factor-β in T-cell biology. *Nature Reviews Immunology*.2002; 2:46–53.
45. Gorelik L, Constant S, Flavell RA. Mechanism of transforming growth factor β-induced inhibition of T helper type1 differentiation. *Journal of Experimental Medicine*.2002; 195:1499–1505.
46. Heath VL, Murphy EE, Crain C, Tomlinson MG, O'Garra A. TGF-β1 down-regulates Th2 development and results in decreased IL-4-induced STAT6 activation and GATA-3 expression. *European Journal of Immunology*. 2000;30: 2639–2649.

47. Xing Q, Su H, Cui J, Wang B. Role of Treg cells and TGF- $\beta$ 1 in patients with systemic lupus erythematosus: a possible relation with lupus nephritis. *Immunological Investigations*. 2011.
48. Hammad AM, Youssef HM, El-Arman MM. Transforming growth factor  $\beta$  1 in children with systemic lupus erythematosus: a possible relation with clinical presentation of lupus nephritis. *Lupus*. 2006; 15:608–612.
49. Jin T, Almehed K, Carlsten H, Forsblad-d'Elia H. Decreased serum levels of TGF- $\beta$ 1 are associated with renal damage in female patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2012; 21:310–318.
50. Metawie AS, Elrefai RM, Eladle SS, Sahahin RMH. Transforming growth factor- $\beta$ 1 in systemic lupus erythematosus patients and its relation to organ damage and disease activity. *The Egyptian Rheumatologist*. 2015; 27:49-54.

## **APÊNDICE B- Termo de consentimento livre esclarecido para cidadãos alfabetizados**

### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO PARA CIDADÃOS ALFABETIZADOS**

#### **« Avaliação de novos derivados tiazolidínicos agonistas do PPAR na inibição da resposta inflamatória das células Th17, Th1, Th17/Th1 in vitro em PBMCs provenientes de pacientes com lúpus »**

Nós o convidamos a participar de uma pesquisa que visa a descoberta de novos medicamentos para o tratamento do lúpus eritematoso sistêmico (LES). Como pesquisadores responsáveis deste estudo, nosso objetivo é melhorar o tratamento dos pacientes portadores desta doença. Desta forma, visamos descobrir fármacos com menos efeitos colaterais e mais eficazes comparados aos atualmente utilizados. Nesta pesquisa só será realizado testes com as células presentes no seu sangue, após este ter sido coletado por profissionais competentes. Deste modo, nenhum medicamento será administrado em você durante toda a pesquisa.

É importante ressaltar que:

- 1.** Sua participação é inteiramente **voluntária**;
- 2.** Você terá ressarcimento de despesas, como transporte ou alimentação, durante a participação na pesquisa;
- 3.** Você pode deixar de participar do estudo a qualquer momento que quiser;
- 4.** Nós solicitaremos novamente sua aprovação (verbal) no momento de cada coleta;
- 5.** Suas informações nunca serão divulgadas, ou seja, permanecerão confidenciais.

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença autoimune do tecido conjuntivo caracterizada pela produção de auto-anticorpos. Nesta doença, as células de defesa do corpo destrói células do próprio organismo, ao invés de destruir apenas organismos estranhos. Este fenômeno leva ao desenvolvimento de lesões cutâneo-vasculares localizadas ou disseminadas. As manifestações cutâneas usualmente se apresentam mais expressivas nas áreas expostas ao sol, como no rosto e no nariz. Também se observa dor e inchaço, principalmente nas articulações das mãos. Nos casos mais graves há comprometimento com mais frequência dos rins, mas outros órgãos também podem ser atingidos. Alterações hematológicas (alterações no número de células do sangue), como a anemia, leucopenia, linfopenia e plaquetopenia podem ocorrer em mais de 50% dos pacientes.

A causa do LES ainda é desconhecida. Fatores genéticos já foram mostrados implicados no desenvolvimento desta doença.

O LES afeta principalmente mulheres em idade reprodutiva. Todavia, a idade de início da doença varia de 2 a 90 anos.

Os medicamentos utilizados no tratamento do LES têm dois objetivos básicos: *(i)* reduzir a inflamação dos tecidos afetados, e *(ii)* inibir as anomalias do sistema imunológico (sistema de defesa do corpo humano) consideradas responsáveis pela

inflamação. Em muitos casos, também é necessário o uso de outros medicamentos para o tratamento de outras complicações, tais como: contra a retenção de fluidos, anti-hipertensivos, anticonvulsivantes e antibióticos.

Sem quimioterapia específica, vários são os fármacos utilizados no lúpus eritematoso: a cloroquina, a talidomida, os fármacos antiinflamatórios não-esteróides e os corticosteróides. A melhora dos sintomas geralmente é notada após poucos dias de tratamento, porém alguns pacientes necessitam o uso contínuo destes fármacos, que pode ocasionar efeitos colaterais graves. Portanto, faz-se necessário um estudo como este, que vise a descoberta de novos fármacos para o tratamento desta doença.

Nós solicitamos a sua colaboração e participação neste estudo porque você é portador do LES ou por você ser um voluntário não portador desta doença. Este estudo inclui a participação de 130 indivíduos. Entre os quais, 30 são voluntários sadios e 100 são portadores do LES.

Para este estudo, precisamos coletar algumas células de sangue. A coleta de sangue é feita no braço e a quantidade coletada é equivalente a duas colheres de sopa (10-15 ml). A coleta de sangue pode ser desconfortável e o braço pode ficar um pouco dolorido. Antes de iniciar a coleta, nós limparemos o seu braço com álcool, e todo material usado na coleta é descartável. A coleta será feita por profissionais treinados e competentes e orientados para reduzir os riscos.

Nós faremos também lhe algumas perguntas para obter informações clínicas, as quais serão importantes para nosso estudo.

Os resultados deste estudo serão apresentados em congressos, conferências ou em revistas médicas, mas não aparecerá seu nome. Suas informações nunca serão divulgadas, permanecerão confidenciais.

### **Você tem alguma pergunta sobre a sua participação neste estudo?**

Se você tiver alguma pergunta mais tarde, poderá conversar com um dos membros da nossa equipe, podendo contatar:

1) Professora Dra. Angela Luzia Branco Pinto Duarte, Médica e Professora da Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Medicina Clínica.

Av. Prof. Moraes Rego S/N - Cidade Universitária, CEP: 50.670-901 Recife – PE.

E-mail: aduarte@terra.com.br. Telefone/Fax: 55 (81) 2126-3575

2) Professor Dr. Carlos Teixeira Brandt, Médico e Professor da Universidade Federal de Pernambuco, Hospital das Clínicas, Av. Prof. Moraes Rego S/N - Cidade Universitária, CEP: 50.670-901 Recife – PE. E-mail: carlosbrandt@bol.com.br. Telefone/Fax: 55 (81) 2126-3060

3) MSc. Maira Galdino da Rocha Pitta, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego S/N - Cidade Universitária, CEP: 50.670-901 Recife – PE. E-mail: mgrpitta@gmail.com. Telefone/Fax: 55 (81) 2126-8346

Assim como, o coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa - CEP/CCS, o Professor Dr. Geraldo Bosco Lindoso Couto, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego S/N - Cidade Universitária, CEP: 50.670-901 Recife – PE. Telefone/Fax: 55 (81) 2126-8588.

**Você ficará com uma cópia deste documento.**

**Nome do responsável pela coleta de sangue:.....**

Se você aceitar participar deste estudo, por favor, preencha o formulário abaixo.

**Data:.....**

**Endereço:.....**  
...

**Nome:.....**

**RG: .....**

**Assinatura: .....**

**Testemunha 1: .....**

**RG: .....**

**Testemunha 2: .....**

**RG: .....**

**Assinatura da Coordenação do Projeto:**

**Professora Dra. Angela Luzia Branco Pinto  
Duarte**

**Doutoranda Maira Galdino da Rocha Pitta  
Pesquisador Responsável**

## APÊNDICE C- Termo de consentimento livre esclarecido para cidadãos não alfabetizados

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO PARA CIDADÃOS NÃO ALFABETIZADOS

#### « Avaliação de novos derivados tiazolidínicos agonistas do PPAR na inibição da resposta inflamatória das células Th17, Th1, Th17/Th1 in vitro em PBMCs provenientes de pacientes com lúpus »

Por favor, leia as informações a seguir para o sujeito da pesquisa, preferencialmente na presença de terceiros, assegurando-se que as informações foram todas compreendidas e permitam ao voluntário a plena liberdade entre escolher participar ou não do estudo.

Nós o convidamos a participar de uma pesquisa que visa a descoberta de novos medicamentos para o tratamento do lúpus eritematoso sistêmico (LES). Como pesquisadores responsáveis deste estudo, nosso objetivo é melhorar o tratamento dos pacientes portadores desta doença. Desta forma, visamos descobrir fármacos com menos efeitos colaterais e mais eficazes comparados aos atualmente utilizados. Nesta pesquisa só será realizado testes com as células presentes no seu sangue, após este ter sido coletado por profissionais competentes. Deste modo, nenhum medicamento será administrado em você durante toda a pesquisa.

É importante ressaltar que:

- 6.** Sua participação é inteiramente **voluntária**;
- 7.** Você terá ressarcimento de despesas, como transporte ou alimentação, durante a participação na pesquisa;
- 8.** Você pode deixar de participar do estudo a qualquer momento que quiser;
- 9.** Nós solicitaremos novamente sua aprovação (verbal) no momento de cada coleta;
- 10.** Suas informações nunca serão divulgadas, ou seja, permanecerão confidenciais.

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença autoimune do tecido conjuntivo caracterizada pela produção de auto-anticorpos. Nesta doença, as células de defesa do corpo destrói células do próprio organismo, ao invés de destruir apenas organismos estranhos. Este fenômeno leva ao desenvolvimento de lesões cutâneo-vasculares localizadas ou disseminadas. As manifestações cutâneas usualmente se apresentam mais expressivas nas áreas expostas ao sol, como no rosto e no nariz. Também se observa dor e inchaço, principalmente nas articulações das mãos. Nos casos mais graves há comprometimento com mais frequência dos rins, mas outros órgãos também podem ser atingidos. Alterações hematológicas (alterações no número de células do sangue), como a anemia, leucopenia, linfopenia e plaquetopenia podem ocorrer em mais de 50% dos pacientes.

A causa do LES ainda é desconhecida. Fatores genéticos já foram mostrados implicados no desenvolvimento desta doença.

O LES afeta principalmente mulheres em idade reprodutiva. Todavia, a idade de início da doença varia de 2 a 90 anos.

Os medicamentos utilizados no tratamento do LES têm dois objetivos básicos: *(i)* reduzir a inflamação dos tecidos afetados, e *(ii)* inibir as anomalias do sistema imunológico (sistema de defesa do corpo humano) consideradas responsáveis pela inflamação. Em muitos casos, também é necessário o uso de outros medicamentos para o tratamento de outras complicações, tais como: contra a retenção de fluidos, anti-hipertensivos, anticonvulsivantes e antibióticos.

Sem quimioterapia específica, vários são os fármacos utilizados no lúpus eritematoso: a cloroquina, a talidomida, os fármacos antiinflamatórios não-esteróides e os corticosteróides. A melhora dos sintomas geralmente é notada após poucos dias de tratamento, porém alguns pacientes necessitam o uso contínuo destes fármacos, que pode ocasionar efeitos colaterais graves. Portanto, faz-se necessário um estudo como este, que vise a descoberta de novos fármacos para o tratamento desta doença.

Nós solicitamos a sua colaboração e participação neste estudo porque você é portador do LES ou por você ser um voluntário não portador desta doença. Este estudo inclui a participação de 130 indivíduos. Entre os quais, 30 são voluntários sadios e 100 são portadores do LES.

Para este estudo, precisamos coletar algumas células de sangue. A coleta de sangue é feita no braço e a quantidade coletada é equivalente a duas colheres de sopa (10-15 ml). A coleta de sangue pode ser desconfortável e o braço pode ficar um pouco dolorido. Antes de iniciar a coleta, nós limparemos o seu braço com álcool, e todo material usado na coleta é descartável. A coleta será feita por profissionais treinados e competentes e orientados para reduzir os riscos.

Nós faremos também lhe algumas perguntas para obter informações clínicas, as quais serão importantes para nosso estudo.

Os resultados deste estudo serão apresentados em congressos, conferências ou em revistas médicas, mas não aparecerá seu nome. Suas informações nunca serão divulgadas, permanecerão confidenciais.

### **Você tem alguma pergunta sobre a sua participação neste estudo?**

Se você tiver alguma pergunta mais tarde, poderá conversar com um dos membros da nossa equipe, podendo contatar:

1) Professora Dra. Angela Luzia Branco Pinto Duarte, Médica e Professora da Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Medicina Clínica.

Av. Prof. Moraes Rego S/N - Cidade Universitária, CEP: 50.670-901 Recife – PE.

E-mail: aduarte@terra.com.br. Telefone/Fax: 55 (81) 2126-3575

2) Professor Dr. Carlos Teixeira Brandt, Médico e Professor da Universidade Federal de Pernambuco, Hospital das Clínicas, Av. Prof. Moraes Rego S/N - Cidade Universitária, CEP: 50.670-901 Recife – PE. E-mail: carlosbrandt@bol.com.br. Telefone/Fax: 55 (81) 2126-3060

3) MSc. Maira Galdino da Rocha Pitta, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego S/N - Cidade Universitária, CEP: 50.670-901 Recife – PE. E-mail: mgrpitta@gmail.com. Telefone/Fax: 55 (81) 2126-8346

Assim como, o coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa - CEP/CCS, o Professor Dr. Geraldo Bosco Lindoso Couto, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego S/N - Cidade Universitária, CEP: 50.670-901 Recife – PE. Telefone/Fax: 55 (81) 2126-8588.

**Você ficará com uma cópia deste documento.**

**Nome do responsável pela coleta de sangue:.....**

Se você aceitar participar deste estudo, por favor responda o formulário abaixo.

**Data:.....**

**Eu**

.....,

**a rago de ..... , assino o presente termo de consentimento.**

**RG: .....**

**Endereço:.....**  
...

**Testemunha 1: .....**

**RG: .....**

**Testemunha 2: .....**

**RG: .....**

**Assinatura dos Coordenadores do Projeto:**



**Impressão Digital do Paciente**

**Professora Dra. Angela Luzia Branco Pinto Duarte**

**Doutoranda Maira Galdino da Rocha Pitta  
Pesquisador Responsável**

## APÊNDICE D- Ficha clínica

### DADOS GERAIS

**DATA:**

INICIAIS/Nº DE IDENTIFICAÇÃO: \_\_\_\_\_

REGISTRO: \_\_\_\_\_

NOME \_\_\_\_\_ DO

PACIENTE: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

ENDEREÇO:

\_\_\_\_\_

—

SEXO: M (1) F (2) DATA DE NASCIMENTO: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Idade: \_\_\_\_\_

RAÇA: Branca (1) negra (2) parda (3) indígena (4) amarela

(5)TELEFONE: \_\_\_\_\_

### HISTÓRIA DA DOENÇA

Data de início dos sintomas: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Data do diagnóstico:

\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

TEMPO DE DOENÇA = \_\_\_\_\_ meses

**CRITÉRIOS ACR**

**NÚMERO DE CRITÉRIOS:** \_\_\_\_\_

<b>1. Rash malar</b>	<b>2. Rash discóide</b>	<b>3. Fotossensibilidade</b>	<b>4. Artrite</b>	<b>5. Úlceras orais</b>
<b>6. Serosite</b> 6.1 Pleura 6.2 Pericárdio	<b>7. Hematológicas</b> 7.1 Anemia hemolítica 7.2 Leucopenia 7.3 Linfopenia 7.4 Plaquetopenia	<b>8. Renais</b> 8.1 Proteinúria 8.1 Cilindrúria	<b>9. Neurológicas</b> 9.1 Psicose 9.2 Convulsões	
<b>10. FAN</b> Título: _____ Padrão: _____				
<b>11. Imunológicas</b> 11.1 Anti-DNA 11.2 Anti-Sm 11.3 SAF				

MEDICAMENTOS EM USO: (Marcar com **X** na última coluna da direita aqueles utilizados no dia da coleta)

<b>DROGA</b>	<b>DOSE ATUAL</b>	<b>TEMPO (MESES)</b>	
<b>1. Prednisona</b>			
<b>2. Micofenolato de mofetil</b>			
<b>3. Difosfato de Cloroquina</b>			
<b>4. Hidroxicloroquina</b>			
<b>5. Ciclofosfamida</b>			
<b>6. Azatioprina</b>			
<b>7. Talidomida</b>			
<b>8. Outras</b>			

Data e hora que tomou a última medicação: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ às

\_\_\_\_:\_\_\_\_hs

*Anexos*

## ANEXO A- Comitê de Ética



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. N.º 239/2009 - CEP/CCS

Recife, 27 de agosto de 2009

Registro do SISNEP FR – 256876

CAAE – 0142.0.172.000-09

Registro CEP/CCS/UFPE N.º 145/09

Título: "Avaliação de novos derivados tiazolidínicos agonistas do PPAR na inibição da resposta inflamatória das células Th17, Th1, Th17/Th1 in vitro em PBMCs provenientes de pacientes com lúpus".

Pesquisadora Responsável: Maira Galdino da Rocha Pitta

Senhora Pesquisadora:

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE) registrou e analisou, de acordo com a Resolução N.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, o protocolo de pesquisa em epígrafe, aprovando-o e liberando-o para início da coleta de dados em 27 de agosto de 2009.

Ressaltamos que o pesquisador responsável deverá apresentar um relatório ao final da pesquisa.

Atenciosamente

Prof. Geraldo Bosco Lindoso Couto  
Coordenador do CEP/CCS / UFPE

A  
Sra. Maira Galdino da Rocha Pitta  
Departamento de Antibióticos - CCB/UFPE

## ANEXO B- Índice de atividade do LES-SLEDAI

ÍNDICE DE ATIVIDADE DO LES – SLEDAI

TOTAL:

Valor	Manifestação	Definição
8	Convulsão	Aparecimento recente*. Exclusão de causas metabólicas, infecciosas ou medicamentosas.
8	Psicose	Alteração severa da atividade normal acompanhada de alteração da percepção da realidade. Compreende: alucinações, incoerência, pensamento ilógico, comportamento bizarro, desorganização ou catatonia. Exclusão de insuficiência renal ou causa medicamentosa.
8	Comprometimento cerebral	Alteração das funções mentais com distúrbios de orientação, da memória ou outra de aparecimento súbito. Exclusão de causas infecciosas, metabólica ou medicamentosa.
8	Distúrbios visuais	Nódulos, hemorragia retiniana exsudato seroso ou hemorragia coroidiana, neurite óptica. Exclusão de causas hipertensivas, medicamentosas ou infecciosas.
8	Nervos cranianos	Neuropatia sensitiva ou motora de aparecimento recente atingindo um nervo craniano
8	Cefaléia	Severa e persistente, podendo ser migranosa, resistente aos analgésicos comuns.
8	AVC	Acidente vascular cerebral recente, excluída arteriosclerose.
8	Vasculite	Ulcerações, gangrena, nódulos digitais dolorosos, infartos peri-ungueais ou prova histológica ou arteriográfica de vasculite.
4	Artrite	Mais de duas articulações dolorosas com sinais inflamatórios locais (dor, edema ou rigidez articular).
4	Miosite	Dor/fraqueza muscular proximal associada à uma elevação de CK ou aldolase ou à modificações eletromiográficas ou à uma biópsia mostrando sinais de miosite.
4	Cilindros urinários	Cilindros de glóbulos vermelhos
4	Hematúria	> 5 hemácias / campo ausência de litíase, infecção ou outra causa.
4	Proteinúria	> 0,5 g/24h. Aparecimento recente ou piora recente de mais de 0,5g/24h
4	Piúria	> 5 leucócitos/ campo na ausência de infecção
2	Rash	Aparecimento recente ou recidiva de uma erupção cutânea inflamatória
2	Alopécia	Aparecimento recente ou recidiva de uma alopecia em placa ou difusa
2	Úlceras mucosas	Aparecimento recente ou recidiva de úlceras orais ou nasais
2	Pleurisia	Dor torácica de origem pleural com atrito, derrame ou espessamento pleural.
2	Pericardite	Dor pericárdica com ao menos uma das manifestações seguintes: atrito, derrame ou confirmação eletrográfica ou ecográfica.
2	Complemento	Diminuição do CH50, C3 ou C4
2	Anti-DNA	Positividade superior à taxa normal do laboratório
1	Febre	> 38° na ausência de causa infecciosa
1	Leucopenia	< 3000 leucócitos na ausência de causa medicamentosa
1	Plaquetopenia	< 100.000/mm <sup>3</sup>

\*Aparecimento recente é considerado quando o quadro iniciou até 10 dias antes da consulta na qual está sendo feita a avaliação

## ANEXO C-Índice de Dano para LES-SLICC

ÍNDICE DE DANO PARA LES\* - SLICC/ACR

TOTAL:

Ítem	Score
<b>Ocular</b>	
Catarata	1
Alterações retinianas ou atrofia óptica	1
<b>Neuropsiquiátrico</b>	
Déficit cognitivo (déficit de memória, dificuldade com cálculos, na linguagem falada ou escrita ou de concentração, comprometimento do nível de desempenho) ou psicose maior	1
Convulsões que requerem tratamento por 6 meses	1 (2)
Acidente vascular cerebral (score deve ser 2 se > 1 episódio)	1
Neuropatia craniana ou periférica (exceto do nervo óptico)	1
Mielite transversa	
<b>Renal</b>	
Taxa de filtração glomerular estimada ou mensurada < 50%	1
Proteinúria ≥ 3,5g/24h	1
Doença renal estágio final (independente de diálise ou transplante)	3
<b>Pulmonar</b>	
Hipertensão Pulmonar (aumento ventrículo direito ou hiperfonese de P2)	1
Fibrose pulmonar (exame físico e radiográfico)	1
Pulmão retraído (radiográfico)	1
Fibrose pleural (radiográfico)	1
Infarto pulmonar (radiográfico)	1
<b>Cardiovascular</b>	
Angina ou bypass de artéria coronária	1
Infarto do miocárdio score deve ser 2 se > 1 episódio)	1 (2)
Miocardiopatia (disfunção ventricular)	1
Doença valvular (sopro diastólico ou sistólico > 3/6)	1
Pericardite por 6 meses, ou pericardiectomia	1
<b>Doença vascular periférica</b>	
Claudicação por 6 meses	1
Perda menor de tecido (tamanho de uma polpa digital)	1
Perda significativa de tecido (p.ex. perda de dedo ou membro) (score deve ser 2 se > de 1 local)	1 (2)
Trombose venosa com edema, ulceração ou estase venosa	1
<b>Gastrointestinal</b>	
Infarto ou ressecção de intestino abaixo do duodeno, baço, fígado ou bexiga, de qualquer causa (score deve ser 2 se > 1 local)	1 (2)
Insuficiência mesentérica	1
Peritonite crônica	1
Estenose ou cirurgia do trato superior	1
<b>Musculoesquelética</b>	
Atrofia ou fraqueza muscular	1
Deformidade ou artrite erosiva (incluindo deformidades redutíveis, excluindo necrose avascular)	1
Osteoporose com fratura ou colapso vertebral (excluindo necrose avascular)	1 (2)
Necrose avascular (score 2 se >1)	1
Osteomielite	
<b>Pele</b>	
Alopecia cicatricial crônica	1
Cicatriz extensa ou paniculite (em outros locais que não escalpe ou pulp space)	1
Ulceração pele (excluindo trombose) por > 6 meses	1
Insuficiência gonadal prematura	1

<b>Diabetes (independente do tratamento)</b>	<b>1</b>
<b>Malignidade (excluindo displasia) (score 2 se &gt; 1 local)</b>	<b>1 (2)</b>

\*Dano (alteração irreversível, não relacionada com inflamação) ocorrendo desde o início do LES, identificada por avaliação clínica e presente por pelo menos 6 meses a menos que colocado de outra forma. Episódios repetidos que ocorrem em menos de 6 meses devem receber score 2. A mesma lesão não deve ser pontuada duas vezes.