UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

**Ativação dos neutrófilos de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico sobre células
endoteliais *in vitro*: implicações na lesão tecidual mediada por imunocomplexos**

Leandro Sobrinho Avila

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São
Paulo como parte das exigências para obtenção do título
de Mestre em Ciências. Área de Concentração:
Imunologia Básica e Aplicada.

Orientadora: Prof. Dra. Cleni Mara Marzocchi Machado

RIBEIRÃO PRETO - SP

2016

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Avila, Leandro Sobrinho

Ativação dos neutrófilos de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico sobre células endoteliais *in vitro*: implicações na lesão tecidual mediada por imunocomplexos / Leandro Sobrinho Avila; orientadora Cleni Mara Marzocchi Machado. – Ribeirão Preto, 2016

f.90 :il.

Dissertação de mestrado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ USP.

Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada

1. Lúpus Eritematoso sistêmico
2. Células Endoteliais.
3. *Burst* oxidativo.

Folha de Aprovação

Nome: Avila, Leandro Sobrinho

Título: Ativação dos neutrófilos de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico sobre células endoteliais *in vitro*: implicações na lesão tecidual mediada por imunocomplexos.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada para obtenção do título de mestre em Ciências

Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada

Orientadora: Profa. Dra. Cleni Mara Marzocchi Machado

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

**Dedico este trabalho aos meus pais,
meus maiores incentivadores. Vocês
sempre foram minha maior inspiração
de dedicação, honestidade e força.**

AGRADECIMENTOS

À minha mãe Márcia Raquel Sobrinho Avila, meu pai Adroaldo Calves de Avila e aos meus irmãos Cleiton Sobrinho Avila e Eric Sobrinho Avila, sempre me guiando pelos melhores caminhos e me dando apoio aos meus sonhos, que se concretizam em parte na realização deste trabalho.

À Profa Dra. Cleni Mara Marzocchi Machado, por acreditar na minha capacidade e por possibilitar meu ingresso na Universidade de São Paulo, grato pela orientação científica que nunca esqueceu o lado humano.

A todos os docentes da pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP pelos ensinamentos passados durante as disciplinas do curso que certamente ajudaram no meu aprimoramento acadêmico e científico.

Aos meus amigos do programa em Imunologia Básica e Aplicada da FMRP-USP Rafaela Felício, Amanda Goulart, Luna Lacerda, Josiane Carvalho, Rômulo Oliveira, Pedro Alexandre Sampaio, Ítala Silva, Mouzarllen Barros, Bruna Bertol e Naira Anchieta que fizeram dessa jornada uma experiência única, nossa amizade tornou tudo mais fácil e prazeroso.

Aos meus colegas de laboratório do Programa de Biociências Aplicadas à Farmácia da FCFRP-USP Gisele Lelis, Carlos Eduardo Mendonça, Nathália Cristina Canicoba, Bruna Archangelo, Gabriel Nogueira, João Rodrigues, Eliza Vieira e à Dra. Juliana Toller Kawahisa por fazerem do convívio diário, leve e alegre. Grato pela ajuda nos experimentos, e pela forma respeitosa e acolhedora que sempre fui tratado.

À minha amiga Júlia Cunha Gonzales do Programa de Biociências Aplicadas à Farmácia da FCFRP-USP por compartilhar comigo desde a graduação o desejo real de se tornar cada vez melhor, profissional e pessoalmente.

Ao Prof. Dr. Paulo Louzada Júnior do Departamento de Clínica Médica da FMRP-USP, por disponibilizar o laboratório de reumatologia do Hospital das Clínicas da FMRP – USP, bem como os residentes que auxiliaram no recrutamento das pacientes para realização das coletas.

Aos voluntários e pacientes que se disponibilizaram em participar deste trabalho.

À Profa. Dra. Maria Regina Torqueti da FCFRP-USP por disponibilizar a infraestrutura de seu laboratório para a realização da cultura de células.

À Profa. Dra. Yara Maria Lucisano Valim da FCFRP-USP e toda sua equipe de técnicos e alunos por disponibilizar a infraestrutura de seu laboratório para realização de leituras por espectrofotometria e possibilitar a armazenagem de amostras.

À biomédica Fabiana Rossetto de Moraes da FCFRP-USP, pelo auxílio nas leituras em citometria de fluxo.

Aos coordenadores e funcionários do programa de pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada, em especial à secretária Ana Cristine Ferreira pelo auxílio com os prazos e pelo carinho com que sempre me atendeu.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela bolsa concedida.

Apoio, suporte e financiamento

Este projeto foi desenvolvido no Laboratório de Imunologia e Fluidos Biológicos coordenado pela Profa. Dra. Cleni Mara Marzocchi Machado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**Capes**)

Jamais considere seus estudos como uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável para aprender a conhecer a influência libertadora da beleza do reino do espírito, para seu próprio prazer pessoal e para proveito da comunidade à qual seu futuro trabalho pertencer.

Albert Einstein

Avila, LS. **Ativação dos neutrófilos de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico sobre células endoteliais *in vitro*: implicações na lesão tecidual mediada por imunocomplexos.** Dissertação de mestrado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 2016, 90 f.

RESUMO

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença autoimune e protótipo das doenças por imunocomplexos (IC). A deposição de IC em tecidos ou órgãos leva a um processo inflamatório crônico, que resulta em lesão tecidual. A fisiopatologia deste processo envolve principalmente o sistema do complemento (SC), receptores de IgG (FcγR), neutrófilos e moléculas de adesão. Os produtos de ativação SC atraem os neutrófilos para o foco inflamatório e sua interação com os IC depositados resulta na liberação de espécies reativas de oxigênio (ERO) e das enzimas dos neutrófilos sobre os tecidos. As ERO podem levar a danos nas estruturas celulares devido ao estresse oxidativo, resultando na exposição de autoantígenos e sustentação da autoimunidade. Várias anormalidades envolvendo neutrófilos, função e expressão dos FcγR e CR foram descritas no LES. O objetivo deste estudo foi avaliar se essas alterações podem ter implicações para o dano tecidual através do depósito de IC. Devido à importância das interações neutrófilo-endotélio-SC para a inflamação e lesão tecidual por IC no LES, este estudo propôs avaliar o efeito da ativação de neutrófilos e produtos do SC sobre as células endoteliais *in vitro*. Os resultados mostram que a exposição das células endoteliais aos neutrófilos/LES ativo, sem estímulo, resulta em maior peroxidação lipídica comparada com o controle espontâneo, o que não foi observado com neutrófilos/saudáveis. Contudo, na presença de IC/SHN, a peroxidação lipídica foi maior quando as células endoteliais foram expostas aos neutrófilos/LES inativo comparada ao controle espontâneo. O efeito da ativação dos neutrófilos, em todos os grupos, sobre a peroxidação lipídica das células endoteliais foi dependente da opsonização dos IC pelo complemento (IC/SHN), uma vez que não foi observado quando as proteínas do complemento foram inativadas (IC/SHI). Não houve diferença na produção de ERO entre os neutrófilos dos grupos estudados. Observou-se menor expressão dos FcγRIIa (CD32) e CR1 em neutrófilos/LES ativo, quando comparados com o grupo controle. Houve maior liberação de catalase pelos neutrófilos/LES, quando estes foram estimulados via FcγR, e maior produção de glutatona por neutrófilos/LES inativo quando estas células foram estimuladas via FcγR e CR. A expressão de ICAM-1 não foi diferente entre os grupos de neutrófilos, entretanto foi menor na ausência de complemento. Não houve diferença na medida da ativação da via clássica do complemento avaliada pelo fragmento C4d. Estes resultados mostram que as células endoteliais são mais suscetíveis à peroxidação lipídica na presença de neutrófilos/LES. Contudo, quando o complemento do soro é inativado, esta suscetibilidade desaparece, bem como há menor liberação de ICAM-1 por todos os grupos de neutrófilos e maior liberação de catalase por neutrófilos/LES. A interação dos neutrófilos/LES com células endoteliais pode ser deletéria para este último e depender da atividade das proteínas do sistema complemento. O modelo desenvolvido neste estudo pode contribuir para a compreensão do envolvimento dos neutrófilos e do SC nas lesões teciduais no LES.

Palavras-chave: lúpus eritematoso sistêmico; células endoteliais; *burst* oxidativo

Avila, LS. **Activation of neutrophils from patients with systemic lupus erythematosus on endothelial cells in vitro: implications for tissue injury mediated by immune complexes** [dissertation] Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, 2016. 90 f.

ABSTRACT

Systemic lupus erythematosus (SLE) is an autoimmune disease and prototype of immune complex diseases (IC). The deposition of IC in tissues or organs leads to a chronic inflammatory process, which results in tissue injury. The pathophysiology of this process mainly involves the complement system (SC), IgG (Fc γ R) receptors, neutrophils and adhesion molecules. SC activation products attract neutrophils to the inflammatory focus and their interaction with deposited IC results in the release of reactive oxygen species (ROS) and neutrophil enzymes into tissues. ROS can lead to damage to cell structures due to oxidative stress, resulting in the exposure of autoantigens and the support of autoimmunity. Several abnormalities involving neutrophils, function and expression of Fc γ R and CR have been described in SLE. The aim of this study was to assess whether these changes may have implications for tissue damage through the deposition of IC. Due to the importance of neutrophil-endothelial-SC interactions for inflammation and tissue damage by IC in SLE, this study proposed to evaluate the effect of the activation of neutrophils and SC products on endothelial cells in vitro. The results show that exposure of endothelial cells to active neutrophils / SLE without stimulus results in higher lipid peroxidation compared to spontaneous control, which was not observed with neutrophils / healthy. However, in the presence of IC / complement from normal human serum (NHS), lipid peroxidation was greater when endothelial cells were exposed to inactive neutrophils / SLE compared to spontaneous control. The effect of neutrophil activation in all groups on endothelial cell lipid peroxidation was dependent on IC with complement (IC / NHS), as it was not observed when complement proteins were inactivated (IC / INHS). There was no difference in ROS production among the neutrophils of the studied groups. Lower expression of Fc γ RIIa (CD32) and CR1 in active neutrophils / SLE, when compared with the control group, was observed. There was greater release of catalase by neutrophils / SLE, when they were stimulated via Fc γ R, and increased production of glutathione by neutrophils / inactive SLE when these cells were stimulated via Fc γ R and CR. There was no difference in expression of ICAM-1 between the neutrophil groups, however it was lower in the absence of complement. There was no difference in the extent of the activation of the classical complement pathway evaluated by the C4d fragment. These results show that endothelial cells are more susceptible to lipid peroxidation in the presence of neutrophils / SLE. However, when serum complement is inactivated, this susceptibility disappears, as well as there is a lower release of ICAM-1 by all neutrophil groups and greater release of catalase by neutrophils / SLE. The interaction of neutrophils / SLE with endothelial cells may be deleterious to the latter and depends on the activity of the complement system proteins. The model developed in this study may contribute to the understanding of neutrophil and SC involvement in tissue lesions in SLE.

Keywords: systemic lupus erythematosus, endothelial cells, oxidative burst

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Avaliação da peroxidação lipídica pela quantificação da concentração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	44
Figura 2. Avaliação da peroxidação lipídica pela quantificação da concentração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	45
Figura 3. Citograma bidirecional. Células do sangue total de um indivíduo saudável, separadas de acordo com seu tamanho e complexidade por meio de citometria de fluxo.....	46
Figura 4. Representação dos histogramas de fluorescência dos receptores de superfície celular em neutrófilos marcados com anticorpo anti-receptor específico e analisados por citometria de fluxo.....	47
Figura 5 – Expressão dos FcγR e CR em neutrófilos avaliada por citometria de fluxo – intensidade de fluorescência por célula.....	48
Figura 6 – Expressão dos FcγR e CR em neutrófilos avaliada por citometria de fluxo – porcentagem de células positivas.....	49
Figura 7 – Representação dos perfis de quimioluminescência (QL) dos neutrófilos dependente de luminol.....	50
Figura 8 – Quimioluminescência (QL) de neutrófilos dependente de luminol – controle e LES.....	51
Figura 9 – Quimioluminescência (QL) de neutrófilos dependente de luminol – controle, LES ativo e LES inativo.....	52
Figura 10 – Representação dos perfis de quimioluminescência (QL).....	53
Figura 11 – Atividade da catalase liberada pelos neutrófilos durante exposição às células endoteliais <i>in vitro</i>	55
Figura 12 – Concentração da glutathiona total liberada pelos neutrófilos durante exposição às células endoteliais <i>in vitro</i>	57
Figura 13 – Quantificação de ICAM-1 solúvel liberada por células endoteliais <i>in vitro</i> durante exposição à neutrófilos.....	58
Figura 14 – Quantificação do fragmento C4d do complemento liberado a partir da ativação do sistema complemento (via clássica) durante exposição de neutrófilos às células endoteliais <i>in vitro</i>	60
Figura suplementar 1 – Quimioluminescência (QL) de neutrófilos dependentes de luminol.....	82

Figura suplementar 2 – Quimioluminescência (QL) de neutrófilos dependentes de luminol.....	83
Figura suplementar 3 – Curva de concentração da catalase (atividade enzimática).....	84
Figura suplementar 4 – Curva de concentração de ICAM-1 solúvel.....	84
Figura suplementar 5 – Curva de concentração de glutatona total.....	85
Figura suplementar 6 – Curva de concentração do fragmento C4d.....	85
Figura suplementar 7 – Curva da concentração do malonaldeído.....	86
Fluxograma 1	32

LISTA DE ABREVIATURAS

ADCC	Citotoxicidade dependente de anticorpo
ANOVA	Análise de variância
ANA	Anticorpo antinuclear
BSA	Albumina de soro bovino (<i>bovine serum albumin</i>)
CD	<i>Cluster</i> de diferenciação
cpm	Contagem de fótons por minuto
CR	Receptor para complemento
CR1, CR3	Receptor para complemento tipo 1 e 3
C3a, C5a C3bi, C4d C5b-9	Fragmentos de ativação do sistema complemento
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNTB	5-5'-dithio-bis (ácido 2-nitrobenzóico)
DO	Densidade ótica
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
ERO	Espécie(s) reativa(s) de oxigênio
Fc	Fragmento cristalizável da molécula de anticorpo
FcγR	Receptor para a porção Fc de IgG
FcγRI, FcγRII FcγRIII	Isoformas de receptores Fcγ
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
G-CSF	Fator estimulador de colônia de granulócitos
GSH	Glutathione reduzida
GSSH	Glutathione oxidada
HUVEC	Célula endotelial de veia de cordão umbilical (<i>human umbilical vein endothelial cell</i>)
IC	Imunocomplexo (s)
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular – 1 (<i>do inglês, intercellular adhesion molecule 1</i>)
IgG	Imunoglobulina G
IL-8	Interleucina 8
LES	Lúpus Eritematoso Sistêmico

Mac-1	Antígeno macrófago-1 (<i>macrophage-1 antigen</i>)
MDA	Malondialdeído
MPO	Mieloperoxidase
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase - reduzida
NET	<i>Neutrophil extracellular trap</i>
PBS	Salina tamponada com fosfato
QL	Quimioluminescência
SHN	Soro humano normal
SHI	Soro humano normal inativado
SC	Sistema complemento
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao TBA
UV	Ultravioleta
VCAM-1	Molécula de adesão à célula vascular-1 (<i>vascular cell adhesion molecule-1</i>)
VLA-4	<i>Very late antigen 4</i>

SUMÁRIO

RESUMO.....	I
ABSTRACT.....	II
LISTA DE FIGURAS.....	III
LISTA DE ABREVIATURAS.....	V
1. Introdução.....	15
1.1 Formação de imunocomplexos e o lúpus eritematoso sistêmico.....	16
1.2 Receptores FcγR e CR e sua interação.....	18
1.3 Neutrófilo - <i>burst</i> oxidativo e sistemas antioxidantes.....	20
1.3 Relação neutrófilo, endotélio e sistema complemento.....	25
2. Objetivos.....	28
2.1 Objetivo Geral.....	29
2.2 Objetivos específicos.....	29
3. Casuística.....	30
3.1 Pacientes com LES e Participantes Saudáveis.....	31
3.2 Parturientes doadoras de cordão umbilical.....	32
4. Métodos.....	33
4.1 Amostras de sangue para fonte de neutrófilos e soro.....	33
4.2 Obtenção de neutrófilos.....	33
4.3 Obtenção do soro humano para opsonização (<i>pool</i> de soro humano normal/inativado).....	34
4.4 Imunocomplexos.....	34
4.5 Produção de ERO medida por quimioluminescência dependente de luminol (<i>Burst</i> oxidativo).....	35
4.6 Expressão dos receptores Fcγ e dos receptores para complemento em neutrófilos por citometria de fluxo.....	36
4.7 Cultura de células endoteliais de cordão umbilical humano (HUVEC – <i>human umbilical vein endothelial cells</i>).....	37
4.8 Cultura celular em poços individuais (plaqueamento).....	38
4.9 Quantificação de CD31 nas células endoteliais.....	39
4.10 Ensaio de exposição dos produtos de ativação do neutrófilo às células endoteliais.....	39
4.11 Avaliação de peroxidação lipídica (lesão tecidual).....	40
4.12 Avaliação da atividade da catalase.....	40
4.13 Avaliação da glutatona total.....	40
4.14 Quantificação do fragmento C4d (avaliação da ativação da via clássica).....	41
4.15 Quantificação de ICAM-1 solúvel.....	42
5. Resultados.....	43
5.1 Avaliação da peroxidação lipídica – Marcador de lesão endotelial.....	44
5.2 Análise da expressão dos receptores Fcγ e dos receptores para complemento em neutrófilos.....	46
5.3 Análise do <i>burst</i> oxidativo de neutrófilos.....	49
5.4. Análise da atividade da catalase.....	54
5.5. Análise da glutatona total.....	56
5.6. Quantificação de ICAM-1 solúvel – Marcador de ativação endotelial.....	58
5.7. Quantificação do fragmento C4d – Marcador de ativação da via clássica do complemento.....	59
6. Discussão.....	61
7. Conclusões.....	68
8. Referências.....	70
9. Material Suplementar.....	80
Anexo 1. Aprovação do protocolo de pesquisa pelo Comitê de Ética	89

1. Introdução

1. Introdução

1.1 Formação de imunocomplexos e o lúpus eritematoso sistêmico

A formação de imunocomplexos (IC) é dada pela interação de antígenos com anticorpos específicos. Esta reação é um importante mecanismo de defesa do sistema imunológico, geralmente acompanhada por reações secundárias, que têm como objetivos neutralizar e eliminar microrganismos patogênicos e partículas estranhas. A eliminação dos IC impede que eles sejam depositados e causem danos aos tecidos do hospedeiro, uma vez que estas partículas podem ser fagocitadas por células do sistema imunológico que os reconhecem de diversas formas. A dinâmica desses processos envolve o sistema complemento (SC), componentes solúveis e células fagocíticas, como macrófagos e neutrófilos por meio de receptores para o complemento (CR) e receptores para IgG (FcγR) (Hebert, 1991; Marzocchi-Machado C.M., 1997).

Os IC podem ser retirados da circulação por meio das hemácias que transportam essas partículas até o baço, onde são fagocitadas por macrófagos residentes. A formação de IC promove a ativação da via clássica do complemento que impede a formação de grandes partículas, por sua vez a via alternativa auxilia na solubilização de IC já formados (Marzocchi-Machado C.M., 1997). Após esta ativação as opsoninas são integradas aos IC, o que permite o seu reconhecimento por meio do receptor para complemento do tipo 1 (CR1) presente em eritrócitos. A opsonização das proteínas do complemento aos IC permite seu reconhecimento por meio do receptor para complemento do tipo 1 (CR1) expresso em eritrócitos (Hebert, 1991). Em situação fisiológica, este é um sistema eficiente de depuração (*clearance*) de IC, impedindo a deposição de grandes partículas sobre os tecidos.

Contudo, em alguns casos pode haver deposição dos IC sobre o tecido, seja por deficiência genética de um ou mais componentes da via clássica do complemento, fagocitose defeituosa ou inabilidade dos IC em ativarem o sistema complemento (Davies, Schifferli, & Walport, 1994). Alguns sítios anatômicos são mais suscetíveis à deposição dos IC, como glomérulos, sinóvia e tecido perivascular, onde o plasma é ultrafiltrado sob alta pressão hidrostática. Os IC depositados nos tecidos promovem a ativação local do complemento e a geração dos fragmentos C3a e C5a estimulam o acúmulo de neutrófilos no sítio de deposição, por promoverem quimiotaxia e aumento na permeabilidade vascular. Então, o influxo

aumentado de neutrófilos e a lesão tecidual sustentam o processo inflamatório crônico (Mayadas, Tsokos, & Tsuboi, 2009).

A deposição de IC nos tecidos é um mecanismo inicial da geração de inflamação que ocorre em algumas doenças e está intimamente relacionada com doenças autoimunes, como artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistêmico (LES) e febre reumática, e também na resposta inicial da rejeição de órgãos transplantados (Tsuboi, Asano, Lauterbach, & Mayadas, 2008). O LES é o protótipo das doenças mediadas por IC (Koffler, Agnello, Thoburn, & Kunkel, 1971). Caracteriza-se por ser uma doença autoimune inflamatória crônica de etiologia desconhecida que envolve vários órgãos e resulta de uma interface de múltiplos fatores genéticos, hormonais e ambientais (Lisnevskaja L, 2014). Dentre as alterações do sistema imunológico no LES destacam-se o *clearance* ineficiente de IC, diminuição da fagocitose defeitos na quimiotaxia de neutrófilos (Cuchacovich & Gedalia, 2009; Vigato-Ferreira, 2012), redução da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Alves et al., 2008; C.M. et al., 2002) redução da expressão de FcγR e CR, ativação imprópria de linfócitos B e T (Marzocchi-Machado et al., 2005; Mok & Lau, 2003), neutropenia, linfocitopenia, hipocomplementemia (Iliopoulos & Tsokos, 1996) e polimorfismos genéticos (Toller-Kawahisa J.E., 2014; J. E. Toller-Kawahisa, 2012; Vigato-Ferreira I.C., 2014). A suscetibilidade ao LES é determinada por variações em múltiplos *loci*, isoladamente incapazes de desencadear a doença, além disso, apresentam frequências variadas entre diferentes populações (Ferreiros-Vidal I., 2007). Portanto, vários fatores são considerados cruciais para o desencadeamento do lúpus – genéticos, imunológicos e ambientais – e quando atingem um limiar favorável, propiciam o aparecimento da doença. Contudo sua etiologia continua não elucidada completamente (Rhodes & Vyse, 2008). Fatores externos podem aumentar as chances de desenvolvimento do LES, por exemplo, luz ultravioleta (UV), substâncias químicas e infecções (Bertsias G., 2012).

Com maior incidência em mulheres (9 mulheres : 1 homem) especialmente em idade fértil, o LES é caracterizado pela produção de autoanticorpos que tem como alvo vários antígenos próprios: antígenos nucleares, macromoléculas citoplasmáticas, componentes lipídicos e proteínas plasmáticas, culminando com formação e deposição de IC em vários órgãos, como rins e pele, e também nas articulações (X. Li, Ptacek, Brown, & Edberg, 2009).

O principal evento que precede o desencadeamento de várias doenças autoimunes é a perda de tolerância do linfócito B (Arbuckle et al., 2003) e que pode também contribuir para a

patogênese do LES (Palanichamy et al., 2014). Após a perda da autotolerância, na fase pré-clínica do LES, o paciente passa a produzir autoanticorpos, este evento inicial é comum em outras doenças autoimunes. Já a fase clínica é caracterizada pelo aparecimento de manifestações específicas da doença: produção de anticorpos antinucleares (ANA) de padrão homogêneo e manifestações clínicas clássicas, como *rash* malar, artrite e nefrite (Bertsias G., 2012)

As doenças infecciosas são causas comuns de complicações no LES, representando 20-55% das mortes, sendo que 80% destas causas são especificamente por infecções bacterianas (Cuchacovich & Gedalia, 2009). A susceptibilidade às infecções está associada às próprias anormalidades imunológicas da doença (Staples, Gerding, Decker, & Gordon, 1974; Willcocks, Smith, & Clatworthy, 2009), bem como sua terapia, sabidamente imunossupressora e citotóxica (Boumpas, Paliogianni, Anastassiou, & Balow, 1991; Zandman-Goddard & Shoenfeld, 2003; Zonana-Nacach et al., 2001). Dentre as anormalidades imunológicas que são comumente vistas na doença e que contribuem para as infecções no LES destacam-se o *clearance* ineficiente de IC e consequentemente de bactérias opsonizadas, deficiências congênitas ou adquiridas do complemento (Mascart-Lemone et al., 1983), diminuição de quimiotaxia e fagocitose por neutrófilos (Clark, Kimball, & Decker, 1974; Phillips, Lomnitzer, Wadee, & Rabson, 1985). Estas anormalidades podem estar envolvidas com as várias anormalidades envolvendo os receptores FcγR e CR que têm sido descritas no LES, e que contribuem para a fisiopatologia da doença (Cuchacovich & Gedalia, 2009; Iliopoulos & Tsokos, 1996).

1.2 Receptores FcγR e CR e sua interação

A porção Fc (fragmento cristalizável) da IgG pode ser reconhecida por receptores FcγR presentes na membrana de várias células do sistema imunológico, dentre elas, os neutrófilos (Jovanovic, Dai, Lim, Kemeny, & MacAry, 2009), e a interação deste receptores com agregados de imunoglobulinas ativam diversas respostas imunes humorais e celulares: citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC), regulação de células B, inflamação, fagocitose (Ramsland et al., 2011), desgranulação, regulação da transcrição e da expressão de citocinas, *burst* oxidativo e *clearance* de IC (X. Li et al., 2009)

Os Fc γ R pertencem à superfamília das imunoglobulinas e, em humanos, são divididos em três classes, sendo elas, Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32) e Fc γ RIII (CD16) (Bruhns et al., 2009). Os receptores Fc γ R contêm moléculas estrutural e bioquimicamente distintas, diferindo quanto a sua distribuição celular e afinidade para as subclasses de IgG. Podem ainda ser subdivididos em isoformas, tais como Fc γ RIIa, Fc γ RIIb, Fc γ RIIc, Fc γ RIIIa e Fc γ RIIIb (X. Li et al., 2009; Niederer, Clatworthy, Willcocks, & Smith, 2010). A variabilidade nos genes que codificam os Fc γ R é capaz de alterar a capacidade de reconhecimento de anticorpos, e consequentemente a eficiência nos fagócitos no *clearance* de IC. Essa variação constitui fator genético e funcional associados à suscetibilidade ao LES (Salmon, Edberg, Brogle, & Kimberly, 1992)

Os fagócitos também expressam em suas membranas, receptores para componentes solúveis do complemento (CR), que auxiliam no processo de fagocitose por meio do reconhecimento de partículas que estão opsonizadas por tais componentes. Os receptores são: CR1 (CD35), CR2 (CD21), CR3 (CD11b/CD18; Mac-1) e CR4 (CD11c/CD18). De forma geral os CR apresentam duas subunidades, sendo uma delas um dímero comum a todos estes receptores (CD18) e outra subunidade variável (CD11 a, b, c, d) (Dunkelberger & Song, 2010). Os neutrófilos expressam os receptores CR1 e CR3 (Huang et al., 2011). O CR1 (CD35) é expresso em eritrócitos, neutrófilos, monócitos, eosinófilos e linfócitos B e T (Fearon, 1980). Este receptor tem como principal função promover a fagocitose de partículas opsonizadas principalmente por C3b e C4b (Medof, Iida, Mold, & Nussenzweig, 1982) e a eliminação de IC da circulação pelos eritrócitos (Schifferli, Ng, & Peters, 1986). A ativação do CR1 também desencadeia a transdução de sinais relacionados à ativação de mecanismos microbicidas (Ricklin, Hajishengallis, Yang, & Lambris, 2010). Outro papel importante do CR1 é mediar a aderência dos IC, para facilitar o seu *clearance* e aumentar a concentração de IC na superfície celular melhorando a interação entre os anticorpos e os Fc γ R (Fearon, 1980; Schifferli et al., 1986).

O CR3 (CD11b/CD18; Mac-1) é um heterodímero membro da família β 2 das integrinas, composto por uma única cadeia α (CD11b) ligada não covalentemente a uma cadeia β (CD18), expresso primariamente em neutrófilos, monócitos e macrófagos (Kohl, 2006). Ele promove a fagocitose de microrganismos opsonizados pelo fragmento iC3b (fragmento inativado do C3b do complemento) (Beller, Springer, & Schreiber, 1982).

Também se liga à molécula de adesão intracelular (ICAM-1) nas células endoteliais, aumentando o recrutamento dos neutrófilos ao local de infecção (Diamond et al., 1990).

FcγR e o CR3 atuam cooperativamente para estimular vias de sinalização intracelular que acionam a polimerização da actina, evento necessário para a fagocitose, e, ativam o complexo nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (NADPH). Esta enzima é responsável pelo *burst* oxidativo dos neutrófilos (Babior, 2004; Krauss et al., 1994). Foi observado que a presença de C3 reduz consideravelmente a quantidade necessária de ligação de IgG para induzir a fagocitose da partícula mediada por FcγR em monócitos (Schreiber, Parsons, McDermott, & Cooper, 1975). Além disso, o bloqueio da função do CR3 com anticorpos anti-CR3 reduz a fagocitose sem impedir a ligação do FcγR com a IgG (Brown, Bohnsack, & Gresham, 1988). O sinergismo entre os FcγR e CR é um importante mecanismo de ativação dos neutrófilos e consequentemente aprimora a defesa do hospedeiro, pois otimizam as funções efectoras dessas células (Mantovani, 1975; Zhou & Brown, 1994).

1.3 Neutrófilo - *burst* oxidativo e sistemas antioxidantes

Os neutrófilos constituem a primeira linha de defesa da imunidade inata contra partículas estranhas ao hospedeiro (patógenos e células) e são os leucócitos mais abundantes em humanos. A função primária dos neutrófilos é a fagocitose, para destruição e erradicação da partícula, mas eles também estão envolvidos no reparo tecidual. Para tanto, o neutrófilo é provido de sistemas oxidantes, que inclui o complexo enzimático NADPH oxidase, bem como um arsenal de enzimas proteolíticas e peptídeos antimicrobianos, envolvidos na destruição das partículas fagocitadas (Jaillon et al., 2013; Lofgren et al., 1999).

Essas células são originárias da linhagem mieloide, sendo classificadas como polimorfonucleares, assim como os eosinófilos e basófilos, por possuírem núcleo segmentado. Sua maturação acontece na medula óssea, e envolve fatores de crescimento como o fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF), e inclui vários estágios de desenvolvimento, desde pró-mielócitos, mielócitos e metamielócitos, até a completa maturação com a formação dos grânulos e a segmentação do núcleo (Bouma, Ancliff, Thrasher, & Burns, 2010; Cascao, Rosario, & Fonseca, 2009; Kuijpers, 2002).

Existem três tipos de grânulos no neutrófilo: azurófilos (primários), específicos (secundários) e terciários (gelatinase). Os azurófilos são os maiores e os primeiros grânulos

formados durante a maturação do neutrófilo. Contêm nesses grânulos, mieloperoxidase (MPO), lisozima, elastase e catepsina G. Os grânulos específicos têm tamanho intermediário e contêm lactoferrina. Os grânulos terciários são os menores e contêm algumas proteínas antimicrobianas. Os neutrófilos possuem vesículas secretórias, que são formadas por endocitose nos estágios finais de maturação, seu conteúdo consiste predominantemente de proteínas derivadas do plasma, como a albumina, e moléculas que se ligam à membrana do endotélio, essenciais durante a migração do neutrófilo ao sítio inflamatório (Faurschou & Borregaard, 2003).

A destruição de organismos patogênicos é realizada por uma série de passos bem coordenados que resultam na liberação dessas moléculas citotóxicas contidas nos grânulos citoplasmáticos, processo chamado desgranulação. Quando o neutrófilo é ativado, os grânulos azurófilos e específicos são mobilizados e se fundem com o fagossomo, o que contribui com as atividades antimicrobianas nesse compartimento (Amulic, Cazalet, Hayes, Metzler, & Zychlinsky, 2012).

Para exercerem suas funções efectoras, os neutrófilos deixam a circulação sanguínea por diapedese através do endotélio vascular, e migram em direção ao foco de infecção ou de lesão tecidual, por quimiotaxia. Este processo ocorre graças à capacidade dos neutrófilos de reconhecerem e serem ativados por quimiocinas, produtos bacterianos e peptídeos quimiotáticos gerados pela ativação do sistema complemento, que são liberados na proximidade do foco inflamatório (Ley, Laudanna, Cybulsky, & Nourshargh, 2007; Trouw & Daha, 2011). O reconhecimento do microrganismo opsonizado por fragmentos do complemento e/ou IgG pelos receptores específicos de membrana, facilita a ativação de neutrófilos e a fagocitose (Greenberg, Chang, & Silverstein, 1993). Durante a migração, ambos neutrófilos e endotélio participam ativamente de uma série de eventos que guiam os neutrófilos para regiões do endotélio permissivas à transmigração (Zarbock & Ley, 2008).

A etapa inicial da adesão ao endotélio envolve a captura (*tethering*) dos neutrófilos mediada pelas interações com glicoproteínas expressas nos leucócitos (L-selectinas), no endotélio inflamado (E-selectinas e P-selectinas) e nas plaquetas (P-selectinas), capazes de interagir com ligantes glicosilados. Em seguida, os neutrófilos rolam (*rolling*) sobre o endotélio, numa etapa mediada também por L-selectinas e P-selectinas e seus ligantes glicosilados. Então, os neutrófilos são arrastados (*arrest*) sobre o endotélio, por interações

com as $\beta 1$ e $\beta 2$ integrinas e seus respectivos ligantes, e há um aumento da adesão e espalhamento dos neutrófilos no endotélio (Rose, Alon, & Ginsberg, 2007).

Quando as integrinas dos neutrófilos, VLA-4 (*very late antigen 4*; $\alpha 4\beta 1$) e CD11b/CD18 ($\alpha m\beta 2$), interagem com seus respectivos ligantes no endotélio, a molécula de adesão de célula vascular (VCAM-1) e a molécula de adesão intercelular (ICAM-1), eventos de sinalização são desencadeados nas células endoteliais, que facilitam a transmigração dos neutrófilos (Ley et al., 2007; Rose et al., 2007). Portanto, a modulação das moléculas envolvidas neste processo afeta a migração dos neutrófilos para o foco inflamatório. Por exemplo, neutrófilos com deficiência da integrina CD11b/CD18 são incapazes de migrar através do endotélio, enquanto que o aumento da expressão de ICAM-1 favorece a adesão e migração dos neutrófilos por meio das junções intercelulares no endotélio (Phillipson et al., 2006).

Uma vez nos tecidos, os neutrófilos reconhecem as partículas a serem fagocitadas pelos receptores Fc γ R e CR na sua superfície, que interagem com as respectivas opsoninas - imunoglobulinas e/ou fragmentos do complemento - depositadas sobre a partícula alvo, dando início ao processo de fagocitose (Hebert, 1991; Marzocchi-Machado C.M., 1997)

A interação dos ligantes na partícula alvo com os Fc γ R e CR ativa os neutrófilos e estimula a fagocitose, desgranulação (liberação das enzimas dos grânulos, p.ex., elastase e lisozima) e produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) em um processo chamado *burst* oxidativo (Babior, 2004; Babior, Lambeth, & Nauseef, 2002). A enzima responsável pelo metabolismo oxidativo é a NADPH oxidase, um complexo de múltiplas subunidades que são reunidas na membrana do neutrófilo ativado (Quinn & Gauss, 2004). Esta enzima é composta por pelo menos sete proteínas que residem no citosol e em compartimentos de membrana em neutrófilos em repouso. Durante a ativação do neutrófilo, os componentes citosólicos translocam-se para a membrana do fagossomo e se associam com o componente de membrana flavocitocromo b558, para formar a NADPH oxidase (Klebanoff, 2005).

A iniciação da atividade da NADPH oxidase ocorre com o fechamento do vacúolo e coincide com a desgranulação, com uma diferença de apenas 20s entre os dois eventos (Segal, Dorling, & Coade, 1980). A ativação da NADPH oxidase resulta na redução do oxigênio molecular em ânion superóxido. O superóxido pode sofrer dismutação espontânea, formando o peróxido de hidrogênio. Além disso, com a desgranulação no fagossomo, a enzima mieloperoxidase liberada pode reagir com o peróxido de hidrogênio e produzir várias ERO

como o radical hidroxil, ácido hipocloroso e oxigênio *singlet* (Amulic et al., 2012). As ERO têm sido associadas como uma parte integrante dos eventos envolvidos na liberação de NET (do inglês, *neutrophil extracellular trap*). As NET são "armadilhas" extracelulares compostas principalmente por histonas, DNA e proteases, como a MPO, e têm como função conter e degradar os microrganismos (Kirchner T., 2012).

Embora o efeito benéfico da produção de ERO e NET tenha um papel fisiológico nas defesas do hospedeiro contra agentes infecciosos, uma produção excessiva pode resultar em um estresse oxidativo. Os radicais de oxigênio gerados têm potente ação oxidante sobre estruturas e compostos celulares, sendo capazes de oxidar membranas, inativar enzimas envolvidas no metabolismo bacteriano, gerar aldeídos tóxicos, quebrar cadeias de polinucleotídeos, bem como degradar bases púricas e pirimídicas nos ácidos nucleicos (Valko et al., 2007).

Quando os neutrófilos ingerem os alvos, seu arsenal citotóxico é liberado dentro do fagossomo, a fim de restringir a ação citotóxica aos patógenos e/ou células estranhas e assim evitar que o neutrófilo seja um mediador de danos a uma variedade de estruturas celulares sujeitas à ação destas células. Esta restrição também garante a manutenção da homeostase nas reações de oxi-redução (Hager, Cowland, & Borregaard, 2010; Nathan, 2006). Durante a ação do neutrófilo o superóxido normalmente não pode ser detectado no exterior das células fagocíticas (Segal & Meshulam, 1979; Thomas et al., 1992), a menos que o fechamento do vacúolo não aconteça de forma correta e conseqüentemente haja o extravasamento do conteúdo citotóxico dos neutrófilos no local onde estes se encontram. Respostas não controladas de neutrófilos podem exacerbar ou até mesmo causar doenças autoimunes e inflamatórias (Amulic et al., 2012).

O *clearance* ineficiente de imunocomplexos e a fagocitose defeituosa (frustrada) são comuns no LES e são características que podem ser resultantes da redução da expressão ou defeitos funcionais dos FcγR e dos CR. Diferentes manifestações clínicas no LES podem influenciar a produção de ânion superóxido mediada pela cooperação dos FcγR/CR (Alves et al., 2008). Além disso, sabe-se que há uma redução do burst oxidativo de neutrófilos mediado por FcγR e/ou CR (C.M. et al., 2002)

Fisiologicamente, a quantidade de compostos citotóxicos que extravasam para o meio extracelular é rapidamente neutralizado por anti-proteinases existentes no fluido intersticial. No entanto, existem circunstâncias nas quais o conteúdo citotóxico dos neutrófilos extravasa

em quantidades excessivas, processo chama de estresse oxidativo. Ocorre principalmente nos processos inflamatórios crônicos, resultando em lesão tecidual e perda da função dos órgãos afetados (Hager et al., 2010; Moraes, Zurawska, & Downey, 2006; Nathan, 2006).

Como um mecanismo de proteção contra o dano, o próprio estresse oxidativo, regula negativamente a geração de oxidantes, sendo capaz de ativar cascatas de transdução de sinal nessas células que aumentam a transcrição de fatores de resposta *redox* (Droge, 2006). Portanto as próprias células são providas de sistemas antioxidantes que incluem, várias enzimas capazes neutralizar ERO geradas no meio. Incluem agentes neutralizantes de hidroperóxidos como a catalase e glutathione peroxidase, agentes hidrofílicos como a glutathione (GSH), e lipofílicos como flavonoides, carotenoides e tocoferóis. (Castro & Freeman, 2001).

A glutathione reduzida (GSH) é um tripeptídeo produzido praticamente por todas as células, estrutura química possui um grupo tiol de baixo peso molecular, capaz de neutralizar diversos compostos oxidantes. Esta proteína interage rapidamente com radicais livres por meio da doação de um átomo de hidrogênio (Castro & Freeman, 2001). Durante sua ação a molécula de glutathione é oxidada e resulta na junção de duas moléculas de GSH (GSSG), a razão entre essas duas formas é uma importante forma de estimar o estado *redox* dos sistemas (Irshad & Chaudhuri, 2002).

A catalase, uma hemoproteína composta de quatro subunidades que tem a função de catalizar a decomposição do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água (Cheng, Kellogg, & Packer, 1981) de forma a regular a concentração desta ERO no interior das células e controlar um eventual efeito citotóxico (Goyal & Basak, 2010). Esta proteína, bem como a glutathione peroxidase, e a superóxido desmutase, agem na neutralização da oxidação de forma enzimática, enquanto a GSH age de forma não-enzimática (Barreiros & David, 2006).

Outra eficiente forma de proteção tecidual contra a possível ação deletéria das proteínas lançadas pelos neutrófilos no meio inflamado é por meio das antiproteínases. Os tecidos, normalmente, encontram-se envolvidos por fluidos ricos em antiproteínases, no entanto, nos processos inflamatórios crônicos, elas são completamente consumidas pelo excessivo influxo de neutrófilos (Babior, 1984; Weiss, 1989). Uma vez nos tecidos os neutrófilos liberam seus grânulos, e este evento é capaz de ativar o processo de *burst* oxidativo, por aumentar a expressão dos componentes da NADPH oxidase, aumentando as chances de lesão endotelial (Uriarte et al., 2011).

Neste caso, as células endoteliais são continuamente expostas à ação dos oxidantes e também dos produtos biologicamente ativos do complemento, os quais são rapidamente disponíveis na circulação quando ativados pelos IC. Os principais efeitos destes produtos é favorecer sua interação com leucócitos circulantes e promover a transmigração destas células para o foco inflamatório.

1.4 Relação neutrófilo, endotélio e sistema complemento

A precipitação dos IC dificulta a fagocitose pelos neutrófilos e isto resulta em liberação maciça das ERO e proteinases sobre o endotélio em função da fagocitose “frustrada”. Este é um mecanismo comum nas doenças mediadas por IC, onde a ineficiência dos mecanismos de *clearance* leva à deposição dessas partículas em órgãos vulneráveis.

Os anticorpos depositados levam à ativação da via clássica do complemento e os produtos da ativação interagem com as células endoteliais e estimulam a expressão de moléculas de adesão, bem como promovem a secreção de fatores pró-inflamatórios. Em particular, as moléculas de C3bi depositadas nas membranas das células endoteliais ligam-se ao CD11b/CD18 (CR3; Mac-1) nos neutrófilos, promovendo a interação rápida entre neutrófilos e endotélio (Lozada et al., 1995; Marks, Todd, & Ward, 1989; Mayadas et al., 2009).

Um dos marcadores da ativação da via clássica o fragmento C4d, vem sendo utilizado como marcador para monitoramento da atividade do LES, sendo que sua detecção pode se dar no plasma e no soro de pacientes (Buyon, Tamerius, Belmont, & Abramson, 1992; Manzi et al., 1996; Senaldi, Makinde, Vergani, & Isenberg, 1988), sua presença também pode estar associada com lesão tecidual, e também pode ser usado para monitoramento terapêutico (J. a. Li & Zhang, 2014). Também foram vistas associações deste componente do sistema complemento, como biomarcador para a estabilidade de transplantes. Contudo, sua função permanece não esclarecida (Nickeleit & Mihatsch, 2003).

Outra consequência do depósito de IC no endotélio é uma resposta inflamatória secundária, onde há ativação a cascata do complemento, que culmina na formação do complexo C5b-9 e destruição do endotélio (D'Cruz, 1998). A partir de lesões geradas no endotélio o dano a estas células são causados também por anticorpos direcionados contra as células endoteliais e aos fosfolipídeos de membrana das células (Tenedios, Erkan, &

Lockshin, 2005). Além disso, recentemente a mieloperoxidase (MPO) dos neutrófilos tem sido associada com agressão ao endotélio nos processos inflamatórios (Villanueva et al., 2011). A MPO é a enzima mais abundante dos neutrófilos e é liberada durante a desgranulação como um importante sistema oxidante microbicida.

Embora os neutrófilos tenham um papel importante nas respostas imunológicas inata e adaptativa, eles também estão envolvidos na patogênese de várias doenças inflamatórias tais como infecções, câncer e autoimunidade (Scapini P., 2014). Somando-se aos defeitos de quimiotaxia dos neutrófilos e anormalidades do sistema complemento no LES, há evidências de que disfunções nas células endoteliais constituam os fatores potenciais para iniciação do dano vascular no LES, pela deposição de IC (vasculite), que resulta em autoagressão e subsequente ativação do complemento (Guillevin & Dorner, 2007; Kluz, Kopec, Jakobsche-Policht, & Adamiec, 2009).

Apesar desta ação benéfica, a deposição da MPO no endotélio pode levar à geração de oxidantes no local, atrair e ativar mais neutrófilos, acelerando e amplificando o processo inflamatório. A deposição da MPO no endotélio requer o contato íntimo neutrófilo-endotélio e é dependente da integrina CR3, sugerindo um papel importante para o CR3 em mediar o dano tecidual (Jerke et al., 2013).

Um aumento da expressão de VCAM-1, ICAM-1 e E-selectina no endotélio e o dos respectivos receptores nos leucócitos foi associado à exacerbação do LES (Constans et al., 2003; Spronk, Bootsma, Huitema, Limburg, & Kallenberg, 1994; Takeuchi, Amano, Sekine, Koide, & Abe, 1993). Além disso, o número de células endoteliais circulantes e apoptose destas também têm sido considerados como marcadores do dano endotelial antes mesmo do aparecimento de sinais clínicos de vasculite no LES (Attia, Maaty, & Kalil, 2011; Clancy et al., 2001; Kluz et al., 2009; Rajagopalan et al., 2004).

Na vasculite por depósito de IC no LES, a tentativa de fagocitose dos IC pelos neutrófilos resulta em liberação das ERO e enzimas dos grânulos sobre o endotélio. A produção excessiva de ERO resulta em desequilíbrio entre os sistemas oxidantes e antioxidantes, responsáveis pelo balanço *redox* do organismo, gerando o estresse oxidativo. Este, por sua vez, é um mediador de dano às estruturas celulares, incluindo lipídeos e proteínas na membrana e DNA. Além do dano tecidual, as ERO podem levar também ao aparecimento de novos epítopos em autoantígenos modificados pela oxidação, capazes de romper a tolerância ao próprio e gerar autoimunidade (Valko et al., 2007). Esta modificação

de antígenos pelos produtos do estresse oxidativo tem sido descrita em várias doenças autoimunes, incluindo o LES (Kurien, Hensley, Bachmann, & Scofield, 2006).

Várias anormalidades funcionais nos neutrófilos foram descritas no LES, como: diminuição da quimiotaxia e fagocitose (Clark et al., 1974; Phillips et al., 1985); redução da produção de ERO e da expressão de FcγR e CR pelos neutrófilos (Marzocchi-Machado *et al.*, 2002); resposta diminuída a citocinas, incluindo IL-8 (Hsieh et al., 2008); aumento de senescência (Wu, Hsieh, Li, Lu, & Yu, 2007); e aumento de defensinas, lactoferrinas, MPO e outras proteínas bactericidas derivadas de neutrófilos no soro (Stoecker, Bezalel, Chapnik, Asher, & Froy, 2009; Vordenbaumen et al., 2010).

Portanto, as doenças inflamatórias e autoimunes mediadas por IC envolvem a participação de neutrófilos e sua interação com IC e o sistema complemento, que ocorre via receptores FcγR e CR presentes na membrana desses leucócitos (Rahman, Biswas, & Kirkham, 2006). Assim, a modulação das funções efetoras dos neutrófilos torna-se um importante objeto de estudo, bem como alvo terapêutico potencial para o LES.

2 . Objetivos

2.Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Avaliar *in vitro* o efeito dos produtos da ativação dos neutrófilos no LES sobre células endoteliais e sua implicação para a lesão tecidual mediada por imunocomplexos.

2.2 Objetivos específicos

- a) Expor cultura de células endoteliais a neutrófilos de pacientes com LES ou de indivíduos saudáveis (controle) e a um *pool* de soro humano normal/inativado e oferecer IC como estímulo para a ativação dos neutrófilos e do SC.
- b) Analisar os marcadores de estresse oxidativo: *burst* oxidativo dos neutrófilos, peroxidação lipídica e sistemas antioxidantes.
- c) Analisar a expressão de ICAM-1 (molécula de adesão) e do fragmento C4d (ativação da via clássica) do complemento no sobrenadante.

3. Casuística e Métodos

3. Casuística

3.1 Pacientes com LES e Participantes Saudáveis

O presente protocolo de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP-USP) e, posteriormente, foi encaminhado para apreciação do CEP da instituição coparticipante, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP), a qual também deu parecer favorável à realização desta pesquisa (Anexo 1).

Houve recrutamento de três grupos de participantes: GRUPO A- pacientes com LES, para doação de sangue como fonte de neutrófilos; GRUPO B- participantes saudáveis para o grupo controle, que doaram sangue para a obtenção de neutrófilos e GRUPO C- participantes saudáveis para doação de sangue para obtenção de soro como fonte de proteínas do sistema complemento (*pool SHN*).

Os pacientes com LES foram recrutados no ambulatório de reumatologia do HCFMRP-USP, com a colaboração do Prof. Dr. Paulo Louzada Júnior. Os participantes saudáveis (GRUPOS B e C) foram recrutados na comunidade da FCFRP-USP e do Campus USP-Ribeirão Preto. As pacientes participantes (n=27), com média de idade de $38,21 \pm 10,86$, foram diagnosticadas segundo os critérios de classificação do Colégio Americano de Reumatologia para o LES (Tan et al., 1982), onde 15 pacientes estavam no estágio ativo da doença e 12 estavam na fase de remissão (LES ativo/LES inativo).

Os participantes saudáveis (n=27), com média de idade de $36,76 \pm 14,46$, foram selecionados considerando-se os sexos e as idades dos pacientes com LES, sendo que para cada paciente estudado admitiu-se um participante saudável de mesmo sexo e faixa etária. Para o grupo de participantes para obtenção de soro (GRUPO C), a faixa etária média foi de $27,76 \pm 12,34$ anos de idade, considerando-se uma proporção de 1 homem para cada 9 mulheres, baseando-se na epidemiologia do LES. Todos os participantes, ao serem convidados a participar da pesquisa, foram esclarecidos sobre o protocolo de pesquisa e, aqueles que concordaram em participar, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. O critério de exclusão geral para os participantes dos três grupos foi o tabagismo, uso de medicamentos controlados, e no caso de participantes do sexo feminino, o uso de contraceptivo e gravidez. Para o grupo de pacientes com LES (GRUPO A), o critério de

exclusão utilizado foi a terapia imunossupressora recente, inferior a três meses, e corticoterapia esteroidal maior ou igual a 10 mg/dia. Para o grupo de participantes saudáveis (GRUPOS B e C), o critério de exclusão foi o uso de anti-inflamatórios há menos de sete dias.

Foi feito um levantamento de informações no prontuário dos pacientes com LES no dia da colheita da amostra, referente aos resultados de seus exames laboratoriais mais recentes e também ao tipo de manifestação clínica predominante.

O fluxograma 1 apresenta a organização das atividades desenvolvidas a partir das amostras de sangue obtidas dos pacientes e indivíduos saudáveis.

Fluxograma 1: Atividades desenvolvidas no projeto. LES, pacientes com lúpus eritematoso sistêmico; CTL, sujeitos saudáveis do grupo controle; CR, receptor para complemento; IC, imunocomplexos; HUVEC, células endoteliais de cordão umbilical humano; SHN, soro humano normal; SC, sistema complemento.

3.2. Parturientes doadoras de cordão umbilical

As células endoteliais foram obtidas de cordões umbilicais humanos de neonatos saudáveis obtidos durante o parto no Centro de Referência da Mulher de Ribeirão Preto-Mater, cujas parturientes (n=20) tenham dado o consentimento para a doação do material,

segundo protocolo aprovado pelo Comitê de Ética. O critério de exclusão para este grupo compreendeu o uso de medicamentos controlados, antibiótico, imunossupressor e uso de anti-inflamatórios há menos de sete dias.

4. Métodos

4.1 Amostras de sangue para fonte de neutrófilos e soro

Para neutrófilos: um volume total de 20 mL de sangue venoso periférico foi colhido dos participantes (GRUPOS A e B) com sistema de coleta a vácuo e estéril sem anticoagulante (BD Vacutainer[®] Serum), e colocado imediatamente numa solução anticoagulante de Alséver pH 6,1 (1:2). Na mesma coleta foi separado 4 mL do sangue total para marcação de receptores do neutrófilo por citometria de fluxo, em tudo de coleta a vácuo e estéril com anticoagulante (BD Vacutainer[®] K2 EDTA 7.2mg).

Para soro: um volume total de 20 mL de sangue venoso periférico foi colhido de participantes saudáveis (GRUPO C) com sistema de coleta a vácuo e estéril, sem anticoagulante (BD Vacutainer[®] Serum), para a obtenção de soro. As amostras de soro foram reunidas para constituir um *pool* de soro humano normal (SHN). Este *pool* de SHN foi utilizado como fonte de proteínas do complemento para a opsonização dos imunocomplexos.

4.2 Obtenção de neutrófilos

Os neutrófilos foram obtidos a partir da colheita de sangue total previamente adicionado de anticoagulante (Alséver pH 6,1, na proporção 1:2 (v/v)) e levados imediatamente para centrifugação (Eppendorf, modelo 5810R) à 664xg por 10 min à temperatura ambiente. A camada de células mononucleadas foi desprezada (plasma). Os neutrófilos foram separados a partir da adição de uma solução de gelatina 2,5% em NaCl 0,15M em quantidade duas vezes superior ao volume da camada de células obtidas e as amostras foram coladas em banho-maria a 37°C por 15 minutos. Neste momento os neutrófilos foram separados por diferença de gradiente de concentração permanecendo na camada superior da solução, este sobrenadante foi retirado e a ele adicionou-se NaCl 0,15M e as amostras foram centrifugadas à 562xg por 10 minutos em temperatura ambiente. As células foram então submetidas a uma solução de

NH₄Cl 0,83% pH 7,2, capaz de lisar as hemácias remanescentes, para isso ficaram em repouso em banho-maria a 37°C por 5 minutos e logo após centrifugadas a 562xg por 10 minutos em temperatura ambiente. O precipitado foi lavado pela ultima vez com NaCl 0,15M e esse centrifugado 562xg por 10 minutos. Os neutrófilos foram ressuspensos em 1 mL de solução salina de Hanks pH 7,2 (gelatina 0,1%). Uma alíquota foi retirada e a ela foi adicionada como diluente Líquido de Turk para a contagem de neutrófilos em câmara de Neubauer. A suspensão foi ajustada para uma concentração de 4×10^6 células/mL de solução salina de Hanks pH 7,2 com gelatina 0,1%.

4.3 Obtenção do soro humano para opsonização (*pool* de soro humano normal/inativado)

O *pool* de soro foi constituído pela junção dos soros de voluntários saudáveis, obtidos a partir da coleta do sangue total por punção venosa na ausência de anticoagulante. O sangue foi deixado em repouso a 4°C durante 1 hora para a retração do coágulo formado e logo após este evento, centrifugado a 664xg por 10 minutos a 4°C, em centrífuga (Eppendorf, modelo 5810R). A mistura destas amostras constituíram o *pool* de soro humano normal, a qual foi alíquotada e imediatamente levada para congelamento à -80°C. Uma parte desta amostra de *pool* de soro humano normal (SHN) após descongelada, era submetida ao aquecimento em banho-maria à 56°C durante 30 minutos, processo pelo qual resulta na perda da atividade do complemento neste soro, que passa a constituir um *pool* de soro humano normal inativado (SHI). A opsonização dos IC com SHI foi usada como forma de controle negativo para o sistema complemento.

4.4 Imunocomplexos

Os neutrófilos humanos foram estimulados com IC-IgG e SHN (soro humano normal) ou SHI (soro humano normal inativado). Os imunocomplexos foram precipitados em zona de equivalência, formados por albumina de soro bovino (BSA, do inglês *bovine serum albumin*, Sigma-Aldrich, USA, ref. A7638) e IgG policlonal de coelho anti-BSA de alta afinidade funcional, previamente preparada e caracterizada em nosso laboratório (Marzocchi-Machado et al., 1999). Para preparo do IC-IgG, uma solução de BSA 1 mg/mL diluída 1:4 em PBS pH

7,4 foi misturada volume a volume com uma preparação de anticorpo anti-BSA, na proporção de equivalência (1:2) e deixado em banho-maria a 37°C por 1 hora. Após o período de incubação, o IC-IgG foi mantido a 4°C *overnight* e em seguida centrifugados a 13400 xg, 4°C, por 15 minutos (Eppendorf, modelo 5412R). O sobrenadante foi descartado e o IC-IgG lavado duas vezes com PBS pH 7,4, centrifugados 13400 xg, 4°C, por 15 minutos. Descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi ressuspensão em 1mL de PBS pH 7,4.

A dosagem de proteína foi feita em espectrofotometria. Uma alíquota de 50 µL do IC-IgG ressuspensão foi acrescida de 200 µL de PBS pH7,4 e centrifugada a 13400 xg, 4°C, por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensão em uma mistura de 50 µL de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 N e 950 µL de PBS pH 7,4. A densidade ótica foi medida a 280 nm em espectrofotômetro (PG instruments, Leicester, Reino Unido, modelo T70 UV/Vis). A quantidade de proteína obtida foi estimada pelo seguinte cálculo (Groves et al., 1968):

$$\text{DO amostra (280nm)} \times 0,715 = \text{Quantidade de proteína (mg)}$$

No momento de fornecer os estímulos aos neutrófilos, juntamente ao IC-IgG foi adicionado um *pool* de SHN (opsonização pelo sistema complemento) e com uma amostra do *pool* de SHN inativado (SHI) como controle negativo para o complemento.

4.5 Produção de ERO medida por quimioluminescência dependente de luminol (*Burst oxidativo*)

Os ensaios foram realizados segundo Alves et al. (2003). Os neutrófilos foram ressuspensos em uma concentração de 2×10^5 em solução de Hanks/gelatina 0,1% e foram submetidos ou não a estímulos: IC-IgG/SHN, IC-IgG/SHI ou somente SHN/SHI. A esta solução adicionou-se luminol 10^{-4} M (5-amino-2,3-dihidro-1,4-ftalazinediona), uma sonda quimioluminescente. A produção de QL foi acompanhada em luminômetro (Berthold, AutoLumat Plus), a 37°C por 30 minutos, por meio do registro de fótons por minuto (cpm). O tempo de exposição dos estímulos aos neutrófilos e a concentração destas células (2×10^5) teve como base o mesmo utilizado nos ensaios descritos em XXX. O controle de QL espontânea consistiu em incubar as células com luminol na ausência de IC-IgG com ou sem SHN/SHI. Os resultados foram expressos como a área integrada sob o perfil de QL registrado.

4.6 Expressão dos receptores Fcγ e dos receptores para complemento em neutrófilos por citometria de fluxo

A expressão dos FcγR e CR nos neutrófilos foi determinada de acordo com Marzocchi-Machado *et al.* (2002). Em um tubo para citometria, alíquotas de 100 µL do sangue total cada paciente e indivíduo saudável foram incubadas com 5 µL de anticorpos específicos marcados com fluorocromo, ao abrigo de luz por 20 minutos. Em um segundo tubo foram pipetados junto à amostra 5 µL de anticorpo isotipo controle, e um terceiro tubo somente com as células, sem marcação com anticorpos. Estes dois últimos tubos foram usados para subtrair a fluorescência causada pela ligação inespecífica do anticorpo ao neutrófilo, ou, descontar a autofluorescência celular, respectivamente.

Após esta incubação, foi adicionado em cada tubo 2000 µL de solução de lise (BD FACSTM Lysing Solution) para eliminar os eritrócitos da amostra, e foram incubados por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foram centrifugados a 760 xg, por 10 minutos à 4°C em centrífuga (Eppendorf, modelo 5810R); o precipitado foi lavado com 2000 µL de PBS/SBF 2%, azida 0,1% pH7,2 gelado. As amostras foram novamente centrifugadas nas mesmas condições anteriores, e, por fim as células foram ressuspensas em 200 µL de PBS/formol 1%.

As análises foram feitas em citômetro de fluxo (FACSCalibur™, 'software cell Quest Pro™, Becton Dickison).

Dentro da população de leucócitos, os neutrófilos foram distinguidos por citograma bidirecional. Os resultados obtidos em histogramas foram expressos em mediana da fluorescência/célula em escala logaritma e em gráfico como porcentagem de células fluorescentes na população total.

4.7 Cultura de células endoteliais de cordão umbilical humano (HUVEC – *human umbilical vein endothelial cells*)

As células endoteliais foram extraídas de cordões umbilicais humanos de neonatos saudáveis (~20 cm) obtidos durante o parto normal no Centro de Referência da Mulher de Ribeirão Preto-Mater. Após a coleta o material foi transportado em solução de Hanks + Estreptavidina 1% acondicionado em gelo. O processamento e extração foi feito a partir do

tratamento do cordão umbilical com collagenase de acordo com metodologia descrita por Oroszlán et al. (2006) e Jani et al. (2014). Inicialmente o cordão foi limpo com álcool 70% em ambiente estéril e com auxílio de bisturi foram cortadas as suas extremidades para melhor acesso às veias, nas quais foram encaixadas duas torneiras de três vias. Através desta torneira houve abertura e encaixe para uma seringa, que serviu de instrumento para a injeção de líquidos. O cordão foi lavado 2 vezes com PBS estéril (40 mL) e em seguida foi adicionado 20 mL de collagenase do tipo II (Gibco®, EUA), e as torneiras foram fechadas para que o conteúdo ficasse restrito à veia, e colocado em estufa a 37°C para melhor ação enzimática. Após esse período o conteúdo foi liberado dentro de um tubo Falcon, e adicionado mais 20 mL do conteúdo de lavagem que foi dado ao cordão com PBS estéril. O tubo foi centrifugado a 562xg (centrífuga Eppendorf, modelo 5810R) por 5 minutos à temperatura ambiente para sedimentar as células endoteliais. Desprezou-se o sobrenadante e o conteúdo celular foi ressuspenso em meio EGM2 (Lonza®, EUA) contendo 100 UI/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, 1% de soro bovino fetal, 2ng/mL de fator de crescimento epidermal humano recombinante, 250 pg/mL de fator β de crescimento de célula endotelial humana recombinante e 7,5 UI de heparina/mL. As HUVEC foram cultivadas em frasco de cultura de 75 cm² em estufa a 37°C sob 5% CO₂, com 10 mL deste mesmo meio de cultura. A identificação das células endoteliais foi confirmada pela observação do padrão característico de crescimento por microscopia de contraste de fase e positividade para o anti-CD31. As células endoteliais eram trocadas de garrafa após atingir o estágio de confluência de 75% e/ou utilizadas para o plaqueamento e utilização nos devidos ensaios. As condições de cultivo celular seguiram a descrição de Jerke *et al.* (2013).

4.7. Cultura celular em poços individuais (plaqueamento)

Uma vez atingida a confluência, as células foram trocadas de superfície de cultivo, passando para placas de 12 poços individuais. Ainda nas garrafas de cultivo as células foram lavadas com PBS estéril e em seguida foi adicionado 4 mL de uma solução de tripsina 1X. A garrafa foi submetida a agitação manual suave durante 5 minutos para que pudessem se desprender da superfície. Em seguida foi adicionado 1 mL de meio de cultura na, e este conteúdo foi transferido para um tubo estéril, e mais 5 mL do conteúdo de lavagem da garrafa (PBS estéril + células remanescentes). Este tubo foi centrifugado a 562xg por 5 minutos à

temperatura ambiente e o precipitado foi ressuspensão em 1 mL de meio de cultura.

Em seguida houve a contagem das células e determinação da viabilidade celular por meio da utilização do Azul de Tripán. Nesta técnica as células não-viáveis são coradas em azul, devido à permeabilidade de membrana que caracteriza morte celular. Foi adicionado 10 µL de uma suspensão de células endoteliais na concentração de $3-5 \times 10^6$ /mL em 190 µL de Azul de Tripán 0,4% em NaCl 0,15M. Este conteúdo foi posto sobre uma câmara de Neubauer e coberto com lamínula para contagem das células. Após a contagem, as células foram transferidas para placas de 12 poços estéreis e diluídas em meio de cultura EGM2 (Lonza®, EUA) de modo que a concentração em cada um desses poços fosse de 4×10^5 células num volume final de 1 mL. Imediatamente as placas foram dispostas em estufa (Thermo Electron Corporation; modelo Forma Series II, Water Jacketed CO₂) a 37°C sob 5% de CO₂. Depois de dois dias de crescimento, os ensaios com esta cultura foram executados.

4.8 Quantificação de CD31 nas células endoteliais

Para confirmar a pureza das células endoteliais usadas nos ensaios, foi quantificado CD31 por citometria de fluxo (Guava – Mod. EasyCyte 8 HT – Merck Millipore®). Uma alíquota com concentração de 3×10^6 células/mL foi retirada da garrafa P0 (primeira tripsinização). Este conteúdo foi dividido em três tubos para citometria, e passaram por centrifugação a 562xg por 5 minutos à temperatura ambiente. As células foram ressuspensas em 500 µL de PBS estéril e novamente centrifugado sob as mesmas condições. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensão em 300 µL de PBS, seguido da marcação com anticorpo. No tubo 1 não foi adicionado anticorpo (autofluorescência); no tubo 2 foi adicionado 5 µL de isotipo IgG 1κ marcado com ficoeritrina (PE) (BD™ Pharmigen, EUA); e no tubo 3 as células foram marcadas com 5 µL de anticorpo anti-CD31 conjugado com PE. Os tubos foram incubados ao abrigo da luz e em gelo por 40 minutos e em seguida, foram centrifugados à 562xg por 5 minutos a 4 °C. O precipitado foi lavado com 1mL de PBS/SBF 2% e foram novamente centrifugados sob as mesmas condições. O precipitado foi ressuspensão em 300 µL PBS contendo 1% de formaldeído e os tubos foram dispostos em triplicatas em uma placa limpa e estéril de 96 poços para leitura no citômetro de fluxo (gate em escala log). As células endoteliais foram utilizadas quando pelo menos 75% das células expressavam CD31.

4.9 Ensaio de exposição dos produtos de ativação do neutrófilo às células endoteliais

O ensaio foi adaptado das metodologias descritas anteriormente (Hashimoto, Nakano, Yoshinoya, Tanimoto, & Itoh, 1992; Jerke et al., 2013). Após o período de incubação para crescimento das células nas placas, cada poço contava com 1×10^6 células. O meio de cultura foi retirado e cada poço foi lavado com 1 mL de PBS estéril. Em seguida, os neutrófilos isolados dos indivíduos do estudo (pacientes e indivíduos saudáveis) em uma concentração de 2×10^5 células/mL foram colocados em contato direto com as células endoteliais, juntamente com solução salina de Hanks pH 7,2 com ou sem estímulos (IC-IgG/SHN, IC-IgG/SHI). A placa seguiu para incubação a 37°C com 5% de CO₂, e no final deste período o sobrenadante foi armazenado em tubos limpos e estéreis a -22°C. Com este material foi possível realizar os seguintes testes: quantificação de ICAM-1, avaliação dos sistemas antioxidantes (catalase e glutatona), e avaliação da ativação do fragmento C4d. Ao mesmo tempo, realizou-se a tripsinização das células para que fosse realizado o ensaio da avaliação de peroxidação lipídica (TBARS).

4.10 Avaliação de peroxidação lipídica (lesão tecidual)

Inicialmente, uma suspensão de células endoteliais foi obtida a partir da remoção destas células da placa de cultura, em cada poço foi adicionado 500 µL de tripsina por 5 minutos e sob agitação manual. Em microscópio foi conferido o desprendimento total das células que estavam aderidas à placa e imediatamente foi adicionado 300 µL de meio de cultura nesses poços. Este conteúdo foi realocado em tubos limpos de 1,5 mL junto com o conteúdo de enxágue do poço (300 µL PBS estéril). Esses tubos foram centrifugados a 562xg por 5 minutos à temperatura ambiente (centrífuga Eppendorf, modelo 5415R). O precipitado foi ressuspensão com 100 µL de PBS para o teste descrito a seguir. A avaliação da peroxidação lipídica foi realizada por meio da detecção de indireta de malonaldeído (MDA) que foi obtida pela determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), conforme descrito por Buege e Aust (1978). A uma suspensão das células endoteliais (100 µL) que foram expostas aos neutrófilos foi adicionado 750 µL de solução do ácido tiobarbitúrico (TBA 67% NaOH 0,12N). Os tubos com este conteúdo foram homogeneizados em vórtex e incubados em banho-maria a 100°C por 1 hora. Após esse período, as amostras foram lidas

por espectrofotometria no comprimento de onda de 534nm.

4.11 Avaliação da atividade da catalase

A avaliação da atividade da catalase nas amostras foi realizada de acordo com a metodologia descrita anteriormente a partir de adaptações (Tentori & Salvati, 1981). O sobrenadante da exposição das células endoteliais, resultante do ensaio descrito em 6.8 foi descongelado em temperatura ambiente e centrifugado a 562xg por 5 minutos a 4°C para sedimentação dos detritos remanescentes. Então uma alíquota de 150 µL deste sobrenadante foi adicionada a 550 µL de uma solução de peróxido de hidrogênio 10 nM em tampão fosfato pH 7,0. A leitura foi executada considerando a taxa de redução da absorbância do peróxido de hidrogênio por meio do perfil cinético da reação durante 2 minutos com registros a cada 30 segundos no comprimento de onda de 240 nM em espectrofotômetro (PG instruments, Leicester, Reino Unido, modelo T70 UV/Vis).

4.12 Avaliação da glutathione total

A avaliação da glutathione total nas amostras foi realizada de acordo com método descrito anteriormente a partir de adaptações (Ellman, 1959). O sobrenadante, produto da reação descrita em 6.8 foi descongelado em temperatura ambiente, centrifugado a 562 xg por 5 minutos a 4°C para sedimentação dos detritos e utilizado para a seguinte reação. Foi adicionado a 400 µL desta amostra, 800 µL de tampão 400nM Tris-HCl-EDTA pH 8,9 e 100 µL do reagente 5,5'-dithiobis (ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB). A solução foi homogeneizada em vórtex e os tubos permaneceram em descaso por 15 minutos para que ocorresse a reação. A leitura foi realizada no comprimento de onda de 412 nm em espectrofotômetro. Os níveis de glutathione são determinados a partir da reação do DTNB com tióis livres para formar dissulfeto e ácido 2-nitro-5-tiobenzóico, que pode ser quantificado por absorbância. Para o cálculo da concentração, foi construída uma curva de calibração em que a cisteína foi utilizada como padrão nas seguintes concentrações: 0,00625; 0,0125; 0,025; 0,05 e 0,1 µM/mL.

4.13 Quantificação do fragmento C4d (avaliação da ativação da via clássica)

A quantificação do fragmento C4d foi determinado por meio do kit MicroVue C4d Fragment Enzyme Immunoassay (Quidel A008), que mensura a quantidade de fragmentos de C4d, resultantes da clivagem da proteína C4 da via clássica do sistema complemento, presentes no sobrenadante da reação. O sobrenadante, produto da reação descrita em 6.8 foi descongelado em temperatura ambiente, centrifugado a 562 xg por 5 minutos a 4°C e utilizado para o ensaio imunoenzimático, de acordo com as instruções do fabricante. Foram distribuídos na placa 100 µL das amostras, bem como controles e padrões na placa previamente lavada com 300 µL de tampão de lavagem, e incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, após mais 4 etapas de lavagem com o tampão, a placa foi vertida sobre papel toalha e sobre cada poço foi adicionado 50 µL do conjugado anti-C4d. A placa foi deixada mais 30 minutos em repouso e depois lavada novamente. Sobre os poços foi adicionado 100 µL da solução substrato e então a placa foi incubada por 30 minutos em temperatura ambiente para que a reação pudesse ser revelada. Após esta etapa foi adicionado 50 µL de H₂SO₄ 2 N em cada poço, com a finalidade de parar a reação e imediatamente a leitura foi realizada em um espectrofotômetro no comprimento de onda de 405nm. As análises dos resultados do ensaio foram calculadas de acordo com a equação da reta gerada a partir da curva linear dos padrões.

4.14 Quantificação de ICAM-1 solúvel

A quantificação de ICAM-1 foi determinada por meio de ensaio imunoenzimático Quantikine® ELISA Human ICAM-1/CD54 (R&D Systems Inc.®, Minneapolis, MN, USA). Foi uma medida indireta da liberação desta molécula pelas células endoteliais expostas aos neutrófilos e liberadas no sobrenadante da reação, baseando-se no protocolo descrito anteriormente (Stocco et al., 2012). O sobrenadante foi descongelado em temperatura ambiente, centrifugado a 562 xg por 5 minutos a 4°C e utilizado para o ensaio imunoenzimático, de acordo com as instruções do fabricante. Foram adicionados 100 µL das amostras e padrões nos poços e a placa foi incubada em temperatura ambiente e sob rotação (Environmental shaker incubator Biosan, modelo ES20). Após este período o conteúdo dos poços foi aspirado e estes foram lavados 4 vezes com 400 µL de tampão de lavagem. Depois

de verter a placa em papel toalha, foram pipetados 200 µL de conjugado anti-ICAM-1 e novamente a placa foi incubada por 1 hora sob rotação. O conteúdo dos poços foi aspirado e novamente passaram pela etapa de lavagem seguida da adição de 200 µL da solução substrato. A placa foi incubada por 30 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após o período de incubação foi adicionado 50 µL de solução H₂SO₄ 2 N nos poços, a qual possibilitou parar a reação e a realização da leitura foi feita logo em seguida em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 450 a 540nm. As análises dos resultados do ensaio foram calculadas de acordo com a equação da reta gerada a partir da curva linear dos padrões.

4. 15 Análise estatística

As comparações entre os grupos foram analisadas por teste de variância (ANOVA) para medidas repetidas e pelo pós-teste de Tukey para as comparações múltiplas pareadas; por ANOVA e pelo pós-teste de Tukey para as comparações múltiplas não pareadas; teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn para as comparações entre dados não paramétricos dos grupos de pacientes com LES *versus* o grupo controle. Utilizou-se o programa GraphPad Prism® (Versão 5.01, GraphPad Software, Inc., USA) e o valor de $p < 0,05$.

5. Resultados

5. Resultados

5.1 Avaliação da peroxidação lipídica – Marcador de lesão endotelial

A Figura 1 apresenta a avaliação da peroxidação lipídica em células endoteliais (HUVEC) expostas aos neutrófilos de pacientes com LES e indivíduos saudáveis, IC e complemento sérico. Avaliamos a produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), os lipídeos oxidados nas células endoteliais. A medida da peroxidação lipídica foi avaliada com base no cálculo da curva padrão de malondialdeído (Figura suplementar XXX).

Figura 1. Avaliação da peroxidação lipídica pela quantificação da concentração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). As células endoteliais e os neutrófilos de pacientes com LES e de indivíduos saudáveis foram mantidos em contato direto por 30 minutos a 37°C e 5% CO₂. A quantificação das TBARS foi realizada diretamente sobre as células endoteliais que sofreram exposição. A reação colorimétrica foi lida em espectrofotômetro a 534 nm. O cálculo da concentração foi realizado utilizando a absorvidade molar do MDA ($1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e os resultados foram expressos em nM. Cada ponto representa o que foi gerado de TBARS mediante exposição das células endoteliais aos neutrófilos de cada indivíduo saudável (azul) ou de paciente com LES (vermelho), sendo que os neutrófilos foram ou não estimulados com IC + SHN/SHI. As barras horizontais indicam as médias para cada grupo. Diferenças estatísticas foram analisadas por teste de análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas e pelo pós-teste de Tukey para as comparações múltiplas entre os grupos: **p<0,01; ***p<0,001.

Comparando-se o controle espontâneo (célula endotelial - CE) com a CE exposta ao neutrófilo/CTL e a CE exposta ao neutrófilo/LES, observamos que há uma maior produção de TBARS mediada por neutrófilos de pacientes com LES comparada com o controle espontâneo ($p<0,001$), o que não ocorreu com a CE exposta ao neutrófilo/CTL. Quando houve adição do estímulo (IC + SHN ou IC + SHI), observamos que houve maior produção de TBARS pelo neutrófilo/CTL e esta concentração foi ainda maior quando CE foram expostas ao neutrófilo/LES + IC + SHN ($p<0,001$). Esta diferença desaparece quando substituímos o soro humano normal (SHN) por soro humano inativado (SHI) (controle espontâneo *versus* neutrófilo/LES + IC + SHI). Em nenhum dos grupos estudados houve diferença quando o estímulo adicionado foi SHI. Ainda para avaliar a influência entre as condições de atividade e controle da doença, apresentamos os resultados discriminando os pacientes em LES ativo e LES inativo.

Figura 2. Avaliação da peroxidação lipídica pela quantificação da concentração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). As células endoteliais e os neutrófilos de pacientes com LES e de indivíduos saudáveis foram mantidos em contato direto por 30 minutos a 37°C e 5% CO₂. A concentração de TBARS foi realizada diretamente sobre as células que sofreram exposição e a reação colorimétrica foi lida em espectrofotômetro a 534 nm. O cálculo da concentração de TBARS foi realizado utilizando a absorvidade molar do MDA ($1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e os resultados foram expressos em nM. Cada ponto representa o que foi gerado de TBARS mediante exposição dos neutrófilos de cada indivíduo saudável (azul) ou de paciente com LES ativo (rosa) ou LES inativo (roxo), sendo que os neutrófilos foram ou não estimulados com IC + SHN/SHI. As barras horizontais indicam as médias para cada grupo. Diferenças estatísticas foram analisadas por teste de análise de variância (ANOVA) e pelo pós-teste de Tukey para as comparações múltiplas entre os grupos: * $p<0,05$.

Neste caso, observamos que houve especificamente maior produção de TBARS quando as CE foram expostas aos os neutrófilos de pacientes na condição de LES ativo ($p<0,05$). A mesma característica pode ser vista nos neutrófilos de pacientes com LES inativo após ativação destas células (IC+SHN) ($p<0,05$). Em todos os casos, identificamos uma tendência ao aumento da peroxidação lipídica a partir da adição de neutrófilos.

5.2 Análise da expressão dos receptores Fc γ e dos receptores para complemento em neutrófilos

A expressão dos receptores dos neutrófilos foi analisada a partir do sangue total de pacientes com LES ou indivíduos saudáveis. O citograma bidirecional, representando uma população de neutrófilos (P1), é demonstrado na Figura XX, separados por tamanho e complexidade. A análise considerou apenas a população de neutrófilos (P1) e identificou a expressão dos receptores Fc γ Ia (CD32), Fc γ IIIb (CD16), CR1 e CR3 nestas células.

Figura 3. Citograma bidirecional. Células do sangue total de um indivíduo saudável, separadas de acordo com seu tamanho e complexidade por meio de citometria de fluxo. Em P1, neutrófilos (vermelho), indicando a população de neutrófilos selecionada para a análise da expressão dos receptores.

A Figura XX apresenta os histogramas de fluorescência para os receptores Fc γ Ia (C), Fc γ IIIb (D), CR1 (E) e CR3 (F) dos neutrófilos. Além dos tubos contendo os anticorpos anti-receptor específicos, foram feitos dois tubos contendo isotipos controles (anticorpos não específicos) (A e B) para descontar a fluorescência devido a ligação não específica do anticorpo à célula e um tubo sem anticorpos para descontar a autofluorescência celular.

Figura 4. Representação dos histogramas de fluorescência dos receptores de superfície celular em neutrófilos marcados com anticorpo anti-receptor específico e analisados por citometria de fluxo. A, IgG não específica marcada com FITC; B, IgG não específica marcada com PE; C, FcγIIa; D, FcγIIIb; E, CR1; F, CR3.

A mediana da intensidade de fluorescência correspondente à ligação dos anticorpos para FcγRIIa (CD32), FcγRIIIb (CD16), CR1 e CR3 aos seus respectivos receptores está apresentada na Figura 5. Encontramos uma diminuição na expressão de FcγRIIa (CD32) e de CR1 nos neutrófilos de pacientes com LES ativo quando comparados com neutrófilos/CTL ($p < 0,05$). Não foram encontradas diferenças na expressão dos demais receptores estudados.

Figura 5 – Expressão dos FcγR e CR em neutrófilos avaliada por citometria de fluxo – intensidade de fluorescência por célula. A, CD32; B, CD16; C, CR1; D, CR3. Cada ponto representa a mediana da intensidade de fluorescência específica dos receptores de cada indivíduo controle (azul) ou paciente com LES ativo (rosa) ou LES inativo (roxo). As barras horizontais representam a mediana dos valores para cada grupo. LES-A, LES ativo; LES-I, LES inativo; CTL-controle. Diferenças estatísticas foram analisadas por teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn para as comparações dos grupos de pacientes com LES *versus* o grupo controle: * $p < 0,05$.

A Figura 6 mostra a porcentagem de células positivas para cada um dos receptores estudados. Novamente observamos expressão diminuída na expressão de CR1 $p < 0,01$ nos neutrófilos de LES ativo em comparação com neutrófilos/CTL. Não foram encontradas diferenças nos neutrófilos de indivíduos com LES inativo e indivíduos saudáveis, nem para os demais receptores avaliados.

Figura 6 – Expressão dos FcγR e CR em neutrófilos avaliada por citometria de fluxo – porcentagem de células positivas. A, CD32; B, CD16; C, CR1; D, CR3. Cada ponto representa a porcentagem de células positivas para a marcação específica dos receptores de cada indivíduo saudável (azul), paciente com LES ativo (rosa) e LES inativo (roxo). As barras representam a mediana dos valores para cada grupo. LES-A, LES ativo; LES-I, LES inativo; CTL-controle. Diferenças estatísticas foram analisadas por teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn para as comparações dos grupos de pacientes com LES *versus* o grupo controle: ** $p < 0,01$.

5.3 Análise do *burst* oxidativo de neutrófilos

Primeiramente, foi realizada a padronização da concentração dos estímulos (IC-IgG + SHN ou IC-IgG + SHI) a serem usados nos ensaios. As células foram estimuladas com diferentes concentrações de IC-IgG/SHN, IC-IgG/SHI, além de um controle da reação, onde não havia estímulo (reação espontânea). De acordo com o ensaio mostrado na Figura 7, pudemos observar que de fato, o estímulo IC-IgG/SHN aumentou o perfil de QL, de maneira dose-dependente. IC-IgG/SHI, usado como controle para o sistema complemento, mostrou menor capacidade de ativação, como esperado. Para essas condições, optou-se por utilizar a quantidade de 20 µg de IC-IgG em volume final de 1 mL.

Figura 7 – Representação dos perfis de quimioluminescência (QL) dos neutrófilos dependente de luminol 10^{-4} M. Os sinais foram registrados em contagem de fótons de minutos em função do tempo em segundos (A), e áreas sob a curva representada em barras relativas aos perfis de QL (B). Os neutrófilos (2×10^5) de indivíduos saudáveis foram estimulados com diferentes concentrações de IC-IgG/SHN (vermelho), IC-IgG/SHI (azul) ou incubados sem nenhum estímulo (cinza), na presença de luminol 10^{-4} M. A reação foi acompanhada em luminômetro a 37°C por 30 minutos e registrada em contagem de fótons por minuto (cpm). Gráficos representativos de dois experimentos.

Após a padronização dos estímulos e controles a serem utilizados, seguiram-se os ensaios de QL com neutrófilos de pacientes com LES e indivíduos saudáveis. Não houve diferença quanto ao *burst* oxidativo dos neutrófilos entre os dois grupos, sem discriminar a atividade da doença (Figura 8).

Figura 8 – Quimioluminescência (QL) de neutrófilos dependente de luminol – controle e LES. Cada ponto representa áreas sob a curva dos perfis de QL gerados por neutrófilos (2×10^5) de cada indivíduo saudável (azul) ou paciente com LES (vermelho). As células foram estimuladas com IC-IgG/SHN ou IC-IgG/SHI. Os valores de QL espontânea (neutrófilos sem estímulos) foram descontados. A reação foi acompanhada em luminômetro a 37°C por 30 minutos e registrada em contagem de fótons por minuto (cpm). As barras representam a mediana dos valores para cada grupo. LES, lúpus; CTL, controle. Análise estatística por teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn para as comparações entre os grupos.

Foram analisados os perfis de QL dos neutrófilos, avaliando separadamente de acordo com a atividade da doença e comparando com os indivíduos saudáveis (Figura 9). Novamente observamos que não houve diferença no perfil de QL entre os grupos estudados.

Figura 9 – Quimioluminescência (QL) de neutrófilos dependente de luminol – controle, LES ativo e LES inativo. Cada ponto representa áreas sob a curva dos perfis de QL gerados por neutrófilos (2×10^5) de cada indivíduo saudável (azul), paciente com LES ativo (rosa) e LES inativo (roxo). As células foram estimuladas com IC-IgG/SHN ou IC-IgG/SHI. Os valores de QL espontânea (neutrófilos sem estímulos) foram descontados. A reação foi acompanhada em luminômetro a 37°C por 30 minutos e registrada em contagem de fótons por minuto (cpm). As barras representam a mediana dos valores para cada grupo. LES, lúpus; CTL, controle. Análise estatística por teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn para as comparações entre os grupos.

Ensaio prévios demonstraram em alguns casos, uma reação espontânea (sem estímulos), com perfil de QL maior do que quando os neutrófilos eram estimulados. Assim, o *pool* de soro humano normal/inativado, que contém diversas proteínas, estaria atuando de forma a minimizar a liberação de ERO pelos neutrófilos como mostrado na Figura 10.

Figura 10 – Representação dos perfis de quimioluminescência (QL). A, perfis de QL registrados em contagem de fótons por segundo em função do tempo em segundos; B, áreas sob a curva dos perfis de QL representadas em barras. Os neutrófilos (2×10^5) de indivíduos saudáveis foram estimulados com IC-IgG/SHN (vermelho) ou IgG/SHI (azul); sem estímulos (cinza); ou somente com SHN (amarelo-claro) e SHI (amarelo-escuro) na presença de luminol 10^{-4} M. A reação foi acompanhada em luminômetro a 37°C por 30 minutos e registrada em contagem de fótons por minuto (cpm). A AUC foi calculada a partir dos perfis d QL. Gráficos representativos de dois experimentos. Esp, espontânea.

O *pool* de soro humano que utilizamos em nossas análises, como fonte de proteínas do complemento, parece ter uma ação ligeiramente bloqueadora sobre os neutrófilos, quanto a sua capacidade de liberação de ERO. Portanto em alguns dos ensaios, optou-se por utilizar como controle de uma reação espontânea (sem estímulos), os neutrófilos com adição somente de SHN ou SHI. Os resultados estão representados nas Figuras Suplementares 1 e 2. Neste caso, observamos valores menores das reações espontâneas (com presença somente do *pool* de soro), contudo, continuamos não identificando diferença no perfil de QL dos neutrófilos quando comparamos os grupos envolvidos no estudo (neutrófilos/CTL *versus* neutrófilos/LES), independente das condições de atividade da doença.

5.4. Análise da atividade da catalase

A Figura 11 apresenta a quantificação indireta da catalase, por meio da análise de sua atividade enzimática sobre o peróxido de hidrogênio. A análise é referente à catalase liberada pelos neutrófilos, na presença ou ausência de estímulos durante sua exposição às células endoteliais. A atividade da catalase não foi diferente entre os grupos estudados. Porém houve uma tendência de maior liberação desta enzima quando os neutrófilos estavam presentes, estimulados ou não por IC-IgG/SHN. Observou-se maior liberação de catalase pelos neutrófilos estimulados por IC-IgG/SHI, em indivíduos saudáveis e em paciente com LES, independente da condição da doença ($p < 0,05$).

Figura 11 – Atividade da catalase liberada pelos neutrófilos durante exposição às células endoteliais *in vitro*. A leitura da catalase presente no sobrenadante foi realizada pela variação da absorbância da amostra em espectrofotômetro a 240 nm durante 2 minutos, após a adição de peróxido de hidrogênio 10 nM em tampão fosfato pH 7,0. Os resultados foram expressos em nmol/mg de proteína. A, cada símbolo representa a atividade da catalase liberada pelos neutrófilos de cada indivíduo saudável (azul) ou de paciente com LES (vermelho). B, além dos controles saudáveis (azul) os símbolos representam neutrófilos de LES ativo (rosa) e LES inativo (roxo). Os símbolos em cinza representam a liberação espontânea de catalase sem a presença de neutrófilos. Diferenças estatísticas foram analisadas por teste de análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas e pelo pós-teste de Tukey para as comparações múltiplas entre os grupos: * $p < 0,05$.

5.5. Análise da glutathiona total

Pudemos observar que não houve alteração entre a concentração de glutathiona total liberada entre neutrófilos de indivíduos saudáveis e pacientes com LES, sem a discriminação da atividade da doença. Na Figura 12A, observamos maior liberação desta proteína, quando os neutrófilos de ambos os grupos estavam presentes ($p < 0,001$), mesmo sem ativação por IC-IgG/SHN e IC-IgG/SHI comparando com a liberação espontânea. Ao analisar separadamente a glutathiona total liberada por neutrófilos de paciente com LES ativo e LES inativo, observamos que somente nesta última condição houve aumento da concentração da glutathiona total ($p < 0,01$), tanto quando os neutrófilos foram estimulados por IC-IgG/SHN quanto por IC-IgG/SHI (Figura 12B).

Figura 12 – Concentração da glutathiona total liberada pelos neutrófilos durante exposição às células endoteliais *in vitro*. A leitura da glutathiona presente no sobrenadante foi realizada pela absorvância da amostra em espectrofotômetro a 412 nm após a adição de 5-5'-dithio-bis (ácido-2-nitrobenzóico) (DTNB) em tampão Tris-HCl-EDTA pH 8,9. Os resultados foram expressos em nmol/mg de proteína. A, cada símbolo representa a glutathiona total liberada pelos neutrófilos de cada indivíduo saudável (azul), ou neutrófilos de paciente com LES (vermelho). B, os símbolos neutrófilos de LES ativo (rosa) e LES inativo (roxo). Os símbolos em cinza representam a liberação espontânea de glutathiona total sem a presença de neutrófilos. Diferenças estatísticas foram analisadas por teste de análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas e pelo pós-teste de Tukey para as comparações múltiplas entre os grupos: **p<0,01; ***p<0,001.

5.6. Quantificação de ICAM-1 solúvel – Marcador de ativação endotelial

A quantificação das moléculas de ICAM-1 solúvel liberadas pelas células endoteliais durante o ensaio de contato com neutrófilos está representada na Figura 13. Não houve diferença na expressão de ICAM-1 entre os grupos estudados, nem quando observada de maneira separada os grupos de LES ativo e LES inativo. Contudo, foi visto uma a maior liberação dessa molécula quando os neutrófilos foram ativados por IC-IgG/SHN ($p<0,001$).

Figura 13 – Quantificação de ICAM-1 solúvel liberada por células endoteliais *in vitro* durante exposição à neutrófilos. Células endoteliais e neutrófilos foram mantidos em contato direto por 30 minutos a 37°C com 5% CO₂. O sobrenadante desta reação foi coletada e utilizada no ensaio imunoenzimático específico para a detecção da molécula de ICAM-1 solúvel (Kit R&D system). B, cada ponto representa o ensaio realizado com neutrófilos de indivíduos saudáveis (azul) ou pacientes com LES (vermelhos). B, pacientes divididos em LES ativo (rosa) e LES inativo (roxo). A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 450 e 540 nm. O cálculo da concentração foi realizado por meio da curva padrão e os resultados foram apresentados em ng/mL. Diferenças estatísticas foram analisadas por teste de análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas e pelo pós-teste de Tukey para as comparações múltiplas entre os grupos: *** $p<0,001$.

5.7. Quantificação do fragmento C4d – Marcador de ativação da via clássica do complemento

Estão representados na Figura 14 os resultados da quantificação do fragmento C4d, detectados nos sobrenadantes da reação dos neutrófilos ativados por IC-IgG/SHN ou IC-IgG/SHI em contato com células endoteliais. Visto que, durante o ensaio, a fonte de proteínas do complemento foi fornecida (SHN), bem como os IC, e que, a via clássica pode ser ativada pela presença de anticorpos, a quantificação do fragmento C4d possibilitou analisar a ativação desta via específica, frente à presença de neutrófilos dos grupos estudados. Não houve diferença quanto à presença de fragmento C4d, na presença dos neutrófilos de pacientes com LES em relação ao grupo controle (Figura 14A), mesmo quando o grupo de pacientes foi dividido por atividade da doença (Figura 14B).

Figura 14 – Quantificação do fragmento C4d do complemento liberado a partir da ativação do sistema complemento (via clássica) durante exposição de neutrófilos às células endoteliais *in vitro*. Células endoteliais e neutrófilos foram mantidos em contato direto por 30 minutos a 37°C com 5% CO₂. O sobrenadante desta reação foi coletada e utilizada no ensaio imunoenzimático específico para a detecção do fragmento C4d (Kit MicroVue C4d fragment). A, cada ponto representa o ensaio realizado com neutrófilos de indivíduos saudáveis (azul) ou pacientes com LES (vermelhos). B, pacientes divididos em LES ativo (rosa) e LES inativo (roxo). A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 405nm. O cálculo da concentração foi realizado por meio da curva padrão e os resultados foram apresentados em µg/mL. Análises realizadas por teste de análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas e pelo pós-teste de Tukey para as comparações múltiplas entre os grupos.

6. Discussão

6. Discussão

O mecanismo de deposição de IC e toda a geração de inflamação que ocorre a partir deste evento está intimamente relacionada com doenças autoimunes (Tsuboi et al., 2008), das quais o LES é a doença protótipo (Koffler et al., 1971). O LES é resultante de uma interface de múltiplos fatores: genéticos, hormonais e ambientais (Lisnevskaja, 2014), e a deficiência do *clearance* nessa doença pode ser ocasionada por fagocitose defeituosa, inabilidade dos IC em ativarem o sistema complemento, ou mesmo, defeito de alguns componentes da via clássica (Davies et al., 1994). Como resultado da deposição dos IC, o influxo aumentado de neutrófilos e a consequente lesão tecidual, sustentam o processo inflamatório crônico (Mayadas et al., 2009).

A fase clínica é caracterizada pelo aparecimento de manifestações específicas da doença, como *rash* malar, artrite e nefrite (Bertsias, 2012). A função destes órgãos é prejudicada uma vez que a vasculite se inicia com a deposição dos IC sobre o endotélio, e a ação de fagócitos que na tentativa de eliminar estas estruturas, acabam por lesionar o tecido. Os neutrófilos são as primeiras células recrutadas e possuem capacidade de reconhecer os IC, bem como um arsenal de enzimas e sistemas oxidantes, que não necessariamente são liberadas de forma restrita a esta célula, podendo ter ação deletéria sobre os tecidos.

Dos sistemas oxidantes, o *burst* oxidativo é um processo no qual os neutrófilos produzem espécies reativas de oxigênio (ERO), através da NADPH oxidase (Quinn & Gauss, 2004). Ensaio de quimioluminescência (QL) são utilizados para avaliar a produção de ERO por neutrófilos, a partir do luminol (Marzocchi-Machado et al., 2002). Esta sonda, capaz de ser oxidada pelas ERO, atua amplificando a QL, e por sua capacidade, lipofílica, o luminol pode difundir-se pela membrana plasmática, permitindo detecção de todas as ERO produzidas, intra e extracelulares (Jancinova et al., 2006).

Foi avaliada a capacidade de produção de ERO, pelos neutrófilos purificados de pacientes com LES, nas condições ativa ou inativa da doença, e comparamos com as células de indivíduos saudáveis. Não foram observadas diferenças no perfil de QL dos neutrófilos entre os grupos estudados, mesmo investigando as diferenças em relação à atividade da doença, embora se tenha observado uma tendência ao aumento da capacidade de liberação de ERO dos neutrófilos de pacientes com LES ativo que foram ativados por IC-IgG/SHN, em comparação com a liberação espontânea dos neutrófilos/saudáveis.

O contrário foi visto na liberação de ERO pelos neutrófilos de LES inativo que teve uma tendência à diminuição. Vale ressaltar que os imunossuppressores ministrados durante esta fase do tratamento, estão regulando a atividade destas células, no que diz respeito a sua capacidade de liberação de ERO.

Sabe-se que uma sinalização intracelular mais efetiva nos neutrófilos depende da interação sinérgica entre FcγRIIa e o CR3 com o FcγRIIIb, sendo que este último, não possui domínio intracelular, necessitando do engajamento dos outros receptores para sua ativação (Harley et al., 2008). O engajamento de todos os receptores, pode então aumentar a capacidade de ativação dos neutrófilos, nestas condições, e por consequência, aumentar a atividade da NADPH oxidase. FcγRIIa parece estar mais envolvido com a ativação desta enzima (Brunkhorst et al., 1992).

Foi mostrado em modelo animal de LES, pela primeira vez, em trabalho do nosso grupo, que neutrófilos sanguíneos estimulados via Fcγ/CR produzem mais ERO antes mesmo do estabelecimento do LES e essa alta produção se manteve após o aparecimento dos sintomas clínicos (Toller-Kawahisa, 2016). Por outro lado, trabalhos associaram a baixa produção de ERO por neutrófilos com a gravidade do LES (Bengtsson et al., 2014), inclusive em neutrófilos estimulados com IC-IgG opsonizados com soro humano normal quando comparado com neutrófilos de indivíduos saudáveis (Marzocchi-Machado et al., 2002).

Contudo, Alves et al. (2003) observaram que a produção de ânion superóxido por neutrófilos de pacientes com LES é modulada pelas manifestações clínicas da doença. Possíveis explicações para estas diferenças na resposta da célula seria que, além da diferença de concentração de estímulos e células utilizadas entres os modelos, as próprias diferenças das manifestações clínicas num determinado grupo de pacientes, durante a fase ativa do LES, poderiam contribuir para diferenças nas respostas aos estímulos.

Nosso trabalho buscou aproximar um modelo de vasculite *in vitro* ao que acontece na fisiopatologia do LES. De maneira que o *pool* de soro humano normal fonte de complemento foi adicionado ao meio de reação junto com os IC. O que diverge de outras metodologias do nosso grupo de pesquisa, que forneceram os IC já opsonizados com proteínas do complemento, e que neste caso buscavam estudar a função isolada dos receptores para complemento e para Fcγ. Nos nossos ensaios, a opsonização acontece no momento dos ensaios e há contato do neutrófilo com todas as outras proteínas do soro, não somente as proteínas do complemento.

Conforme mostrado, observamos que o soro quando utilizado isoladamente com o neutrófilo (sem a presença de IC), diminui a liberação de ERO. O desenho da metodologia neste trabalho reproduz melhor o ambiente encontrado pelos neutrófilos dentro dos vasos sanguíneos. Sugerindo haver uma proteção aos produtos de ativação dos neutrófilos, inclusive em indivíduos saudáveis, que estão em constante circulação e sujeitos a exposição aos produtos de ativação, eventualmente.

Baseado nos dados obtidos nestes ensaios, sugerimos que, durante a atividade da doença há muito estímulo disponível para a ativação do neutrófilo, contribuindo para uma maior resposta desta célula, incluindo maior produção de ERO. Alternativamente, IC, citocinas e peptídeos bacterianos podem “primar” os neutrófilos, alterando a sua capacidade de resposta funcional e induzindo uma rápida produção e liberação de ERO para o ambiente externo (Hallett, 1995).

Estudos mostraram que neutrófilos de pacientes infectados podem se mostrar hiper-responsivos (McCall et al., 1973) e que a exposição prévia com doses menores de agentes ativadores pode causar uma resposta intensificada a estímulos subsequentes (Guthrie et al., 1984). Este *priming* do neutrófilo, no caso do LES, ocorre mesmo quando a doença está controlada, pois o paciente ainda possui liberação de antígenos próprios nesta fase, mesmo que em doses reduzidas (subestimulatórias). Assim, durante a fase ativa, esta resposta poderia se dar de forma mais efetiva, quando exposta a mais estímulos.

Desta forma, os neutrófilos de pacientes com LES, estariam expostos a agentes que os ativariam parcialmente, porém, durante outras fases, ocorreria uma ativação mais apropriada e completa. Como consequência, as ERO e as enzimas liberadas por neutrófilos podem modificar proteínas e outras moléculas, levando à perda da tolerância imunológica e sustentando a autoimunidade (Januszewski et al., 2005).

Embora não tenha havido diferença no *burst* oxidativo dos neutrófilos mediante os estímulos que utilizamos, seguimos com as investigações a cerca da ação dos neutrófilos como mediadores da lesão no LES, considerando que de fato muitos trabalhos mostram alteração na produção de ERO. Por exemplo, as ERO liberadas por fagócitos podem mediar a imunopatologia no rim (Lorenz, Desai, & Anders, 2014).

Porém, poucos trabalhos buscam associar todas estas investigações com um modelo fisiopatológico, que possa se aproximar em reproduzir o dano endotelial gerado por neutrófilos, em condições biológicas similares às proporcionadas pelo LES.

O modelo deste experimento mimetiza condições de vasculite, com ativação do neutrófilo *in vitro*, acompanhando as condições fisiopatológicas da doença: deposição de IC sobre o endotélio (HUVEC); presença de proteínas do complemento; neutrófilos de pacientes com LES. As células endoteliais uma vez expostas ao contato direto com os neutrófilos, tiveram suas membranas oxidadas pelos produtos de ativação destas células.

Neste estudo, observamos que a presença de neutrófilos/LES, independentemente da condição da doença, se mostrou mais capaz de agredir as células endoteliais, quando ativadas por IC-IgG/SHN, ou mesmo sem esta ativação, comparada à peroxidação lipídica espontânea (ausência de neutrófilo). Isto sugere que os neutrófilos/LES estariam mais capacitados a mediar dano endotelial por meio de contato direto, mesmo sem a presença de estímulos. Tem-se discutido recentemente sobre a importância do contato íntimo neutrófilo-endotélio para deposição de mieloperoxidase (MPO) sobre o endotélio, mediada por CR3 (Jerke et al., 2013), e que esta enzima tem importante papel como mediadora de lesão endotelial em processos inflamatórios (Villanueva et al., 2011). A exclusão das proteínas do complemento - soro humano inativado (SHI) - levou os neutrófilos a retornarem a um perfil oxidativo próximo àquele do grupo controle. Ou seja, mesmo com o engajamento dos IC nos neutrófilos via Fc γ , a agressão é mediada principalmente por complemento.

Frente a esta discussão sobre a ligação dos receptores com as opsoninas e mediando contato com as células endoteliais, algumas disfunções do sistema imunológico no LES têm sido relacionadas com os receptores para Fc γ e CR dos neutrófilos, seja na redução da expressão destas moléculas, ou polimorfismos genéticos relacionados com alterações nas funções destas células. Por exemplo, o polimorfismo da cadeia CD11b do CR3 tem sido associado à suscetibilidade ao LES (Rosetti & Mayadas, 2016), uma vez que, essa variante pode levar a uma diminuição da atividade deste receptor em neutrófilos, células B e macrófagos (Ding et al., 2013).

Nosso grupo tem investigado a biologia dos receptores para Fc γ R e CR no LES (Marzocchi-Machado et al., 2002; Alves et al., 2003; Marzocchi-Machado et al., 2005; Alves et al., 2008). Foram detectadas algumas alterações de expressão dos Fc γ R e CR em neutrófilos de LES, disfunção destas células, além de associação com maior suscetibilidade à doença (Toller-Kawahisa, 2014; Vigato-Ferreira, 2014). Seguindo essa linha de investigação, também avaliamos a expressão destes receptores em neutrófilos de pacientes com LES e indivíduos saudáveis.

Observamos uma diminuição da expressão dos receptores CR1 e CD32 nos neutrófilos de pacientes com LES ativo. Concordando com dados já descritos na literatura a respeito dessas moléculas (de Carvalho Lins et al., 2004; Lach-Trifilieff et al., 1999; Marzocchi-Machado et al., 2005; Wilson et al., 1986). Apesar de não termos observado alterações na expressão do CR3, Buyon e colaboradores (1998) demonstraram que a expressão de CR3 está aumentada em neutrófilos de pacientes com LES ativo. A atividade deste receptor, que está envolvido no *clearance* de IC, pode ser ineficiente em pacientes com LES (Hepburn et al., 2006).

Vale ressaltar que além da baixa expressão de alguns dos FcγR e CR, os polimorfismos genéticos podem ser fator importante no prejuízo da interação com os IC circulantes, podendo resultar em sinalização ineficiente (Harley et al., 2008).

A constante formação de IC presente no LES somado às dificuldades de eliminação, leva à deposição dessas partículas no endotélio, e a tentativa de eliminação pelos neutrófilos, gera um processo de fagocitose “frustrada”, uma vez que, a deposição dos IC em uma superfície impede a formação completa do fagossomo (Amulic et al., 2012).

A liberação não restrita dos produtos de ativação dos neutrófilos supera a capacidade de neutralização basal que o tecido possui fisiologicamente, por meio das anti-proteinases do fluido intersticial, causando um desequilíbrio *redox*. Contudo, o próprio estresse oxidativo é capaz de ativar cascatas de transdução de sinal nessas células que aumentam a transcrição de fatores, para a síntese de proteínas que contribuem para neutralizar os efeitos da oxidação (Droge, 2006). Nosso estudo observou a liberação de duas dessas proteínas antioxidantes pelos neutrófilos: catalase e glutathione.

Observamos um aumento na liberação da catalase pelos neutrófilos de pacientes com LES quando estas células foram ativadas somente via receptor Fcγ. Testes *in vitro* mostraram uma redução na interação dos neutrófilos via receptor para o complemento quando foram tratados com hidrocortisona, sendo que a interação dos receptores Fcγ não foram prejudicadas (Boxer, Richardson & Baehner, 1978). Além disso a exposição a agentes oxidantes aumentaram a expressão de receptores Fcγ na membrana de neutrófilos (Simms & D'Amico, 1995), e amplificaram a sinalização destes receptores (Pricop et al., 1999), efeito revertido quando estas células foram expostas à catalase.

Portanto, a função dos receptores para opsoninas parecem ser influenciadas de maneira diferente, dependendo dos estímulos externos. Os neutrófilos de pacientes em tratamento

estão em contato com estímulos diferentes dos indivíduos saudáveis, além dos medicamentos, o próprio desbalanço *redox*, podem influenciar as funções destas células.

A análise da glutatona total liberada por neutrófilos mostrou que especificamente as células de pacientes com LES inativo quando estimuladas via receptores Fcγ e CR foi maior quando comparadas com LES ativo e indivíduos saudáveis. Os pacientes em remissão estão em administração constante de corticoides em baixa dose, após uma dose alta deste medicamento no início do tratamento (pulso).

O tratamento com altas doses de metilprednisona intravenosa em pacientes com LES mostrou aumentar a capacidade de eliminação de IC, via receptor Fcγ (Salmon et al., 1989).

O LES é uma das doenças autoimunes com mais diversidade em parâmetros sorológicos e clínicos, justamente pela sua característica sistêmica. Alguns marcadores parecem acompanhar a gravidade do LES, com é o caso das moléculas de adesão ICAM-1 e E-selectina (Constans et al., 2003; Spronk et al., 1994; Takeuchi et al., 1993). A molécula VCAM-1, também mostrou correlação com a atividade da doença, acompanhando outros parâmetros de avaliação comumente utilizados na clínica: níveis séricos de C3, C4 e a titulação de anticorpos anti-DNA (Ykeda Y, 1998).

Os níveis de frações do complemento sempre estiveram intimamente ligados com o LES e doenças autoimunes no geral (Gared, 1991, Ballanti, 2013). Nos últimos anos, alguns trabalhos têm demonstrado que o fragmento C4d, produzido a partir da fração C4 da via clássica, acompanha a gravidade do LES em alguns casos, com níveis alterados não somente no soro, como também nos tecidos (Juan, 2014), colocando essa molécula como um potencial marcador para diagnóstico e acompanhamento das fases da doença.

Não foram detectados níveis alterados de ICAM-1 solúvel e do fragmento C4d entre os grupos estudados. A princípio, esses parâmetros parecem não ser alterados pela presença do neutrófilo de pacientes com LES, embora o nível dessas moléculas no soro esteja associado com a patologia da doença.

Em especial a liberação de ICAM-1 solúvel, também representa um marcador de ativação das células endoteliais, sua forma solúvel consiste da mesma molécula que está ligada à membrana das células – constitutivamente expressas em leucócitos e células endoteliais – porém, sem o domínio transmembrana.

A expressão de ICAM-1 está aumentada não somente em doenças autoimunes, mas também no câncer e doenças cardiovasculares (Van Buul et al., 2010; Lawso, 2012).

7. Conclusões

7. Conclusões

1) As células endoteliais são mais suscetíveis à peroxidação lipídica na presença de neutrófilos de pacientes com LES:

- A exposição das células endoteliais aos neutrófilos de pacientes com LES ativo, sem estímulo, resultou em maior peroxidação lipídica;

- A peroxidação lipídica foi maior quando as células endoteliais foram expostas aos neutrófilos de pacientes com LES inativo, os quais foram estimulados com IC/SHN;

2) A presença de complemento favorece a peroxidação lipídica e a expressão da molécula de adesão ICAM-1:

- O efeito da ativação dos neutrófilos, em todos os grupos, sobre a peroxidação lipídica das células endoteliais foi dependente da opsonização dos IC pelo complemento (IC/SHN);

- A expressão de ICAM-1 não foi diferente entre os grupos de neutrófilos, entretanto foi menor na ausência de complemento;

3) Não houve diferença na produção de ERO entre os neutrófilos dos grupos estudados;

4) A expressão de FcγRIIa (CD32) e CR1 está diminuída em neutrófilos de pacientes com LES ativo;

5) A liberação de catalase foi maior pelos neutrófilos de pacientes com LES, quando estes foram estimulados somente via FcγR (IC/SHI);

6) A produção de glutathiona foi maior por neutrófilos de pacientes com LES inativo quando estas células foram estimuladas via FcγR e CR (IC/SHN);

7) Não houve diferença na medida da ativação da via clássica do complemento avaliada pelo fragmento C4d.

8. Referências

8. Referências

- Alves, C. M. O. S., Marzocchi-Machado, C. M., Louzada-Junior, P., Azzolini, A. E. C. S., Polizello, A. C. M., de Carvalho, I. F., & Lucisano-Valim, Y. M. (2008). Superoxide anion production by neutrophils is associated with prevalent clinical manifestations in systemic lupus erythematosus. *Clinical Rheumatology*, 27(6), 701-708. doi:10.1007/s10067-007-0768-x
- Amulic, B., Cazalet, C., Hayes, G. L., Metzler, K. D., & Zychlinsky, A. (2012). Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annu Rev Immunol*, 30, 459-489. doi:10.1146/annurev-immunol-020711-074942
- Arbuckle, M. R., McClain, M. T., Rubertone, M. V., Scofield, R. H., Dennis, G. J., James, J. A., & Harley, J. B. (2003). Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med*, 349(16), 1526-1533. doi:10.1056/NEJMoa021933
- Attia, F. M., Maaty, A., & Kalil, F. A. (2011). Circulating endothelial cells as a marker of vascular dysfunction in patients with systemic lupus erythematosus by real-time polymerase chain reaction. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 135(11), 1482-1485. doi:10.5858/arpa.2010-0731-OA
- Babior, B. M. (1984). Oxidants from phagocytes: agents of defense and destruction. *Blood*, 64(5), 959-966.
- Babior, B. M. (2004). NADPH oxidase. *Curr Opin Immunol*, 16(1), 42-47.
- Babior, B. M., Lambeth, J. D., & Nauseef, W. (2002). The neutrophil NADPH oxidase. *Arch Biochem Biophys*, 397(2), 342-344. doi:10.1006/abbi.2001.2642
- Barreiros, A. L. B. S., & David, J. M. (2006). Divulgação. *Química Nova*, 29(1), 113-123. doi:10.1590/S0100-40422006000100021
- Beller, D. I., Springer, T. A., & Schreiber, R. D. (1982). Anti-Mac-1 selectively inhibits the mouse and human type three complement receptor. *J Exp Med*, 156(4), 1000-1009.
- Bengtsson, A. A., Pettersson, A., Wichert, S., Gullstrand, B., Hansson, M., Hellmark, T., & Johansson, A. C. (2014). Low production of reactive oxygen species in granulocytes is associated with organ damage in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther*, 16(3), R120. doi:10.1186/ar4575
- Bertsias G., C. R., Boumpas D.T. (2012). Lupus Erythematosus: Pathogenesis and Clinical Features. *BMJ*, 476-505.
- Bouma, G., Ancliff, P. J., Thrasher, A. J., & Burns, S. O. (2010). Recent advances in the understanding of genetic defects of neutrophil number and function. *Br J Haematol*, 151(4), 312-326. doi:10.1111/j.1365-2141.2010.08361.x
- Boumpas, D. T., Paliogianni, F., Anastassiou, E. D., & Balow, J. E. (1991). Glucocorticosteroid action on the immune system: molecular and cellular aspects. *Clin Exp Rheumatol*, 9(4), 413-423.
- Boxer, L. A., Richardson, S. B., & Baehner, R. L. (1978). Effects of Surface-Active Agents on Neutrophil Receptors. *INFECTION AND IMMUNITY*, 21(1), 28-33.
- Brown, E. J., Bohnsack, J. F., & Gresham, H. D. (1988). Mechanism of inhibition of immunoglobulin G-mediated phagocytosis by monoclonal antibodies that recognize the Mac-1 antigen. *J Clin Invest*, 81(2), 365-375. doi:10.1172/JCI113328
- Bruhns, P., Iannascoli, B., England, P., Mancardi, D. A., Fernandez, N., Jorieux, S., & Daeron, M. (2009). Specificity and affinity of human Fcγ receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood*, 113(16), 3716-3725. doi:10.1182/blood-2008-09-179754

- Brunkhorst, B. A., Strohmeier, G., Lazzari, K., Weil, G., Melnick, D., Fleit, H. B., & Simons, E. R. (1992). Differential roles of Fc gamma RII and Fc gamma RIII in immune complex stimulation of human neutrophils. *J Biol Chem*, 267(29), 20659-20666.
- Buyon, J. P., Tamerius, J., Belmont, H. M., & Abramson, S. B. (1992). Assessment of disease activity and impending flare in patients with systemic lupus erythematosus. Comparison of the use of complement split products and conventional measurements of complement. *Arthritis and rheumatism*, 35(9), 1028-1037.
- C.M., M.-M., C.M.O.S., A., A.E.C.S., A., A.C.M., P., I.F., C., & Y.M., L.-V. (2002). Fcgamma and complement receptors: expression, role and co-operation in mediating the oxidative burst and degranulation of neutrophils of Brazilian systemic lupus erythematosus patients. *Lupus*, 11, 240-248.
- Cascao, R., Rosario, H. S., & Fonseca, J. E. (2009). Neutrophils: warriors and commanders in immune mediated inflammatory diseases. *Acta Reumatol Port*, 34(2B), 313-326.
- Castro, L., & Freeman, B. A. (2001). Reactive oxygen species in human health and disease. *Nutrition*, 17(2), 161-165. doi:10.1016/S0899-9007(00)00570-0
- Cheng, L., Kellogg, E. W., 3rd, & Packer, L. (1981). Photoinactivation of catalase. *Photochem Photobiol*, 34(1), 125-129.
- Clancy, R., Marder, G., Martin, V., Belmont, H. M., Abramson, S. B., & Buyon, J. (2001). Circulating activated endothelial cells in systemic lupus erythematosus: further evidence for diffuse vasculopathy. *Arthritis and rheumatism*, 44(5), 1203-1208. doi:10.1002/1529-0131(200105)44:5<1203::AID-ANR204>3.0.CO;2-C
- Clark, R. A., Kimball, H. R., & Decker, J. L. (1974). Neutrophil chemotaxis in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*, 33(2), 167-172.
- Constans, J., Dupuy, R., Blann, A. D., Resplandy, F., Seigneur, M., Renard, M., . . . Conri, C. (2003). Anti-endothelial cell autoantibodies and soluble markers of endothelial cell dysfunction in systemic lupus erythematosus. *The Journal of rheumatology*, 30(9), 1963-1966.
- Cuchacovich, R., & Gedalia, A. (2009). Pathophysiology and clinical spectrum of infections in systemic lupus erythematosus. *Rheumatic diseases clinics of North America*, 35(1), 75-93. doi:10.1016/j.rdc.2009.03.003
- D'Cruz, D. (1998). Vasculitis in systemic lupus erythematosus. *Lupus*, 7(4), 270-274. doi:10.1191/096120398678920082
- Davies, K. A., Schifferli, J. A., & Walport, M. J. (1994). Complement deficiency and immune complex disease. *Springer Semin Immunopathol*, 15(4), 397-416.
- de Carvalho Lins, C. E., Pereira Crott, L. S., Teixeira, J. E., & Barbosa, J. E. (2004). Reduced erythrocyte complement receptor type 1 in systemic lupus erythematosus is related to a disease activity index and not to the presence or severity of renal disease. *Lupus*, 13(7), 517-521.
- Diamond, M. S., Staunton, D. E., de Fougerolles, A. R., Stacker, S. A., Garcia-Aguilar, J., Hibbs, M. L., & Springer, T. A. (1990). ICAM-1 (CD54): a counter-receptor for Mac-1 (CD11b/CD18). *J Cell Biol*, 111(6 Pt 2), 3129-3139.
- Ding, C., Ma, Y., Chen, X., Liu, M., Cai, Y., Hu, X., . . . Yan, J. (2013). Integrin CD11b negatively regulates BCR signalling to maintain autoreactive B cell tolerance. *Nat Commun*, 4, 2813. doi:10.1038/ncomms3813
- Droge, W. (2006). Redox regulation in anabolic and catabolic processes. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 9(3), 190-195. doi:10.1097/01.mco.0000222098.98514.40
- Dunkelberger, J. R., & Song, W. C. (2010). Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Res*, 20(1), 34-50. doi:10.1038/cr.2009.139

- Ellman, G. L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 82(1), 70-77. doi:10.1016/0003-9861(59)90090-6
- Faurschou, M., & Borregaard, N. (2003). Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect*, 5(14), 1317-1327.
- Fearon, D. T. (1980). Identification of the membrane glycoprotein that is the C3b receptor of the human erythrocyte, polymorphonuclear leukocyte, B lymphocyte, and monocyte. *J Exp Med*, 152(1), 20-30.
- Ferreiros-Vidal I., D. A. S., Papasteriades C. (2007). Bias in association studies of systemic lupus erythematosus susceptibility due to geographical variation in the frequency of a programmed cell death 1 polymorphism across Europe. *Genes Immun*(8), 138-146.
- Goyal, M. M., & Basak, A. (2010). Human catalase: looking for complete identity. *Protein Cell*, 1(10), 888-897. doi:10.1007/s13238-010-0113-z
- Greenberg, S., Chang, P., & Silverstein, S. C. (1993). Tyrosine phosphorylation is required for Fc receptor-mediated phagocytosis in mouse macrophages. *J Exp Med*, 177(2), 529-534.
- Guillevin, L., & Dorner, T. (2007). Vasculitis: mechanisms involved and clinical manifestations. *Arthritis Res Ther*, 9 Suppl 2, S9. doi:10.1186/ar2193
- Guthrie, L. A., McPhail, L. C., Henson, P. M., & Johnston, R. B., Jr. (1984). Priming of neutrophils for enhanced release of oxygen metabolites by bacterial lipopolysaccharide. Evidence for increased activity of the superoxide-producing enzyme. *J Exp Med*, 160(6), 1656-1671.
- Hager, M., Cowland, J. B., & Borregaard, N. (2010). Neutrophil granules in health and disease. *J Intern Med*, 268(1), 25-34. doi:10.1111/j.1365-2796.2010.02237.x
- Hallett M.B., L. D. (1995). Neutrophil priming: the cellular signals that say 'amber' but not 'green'. *Immunol*, 16(264-8).
- Harley, J. B., Alarcon-Riquelme, M. E., Criswell, L. A., Jacob, C. O., Kimberly, R. P., Moser, K. L., . . . Kelly, J. A. (2008). Genome-wide association scan in women with systemic lupus erythematosus identifies susceptibility variants in ITGAM, PTK, KIAA1542 and other loci. *Nat Genet*, 40(2), 204-210. doi:10.1038/ng.81
- Hashimoto, Y., Nakano, K., Yoshinoya, S., Tanimoto, K., & Itoh, K. (1992). Endothelial cell destruction by polymorphonuclear leukocytes incubated with sera from patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *Scand J Rheumatol*, 21(5), 209-214.
- Hebert, L. A. (1991). The clearance of immune complexes from the circulation of man and other primates. *Am J Kidney Dis*, 17(3), 352-361.
- Hepburn, A. L., Mason, J. C., Wang, S., Shepherd, C. J., Florey, O., Haskard, D. O., & Davies, K. A. (2006). Both Fcγ and complement receptors mediate transfer of immune complexes from erythrocytes to human macrophages under physiological flow conditions in vitro. *Clin Exp Immunol*, 146(1), 133-145. doi:10.1111/j.1365-2249.2006.03174.x
- Hsieh, S. C., Wu, T. H., Tsai, C. Y., Li, K. J., Lu, M. C., Wu, C. H., & Yu, C. L. (2008). Abnormal in vitro CXCR2 modulation and defective cationic ion transporter expression on polymorphonuclear neutrophils responsible for hyporesponsiveness to IL-8 stimulation in patients with active systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)*, 47(2), 150-157. doi:10.1093/rheumatology/kem320
- Huang, Z. Y., Hunter, S., Chien, P., Kim, M. K., Han-Kim, T. H., Indik, Z. K., & Schreiber, A. D. (2011). Interaction of two phagocytic host defense systems: Fcγ receptors and complement receptor 3. *J Biol Chem*, 286(1), 160-168. doi:10.1074/jbc.M110.163030

- Iliopoulos, A. G., & Tsokos, G. C. (1996). Immunopathogenesis and spectrum of infections in systemic lupus erythematosus. *Semin Arthritis Rheum*, 25(5), 318-336.
- Irshad, M., & Chaudhuri, P. S. (2002). Oxidant-antioxidant system: role and significance in human body. *Indian J Exp Biol*, 40(11), 1233-1239.
- Jaillon, S., Galdiero, M. R., Del Prete, D., Cassatella, M. A., Garlanda, C., & Mantovani, A. (2013). Neutrophils in innate and adaptive immunity. *Semin Immunopathol*, 35(4), 377-394. doi:10.1007/s00281-013-0374-8
- Jancinova, V., Drabikova, K., Nosal, R., Rackova, L., Majekova, M., & Holomanova, D. (2006). The combined luminol/isoluminol chemiluminescence method for differentiating between extracellular and intracellular oxidant production by neutrophils. *Redox Rep*, 11(3), 110-116. doi:10.1179/135100006X116592
- Januszewski, A. S., Alderson, N. L., Jenkins, A. J., Thorpe, S. R., & Baynes, J. W. (2005). Chemical modification of proteins during peroxidation of phospholipids. *J Lipid Res*, 46(7), 1440-1449. doi:10.1194/jlr.M400442-JLR200
- Jerke, U., Rolle, S., Purfurst, B., Luft, F. C., Nauseef, W. M., & Kettritz, R. (2013). beta2 integrin-mediated cell-cell contact transfers active myeloperoxidase from neutrophils to endothelial cells. *J Biol Chem*, 288(18), 12910-12919. doi:10.1074/jbc.M112.434613
- Jovanovic, V., Dai, X., Lim, Y. T., Kemeny, D. M., & MacAry, P. A. (2009). Fc gamma receptor biology and systemic lupus erythematosus. *Int J Rheum Dis*, 12(4), 293-298. doi:10.1111/j.1756-185X.2009.01426.x
- Kirchner T., M. S., Klinger M. (2012). The impact of various reactive oxygen species on the formation of neutrophil extracellular traps. *Mediators Inflamm*(2012:849136).
- Klebanoff, S. J. (2005). Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol*, 77(5), 598-625. doi:10.1189/jlb.1204697
- Kluz, J., Kopec, W., Jakobsche-Policht, U., & Adamiec, R. (2009). Circulating endothelial cells, endothelial apoptosis and soluble markers of endothelial dysfunction in patients with systemic lupus erythematosus-related vasculitis. *Int Angiol*, 28(3), 192-201.
- Koffler, D., Agnello, V., Thoburn, R., & Kunkel, H. G. (1971). Systemic lupus erythematosus: prototype of immune complex nephritis in man. *J Exp Med*, 134(3), 169-179.
- Kohl, J. (2006). Self, non-self, and danger: a complementary view. *Adv Exp Med Biol*, 586, 71-94. doi:10.1007/0-387-34134-X_6
- Krauss, J. C., PooH, Xue, W., Mayo-Bond, L., Todd, R. F., 3rd, & Petty, H. R. (1994). Reconstitution of antibody-dependent phagocytosis in fibroblasts expressing Fc gamma receptor IIIB and the complement receptor type 3. *J Immunol*, 153(4), 1769-1777.
- Kuijpers, T. W. (2002). Clinical symptoms and neutropenia: the balance of neutrophil development, functional activity, and cell death. *Eur J Pediatr*, 161 Suppl 1, S75-82. doi:10.1007/s00431-002-1009-6
- Kurien, B. T., Hensley, K., Bachmann, M., & Scofield, R. H. (2006). Oxidatively modified autoantigens in autoimmune diseases. *Free Radic Biol Med*, 41(4), 549-556. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2006.05.020
- Lach-Trifilieff, E., Marfurt, J., Schwarz, S., Sadallah, S., & Schifferli, J. A. (1999). Complement receptor 1 (CD35) on human reticulocytes: normal expression in systemic lupus erythematosus and HIV-infected patients. *J Immunol*, 162(12), 7549-7554.

- Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M. I., & Nourshargh, S. (2007). Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol*, 7(9), 678-689. doi:10.1038/nri2156
- Li, J. a., & Zhang, Z. (2014). The Important Roles of C4d in Systemic Lupus Erythematosus. *Rheumatology: Current Research*, 04(02), 2-5. doi:10.4172/2161-1149.1000135
- Li, X., Ptacek, T. S., Brown, E. E., & Edberg, J. C. (2009). Fcγ receptors: structure, function and role as genetic risk factors in SLE. *Genes Immun*, 10(5), 380-389. doi:10.1038/gene.2009.35
- Lisnevskaja L, M. G., Isenberg D. (2014). Systemic lupus erythematosus. *Lancet*, 14(S0140-6736), 60128-60128.
- Lofgren, R., Serrander, L., Forsberg, M., Wilsson, A., Wasteson, A., & Stendahl, O. (1999). CR3, FcγRIIA and FcγRIIIB induce activation of the respiratory burst in human neutrophils: the role of intracellular Ca²⁺, phospholipase D and tyrosine phosphorylation. *Biochim Biophys Acta*, 1452(1), 46-59.
- Lorenz, G., Desai, J., & Anders, H. J. (2014). Lupus nephritis: update on mechanisms of systemic autoimmunity and kidney immunopathology. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 23(3), 211-217. doi:10.1097/01.mnh.0000444816.57378.21
- Lozada, C., Levin, R. I., Huie, M., Hirschhorn, R., Naime, D., Whitlow, M., . . . Cronstein, B. N. (1995). Identification of C1q as the heat-labile serum cofactor required for immune complexes to stimulate endothelial expression of the adhesion molecules E-selectin and intercellular and vascular cell adhesion molecules 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(18), 8378-8382.
- Mantovani, B. (1975). Different roles of IgG and complement receptors in phagocytosis by polymorphonuclear leukocytes. *J Immunol*, 115(1), 15-17.
- Manzi, S., Rairie, J. E., Carpenter, A. B., Kelly, R. H., Jagarlapudi, S. P., Sereika, S. M., . . . Ramsey-Goldman, R. (1996). Sensitivity and specificity of plasma and urine complement split products as indicators of lupus disease activity. *Arthritis & Rheumatism*, 39(7), 1178-1188. doi:10.1002/art.1780390716
- Marks, R. M., Todd, R. F., 3rd, & Ward, P. A. (1989). Rapid induction of neutrophil-endothelial adhesion by endothelial complement fixation. *Nature*, 339(6222), 314-317. doi:10.1038/339314a0
- Marzocchi-Machado C.M., Lucisano-Valim, Y M. (1997). Clearance de imunocomplexos: papel do complemento e dos polimorfonucleares neutrófilos. *Medicina, Ribeirão Preto*(30), 234-242.
- Marzocchi-Machado CM, Alves CM, Azzolini AE, Polizello AC, Carvalho IF, Lucisano-Valim YM. (2002). Fcγ and complement receptors: expression, role and co-operation in mediating the oxidative burst and degranulation of neutrophils of Brazilian systemic lupus erythematosus patients. *Lupus*, 11:240-8 (4). doi: 10.1191/0961203302lu172oa
- Mascart-Lemone, F., Hauptmann, G., Goetz, J., Duchateau, J., Delespesse, G., Vray, B., & Dab, I. (1983). Genetic deficiency of C4 presenting with recurrent infections and a SLE-like disease. Genetic and immunologic studies. *Am J Med*, 75(2), 295-304.
- Mayadas, T. N., Tsokos, G. C., & Tsuboi, N. (2009). Mechanisms of immune complex-mediated neutrophil recruitment and tissue injury. *Circulation*, 120(20), 2012-2024. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.771170
- McCall, C. E., DeChatelet, L. R., Cooper, M. R., & Shannon, C. (1973). Human toxic neutrophils. 3. Metabolic characteristics. *J Infect Dis*, 127(1), 26-33.

- Medof, M. E., Iida, K., Mold, C., & Nussenzweig, V. (1982). Unique role of the complement receptor CR1 in the degradation of C3b associated with immune complexes. *J Exp Med*, 156(6), 1739-1754.
- Mok, C. C., & Lau, C. S. (2003). Pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *J Clin Pathol*, 56(7), 481-490.
- Moraes, T. J., Zurawska, J. H., & Downey, G. P. (2006). Neutrophil granule contents in the pathogenesis of lung injury. *Curr Opin Hematol*, 13(1), 21-27.
- Nathan, C. (2006). Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol*, 3(6), 173-182.
- Nickeleit, V., & Mihatsch, M. J. (2003). Kidney transplants, antibodies and rejection: is C4d a magic marker? *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 18(11), 2232-2239.
- Niederer, H. A., Clatworthy, M. R., Willcocks, L. C., & Smith, K. G. (2010). FcγRIIB, FcγRIIIB, and systemic lupus erythematosus. *Ann N Y Acad Sci*, 1183, 69-88. doi:10.1111/j.1749-6632.2009.05132.x
- Palanichamy, A., Bauer, J. W., Yalavarthi, S., Meednu, N., Barnard, J., Owen, T., . . . Anolik, J. H. (2014). Neutrophil-mediated IFN activation in the bone marrow alters B cell development in human and murine systemic lupus erythematosus. *J Immunol*, 192(3), 906-918. doi:10.4049/jimmunol.1302112
- Phillips, R., Lomnitzer, R., Wade, A. A., & Rabson, A. R. (1985). Defective monocyte function in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol Immunopathol*, 34(1), 69-76.
- Phillipson, M., Heit, B., Colarusso, P., Liu, L., Ballantyne, C. M., & Kubes, P. (2006). Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade. *J Exp Med*, 203(12), 2569-2575. doi:10.1084/jem.20060925
- Pricop, L., Gokhale, J., Redecha, P., Ng, S. C., & Salmon, J. E. (1999). Reactive oxygen intermediates enhance Fc gamma receptor signaling and amplify phagocytic capacity. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 162(12), 7041-7048.
- Quinn, M. T., & Gauss, K. A. (2004). Structure and regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase: comparison with nonphagocyte oxidases. *J Leukoc Biol*, 76(4), 760-781. doi:10.1189/jlb.0404216
- Rahman, I., Biswas, S. K., & Kirkham, P. A. (2006). Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. *Biochem Pharmacol*, 72(11), 1439-1452. doi:10.1016/j.bcp.2006.07.004
- Rajagopalan, S., Somers, E. C., Brook, R. D., Kehrer, C., Pfenninger, D., Lewis, E., . . . Kaplan, M. J. (2004). Endothelial cell apoptosis in systemic lupus erythematosus: a common pathway for abnormal vascular function and thrombosis propensity. *Blood*, 103(10), 3677-3683. doi:10.1182/blood-2003-09-3198
- Ramsland, P. A., Farrugia, W., Bradford, T. M., Sardjono, C. T., Esparon, S., Trist, H. M., . . . Hogarth, P. M. (2011). Structural basis for Fc γRIIa recognition of human IgG and formation of inflammatory signaling complexes. *J Immunol*, 187(6), 3208-3217. doi:10.4049/jimmunol.1101467
- Rhodes, B., & Vyse, T. J. (2008). The genetics of SLE: an update in the light of genome-wide association studies. *Rheumatology (Oxford)*, 47(11), 1603-1611. doi:10.1093/rheumatology/ken247

- Ricklin, D., Hajishengallis, G., Yang, K., & Lambris, J. D. (2010). Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol*, 11(9), 785-797. doi:10.1038/ni.1923
- Rose, D. M., Alon, R., & Ginsberg, M. H. (2007). Integrin modulation and signaling in leukocyte adhesion and migration. *Immunol Rev*, 218, 126-134. doi:10.1111/j.1600-065X.2007.00536.x
- Rosetti, F., & Mayadas, T. N. (2016). The many faces of Mac-1 in autoimmune disease. *Immunol Rev*, 269(1), 175-193. doi:10.1111/imr.12373
- Salmon, J. E., Edberg, J. C., Brogle, N. L., & Kimberly, R. P. (1992). Allelic polymorphisms of human Fc gamma receptor IIA and Fc gamma receptor IIIB. Independent mechanisms for differences in human phagocyte function. *J Clin Invest*, 89(4), 1274-1281. doi:10.1172/JCI115712
- Salmon, J. E., Kapur, S., Meryhew, N. L., Runquist, O. A., & Kimberly, R. P. (1989). High-dose, pulse intravenous methylprednisolone enhances Fc gamma receptor-mediated mononuclear phagocyte function in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, 32(6), 717-725.
- Scapini P., C. M. A. (2014). Social networking of human neutrophils within the immune system. *Blood*, 5(124), 710-719.
- Schifferli, J. A., Ng, Y. C., & Peters, D. K. (1986). The role of complement and its receptor in the elimination of immune complexes. *The New England journal of medicine*, 315(8), 488-495. doi:10.1056/NEJM198608213150805
- Schreiber, A. D., Parsons, J., McDermott, P., & Cooper, R. A. (1975). Effect of corticosteroids on the human monocyte IgG and complement receptors. *J Clin Invest*, 56(5), 1189-1197. doi:10.1172/JCI108196
- Segal, A. W., Dorling, J., & Coade, S. (1980). Kinetics of fusion of the cytoplasmic granules with phagocytic vacuoles in human polymorphonuclear leukocytes. Biochemical and morphological studies. *J Cell Biol*, 85(1), 42-59.
- Segal, A. W., & Meshulam, T. (1979). Production of superoxide by neutrophils: a reappraisal. *FEBS Lett*, 100(1), 27-32.
- Senaldi, G., Makinde, V. A., Vergani, D., & Isenberg, D. A. (1988). Correlation of the activation of the fourth component of complement (C4) with disease activity in systemic lupus erythematosus. *Annals of the rheumatic diseases*, 47(11), 913-917. doi:10.1136/ard.47.11.913
- Simms, H. H., & D'Amico, R. (1995). Subcellular location of neutrophil opsonic receptors is altered by exogenous reactive oxygen species. *Cellular immunology*, 166(1), 71-82. doi:10.1006/cimm.1995.0009
- Spronk, P. E., Bootsma, H., Huitema, M. G., Limburg, P. C., & Kallenberg, C. G. (1994). Levels of soluble VCAM-1, soluble ICAM-1, and soluble E-selectin during disease exacerbations in patients with systemic lupus erythematosus (SLE); a long term prospective study. *Clin Exp Immunol*, 97(3), 439-444.
- Staples, P. J., Gerding, D. N., Decker, J. L., & Gordon, R. S., Jr. (1974). Incidence of infection in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, 17(1), 1-10.
- Stoeger, Z. M., Bezalel, S., Chapnik, N., Asher, I., & Froy, O. (2009). High alpha-defensin levels in patients with systemic lupus erythematosus. *Immunology*, 127(1), 116-122. doi:10.1111/j.1365-2567.2008.02997.x
- Stocco, B., Fumagalli, H. F., Franceschini, S. A., Martinez, E. Z., Marzocchi-Machado, C. M., & Toloi, M. R. (2012). Drospirenone and levonorgestrel in combination with either 30 or 20 mcg ethinylestradiol reduce soluble adhesion molecules in Brazilian

- women; cross-sectional study. *Contraception*, 86(5), 506-510.
doi:10.1016/j.contraception.2012.03.013
- Takeuchi, T., Amano, K., Sekine, H., Koide, J., & Abe, T. (1993). Upregulated expression and function of integrin adhesive receptors in systemic lupus erythematosus patients with vasculitis. *J Clin Invest*, 92(6), 3008-3016. doi:10.1172/JCI116924
- Tenedios, F., Erkan, D., & Lockshin, M. D. (2005). Cardiac involvement in the antiphospholipid syndrome. *Lupus*, 14(9), 691-696.
- Tentori, L., & Salvati, A. M. (1981). Hemoglobinometry in human blood. *Methods Enzymol*, 76, 707-715.
- Thomas, M. J., Hedrick, C. C., Smith, S., Pang, J., Jerome, W. G., Willard, A. S., & Shirley, P. S. (1992). Superoxide generation by the human polymorphonuclear leukocyte in response to latex beads. *J Leukoc Biol*, 51(6), 591-596.
- Toller-Kawahisa, J. (2016). Influência do burst oxidativo dos neutrófilos e da obesidade no estabelecimento do lúpus eritematoso sistêmico [tese]. *Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto*, 139.
- Toller-Kawahisa J.E., V.-F. I. C., Pancoto J.A. (2014). The variant of CD11b, rs1143679 within ITGAM, is associated with systemic lupus erythematosus and clinical manifestations in Brazilian patients. *Hum Immunol*, 2(75), 119-123.
- Toller-Kawahisa, J. E. (2012). Associação dos polimorfismos dos FcγR e do CR3 no lúpus eritematoso sistêmico e sua influência no burst oxidativo dos neutrófilos. *Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto*, 103.
- Trouw, L. A., & Daha, M. R. (2011). Role of complement in innate immunity and host defense. *Immunol Lett*, 138(1), 35-37. doi:10.1016/j.imlet.2011.02.014
- Tsuboi, N., Asano, K., Lauterbach, M., & Mayadas, T. N. (2008). Human neutrophil Fcγ receptors initiate and play specialized nonredundant roles in antibody-mediated inflammatory diseases. *Immunity*, 28(6), 833-846.
doi:10.1016/j.immuni.2008.04.013
- Uriarte, S. M., Rane, M. J., Luerman, G. C., Barati, M. T., Ward, R. A., Nauseef, W. M., & McLeish, K. R. (2011). Granule exocytosis contributes to priming and activation of the human neutrophil respiratory burst. *J Immunol*, 187(1), 391-400.
doi:10.4049/jimmunol.1003112
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int.J.Biochem.Cell Biol.*, 39(1357-2725 (Print)), 44-84.
doi:10.1016/j.biocel.2006.07.001
- Vigato-Ferreira, I. (2012). FcγR e CR3 no lúpus eritematoso sistêmico: variantes polimórficas e sua influência na fagocitose e desgranulação dos neutrófilos. *Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto- USP. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto*, 94.
- Vigato-Ferreira I.C., T.-K. J. E., Pancoto J.A., Mendes-Junior C.T., Martinez E.Z., Donadi E.A., Louzada-Júnior P., Del Lama J.E., Marzocchi-Machado C.M. (2014). FcγRIIa and FcγRIIIb polymorphisms and associations with clinical manifestations in Brazilian systemic lupus erythematosus patients. *Autoimmunity*, 4, 1-8.
- Villanueva, E., Yalavarthi, S., Berthier, C. C., Hodgins, J. B., Khandpur, R., Lin, A. M., . . . Kaplan, M. J. (2011). Netting neutrophils induce endothelial damage, infiltrate tissues, and expose immunostimulatory molecules in systemic lupus erythematosus. *J Immunol*, 187(1), 538-552. doi:10.4049/jimmunol.1100450

- Vordenbaumen, S., Fischer-Betz, R., Timm, D., Sander, O., Chehab, G., Richter, J., Schneider, M. (2010). Elevated levels of human beta-defensin 2 and human neutrophil peptides in systemic lupus erythematosus. *Lupus*, 19(14), 1648-1653. doi:10.1177/0961203310377089
- Weiss, S. J. (1989). Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med*, 320(6), 365-376. doi:10.1056/NEJM198902093200606
- Willcocks, L. C., Smith, K. G., & Clatworthy, M. R. (2009). Low-affinity Fcgamma receptors, autoimmunity and infection. *Expert Rev Mol Med*, 11, e24. doi:10.1017/S1462399409001161
- Wilson, J. G., Ratnoff, W. D., Schur, P. H., & Fearon, D. T. (1986). Decreased expression of the C3b/C4b receptor (CR1) and the C3d receptor (CR2) on B lymphocytes and of CR1 on neutrophils of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis and rheumatism*, 29(6), 739-747.
- Wu, C. H., Hsieh, S. C., Li, K. J., Lu, M. C., & Yu, C. L. (2007). Premature telomere shortening in polymorphonuclear neutrophils from patients with systemic lupus erythematosus is related to the lupus disease activity. *Lupus*, 16(4), 265-272. doi:10.1177/0961203307077155
- Zandman-Goddard, G., & Shoenfeld, Y. (2003). SLE and infections. *Clin Rev Allergy Immunol*, 25(1), 29-40. doi:10.1385/CRIAI:25:1:29
- Zarbock, A., & Ley, K. (2008). Mechanisms and consequences of neutrophil interaction with the endothelium. *Am J Pathol*, 172(1), 1-7. doi:10.2353/ajpath.2008.070502
- Zhou, M. J., & Brown, E. J. (1994). CR3 (Mac-1, alpha M beta 2, CD11b/CD18) and Fc gamma RIII cooperate in generation of a neutrophil respiratory burst: requirement for Fc gamma RIII and tyrosine phosphorylation. *J Cell Biol*, 125(6), 1407-1416.
- Zonana-Nacach, A., Camargo-Coronel, A., Yanez, P., Sanchez, L., Jimenez-Balderas, F. J., & Fraga, A. (2001). Infections in outpatients with systemic lupus erythematosus: a prospective study. *Lupus*, 10(7), 505-510.

9. Material suplementar

9.1 Figuras suplementares

Figura suplementar 1 – Quimioluminescência (QL) de neutrófilos dependentes de luminol 10^{-4} M. Em (A) cada ponto representa áreas sob a curva dos perfis de QL gerados por neutrófilos (2×10^5) de cada indivíduo saudável (azul) ou paciente com LES (rosa). As células foram estimuladas com IC-IgG/SHN; IC-IgG/SHI; ou com adição somente de SHN/SHI. Em (B) área sob a curva do perfil de QL de cada indivíduo com o valor gerado pela reação espontânea descontado de cada ensaio. A reação foi acompanhada em luminômetro a 37°C por 30 minutos e registrada em contagem de fótons por minuto (cpm).

Figura suplementar 2 – Quimioluminescência (QL) de neutrófilos dependentes de luminol 10^{-4} M. Em (A) cada ponto representa áreas sob a curva dos perfis de QL gerados por neutrófilos (2×10^5) de cada indivíduo saudável (azul), pacientes com LES ativo (rosa) ou pacientes com LES inativo. As células foram estimuladas com IC-IgG/SHN; IC-IgG/SHI; ou com adição somente de SHN/SHI. Em (B) área sob a curva do perfil de QL de cada indivíduo com o valor gerado pela reação espontânea descontado de cada ensaio. A reação foi acompanhada em luminômetro a 37°C por 30 minutos e registrada em contagem de fótons por minuto (cpm).

[U]	Abs
1	0,069
10	0,1
30	0,193
50	0,273

Figura suplementar 3 – Curva de concentração da catalase (atividade enzimática). A leitura da catalase foi realizada por meio da variação da absorbância da amostra em espectrofotômetro a 240 nm durante 2 minutos, após a adição de padrões em diferentes concentrações juntamente com peróxido de hidrogênio 10nM em tampão fosfato pH 7,0 . Os resultados foram expressos em nmol/mg de proteína.

[ng/mL]	Abs
1.56	0,011
3.13	0,039
6.25	0,121
12.5	0,326
25	0,805
50	1,65

Figura suplementar 4 – Curva de concentração de ICAM-1 solúvel. A leitura absorbância da amostra em espectrofotômetro a 240 nm durante 2 minutos, após a adição de padrões em em tampão fosfato pH 7,0 . Os resultados foram expressos em nmol/mg de proteína.

Figura suplementar 5 – Curva de concentração de glutatona total. A leitura da glutatona presentes nos padrões foi realizada, pela absorbância da amostra em espectrofotômetro a 412 nm após a adição de 5-5'-dithio-bis (ácido-2-nitrobenzólico) (DTNB) em tampão Tris-HCl-EDTA pH 8,9. Os resultados foram expressos em nmol/mg de proteína.

Figura suplementar 6 – Curva de concentração do fragmento C4d. A leitura do fragmento C4d presentes nos padrões foi realizada pela absorbância da amostra em espectrofotômetro a 405 nm. O cálculo da concentração foi realizado por meio da curva padrão e os resultados foram apresentados em μg/mL.

Figura suplementar 7 – Curva da concentração do malonaldeído. A leitura dos padrões foi realizada pela absorbância da amostra em espectrofotômetro a 534 nm. O cálculo da concentração foi realizado por meio da curva padrão e os resultados foram apresentados em $\mu\text{g/mL}$.

9.2 Protocolos para preparo das principais soluções

Solução balanceada de Hanks

Cloreto de sódio (NaCl)	8 g
Cloreto de potássio (KCl)	0,4 g
Cloreto de cálcio (CaCl ₂)	0,139 g
Cloreto de magnésio hexaidratado (MgCl ₂ ·6H ₂ O)	0,1 g
Sulfato de magnésio heptaidratado (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	0,1 g
Fosfato dissódico (Na ₂ HPO ₄)	0,048 g
Fosfato de potássio monobásico (KH ₂ PO ₄)	0,06 g
Glicose (C ₆ H ₁₂ O ₆)	1 g
Bicarbonato de sódio (NaHCO ₃)	0,35 g
Água deionizada qsp	1000 mL

Ajustar o pH final para 7,2 com NaOH. Filtrar.

Solução de gelatina 2,5% NaCl 0,15 M

Gelatina	2,5 g
Solução de NaCl 0,15M qsp.	100 mL

Aquecer NaCl e adicionar a gelatina. Manter a 37°C.

Cloreto de Amônio 0,83%

NH ₄ Cl	8,56 g
Água deionizada qsp.	1000 mL

Ajustar pH para 7,2. Filtrar

Solução de Alséver

Citrato trissódico 2H ₂ O	8 g
NaCl	0,4 g
Glicose	0,139 g
Água deionizada qsp.	1000 mL

Ajustar pH final para 6,1. Filtrar.

Cloreto de Sódio 0,15 M (0,9%)

NaCl	8,76 g
Água deionizada qsp.	1000 mL

Autoclavar

PBS pH 7,4 (10X)

NaCl	80 g
KCl	2 g
Na ₂ HPO ₄	11,5 g
K ₂ HPO ₄	2 g
Água deionizada qsp.	1000 mL

Ajustar pH final para 7,4

Líquido de Turk

Violeta genciana 1 %	1 mL
Ácido acético glacial	1 mL
Água deionizada qsp.	100 mL

Diluir

Solução de Luminol

Luminol	1,77 g
DMSO	20 µL

Diluir 10 µL de luminol em DMSO em
4990 µL de solução balanceada de Hanks

Tampão 400 nmol Tris-HCl·20 nmol EDTA

Tris (C ₄ H ₁₁ NO ₃) 400 nmol	4,8456 g
EDTA dissódico diidratado (C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₈ Na ₂ ·2H ₂ O) 20 nmol	0,7448 g
Água deionizada qsp.	1000 mL

Acertar o pH para 8,9

Padrão de Cisteína

Cisteína ($\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2\text{S}$)	0,0176g
EDTA dissódico diidratado ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0,3722g
Água deionizada qsp	50 mL

Refrigerar (validade 10 dias)

Solução TBA-TCA-HCl

2-Ácido tiobarbitúrico ($\text{C}_4\text{H}_4\text{ON}_2\text{S}$)	3,7 g
Ácido tricloroacético ($\text{C}_2\text{HCl}_3\text{O}_2$) 50 %	300 mL
Ácido clorídrico (HCl)	20,8 g
Água deionizada qsp	1000 mL

Armazenar (frasco plástico)

CFD (Tampão de fixação do complemento) 5x

Ácido dietilbarbitúrico ($\text{C}_8\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_3$)	0,72 g
Barbital sódico ($\text{C}_8\text{H}_{11}\text{N}_2\text{NaO}_3$)	0,23 g
Cloreto de sódio (NaCl)	10,64 g
Cloreto de magnésio hexaidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0,21 g
Cloreto de cálcio (CaCl_2)	0,035 g
Azida (NaN_3)	0,081 g
Água deionizada estéril qsp.	250 mL

Acertar o pH para 7,2

Anexo 1

Anexo 1. Aprovação do protocolo de pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. CEP/FCFRP nº. 036/2015
kms

Ribeirão Preto, 26 de junho de 2015.

Ao pós-graduando

Leandro Sobrinho Ávila

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Cleni Mara Marzocchi Machado
FCFRP/USP

Prezado Pesquisadores,

Informamos que o projeto de pesquisa intitulado “**ATIVÇÃO DOS NEUTRÓFILOS DE PACIENTES COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO SOBRE CÉLULAS ENDOTELIAIS IN VITRO: IMPLICAÇÕES NA LESÃO TECIDUAL MEDIADA POR IMUNOCOMPLEXOS**”, apresentado por Vossa Senhoria a este Comitê, Protocolo **CEP/FCFRP 014-CP** foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em sua 144^a Sessão Ordinária realizada em 25/06/2015.

Lembramos que, de acordo com a Resolução 466/2012, item IV.5, letra d, o TCLE deverá “ser elaborado em duas vias, rubricadas em todas as suas páginas e assinadas, ao seu término, pelo convidado a participar da pesquisa, ou por seu representante legal, assim como pelo pesquisador responsável, ou pela(s) pessoa(s) por ele delegada(s), devendo as páginas de assinaturas estar na mesma folha. Em ambas as vias deverão constar o endereço e contato telefônico ou outro, dos responsáveis pela pesquisa e do CEP local”.

Informamos que deverá ser encaminhado ao CEP o relatório final da pesquisa em formulário próprio deste Comitê, bem como comunicada qualquer alteração, intercorrência ou interrupção do mesmo, tais como eventos adversos e eventuais modificações no protocolo ou nos membros da equipe, através da interposição de emenda na Plataforma Brasil.

Segue anexa a Declaração de aprovação pela coparticipante.

Atenciosamente,

Prof^ª. Dr^ª. Elisa Maria de Sousa Russo
Vice-Coordenadora do CEP/FCFRP