ANA CATARINA LUNZ MACEDO

**EFEITO DA CURCUMINA NA SECREÇÃO DE FATOR H MUTANTE EM
PACIENTE DEFICIENTE DESTA PROTEÍNA REGULADORA DO SISTEMA
COMPLEMENTO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de
Mestre em Ciências.

São Paulo
2017

ANA CATARINA LUNZ MACEDO

**EFEITO DA CURCUMINA NA SECREÇÃO DE FATOR H MUTANTE EM
PACIENTE DEFICIENTE DESTA PROTEÍNA REGULADORA DO SISTEMA
COMPLEMENTO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de
Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Sistema Complemento.

Orientadora: Profa. Dra. Lourdes Isaac.

Versão corrigida.

São Paulo
2017

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Macedo, Ana Catarina Lunz
EFEITO DA CURCUMINA NA SECREÇÃO DE FATOR H
MUTANTE EM PACIENTE DEFICIENTE DESTA PROTEÍNA
REGULADORA DO SISTEMA COMPLEMENTO / Ana Catarina
Lunz Macedo; orientador Lourdes Isaac. -- São
Paulo, 2017.
118 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Fator H. 2. Imunodeficiência. 3. Tratamento
experimental. 4. Curcumina. 5. Chaperona. I. Isaac,
Lourdes, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Ana Catarina Lunz Macedo

Titulo da Dissertação: EFEITO DA CURCUMINA NA SECREÇÃO DE FATOR H MUTANTE EM PACIENTE DEFICIENTE DESTA PROTEÍNA REGULADORA DO SISTEMA COMPLEMENTO

Orientador: Lourdes Isaac

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão publica realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

() **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

CERTIFICAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

PROJETO DE PESQUISA

Título: EFEITO DA CURCUMINA NA SECREÇÃO DE FATOR H MUTANTE EM PACIENTE DEFICIENTE DESTA PROTEÍNA REGULADORA DO SISTEMA COMPLEMENTO
Pesquisador Responsável: Dewton de Moraes Vasconcelos **Versão:** 1
Pesquisador Executante: Lourdes Isaac **CAAE:** 46302315.1.0000.0068
Co-autores: Lourdes Isaac (Investigadora principal), Ana Catarina Lunz Macedo (pós-graduanda), José Antonio Tavares de Albuquerque (Investigador associado)
Finalidade Acadêmica: Mestrado
Instituição: HCFMUSP
Departamento: DERMATOLOGIA

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Registro on-line: 12574

Número do Parecer: 1.151.183

Data da Relatoria: 15/07/2015

Apresentação do Projeto: O grupo de pesquisa liderado pelo Prof. Dewton Moraes Vasconcelos identificou em um paciente com deficiência de fator H, mutação por troca simples de nucleotídeo, a qual, embora não afete a funcionalidade proteica, impede sua secreção por fibroblastos. Isto se deve à retenção da proteína no retículo endoplasmático de fibroblastos, o que é atenuado em células cultivadas, pelo tratamento com chaperonas químicas, como 4-PBA e curcumina.

Objetivo da Pesquisa: Avaliar em um paciente com deficiência de fator H, seguido no Ambulatório de Manifestações Dermatológicas das Imunodeficiências Primárias, o efeito do tratamento com curcumina (complexada a nanopartícula, Theracurmin TM) sobre a atividade do sistema complemento no soro, concentração de fator H, B e C3.

Avaliação dos Riscos e Benefícios: Risco baixo associado às coletas de sangue periférico e biópsia de pele. O estudo propiciará importante resultado para perspectiva de tratamento de pacientes com deficiência de fator H, com melhora da sobrevida, redução de infecções e retardo de evolução para glomerulonefrite membranoproliferativa.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: Seria interessante a realização de biópsia ao final do tratamento para determinação em fibroblastos de proteínas marcadoras de estresse de retículo endoplasmático e da via adaptativa a proteínas mal enoveladas.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: Adequado.

Recomendações: Assinalar risco baixo no TCLE.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: Assinalar risco baixo no TCLE.

Situação do Parecer: Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP: Não

Considerações Finais a critério do CEP: Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

São Paulo, 15 de Julho de 2015

Prof. Dr. Alfredo José Mansur

Coordenador

Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa – CAPPesq

Rua Dr. Ovídio Pires de Campos, 225 - Prédio da Administração - 5º andar
CEP 05403-010 - São Paulo - SP.

55 11 2661-7585 - 55 11 2661-6442 ramais: 16, 17, 18 | cappesq.adm@hc.fm.usp.br

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

INSTITUTO DE CIÊNCIAS
BIOMÉDICAS DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Efeito da Curcumina na Secreção de Fator H Mutante em Paciente Deficiente desta Proteína

Pesquisador: Dewton de Moraes Vasconcelos

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 46302315.1.3001.5467

Instituição Proponente: HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P

Patrocinador Principal: FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.200.913

Apresentação do Projeto:

Título da Pesquisa: Efeito da Curcumina na Secreção de Fator H Mutante em Paciente Deficiente desta Proteína

Pesquisador Responsável: Dewton de Moraes Vasconcelos

Instituição Proponente: HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P

Objetivo da Pesquisa:

O Relator acata o parecer do CEP/HC - CAPPesq

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O Relator acata o parecer do CEP/HC - CAPPesq

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O Relator acata o parecer do CEP/HC - CAPPesq

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O TCLE deverá ser readequado para atendimento da Resolução 466/12: 1- inserir contato do CEP; 2- Explicitar, no doc. que o mesmo está sendo apresentado e assinado em duas vias, todas a folhas rubricadas e que uma das cópias será entregue ao participante da pesquisa ou seu representante legal.

Endereço: Av. Profª Lineu Prestes, 2415

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-000

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7733

Fax: (11)3091-8405

E-mail: cep@icb.usp.br

INSTITUTO DE CIÊNCIAS
BIOMÉDICAS DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 1.200.913

Recomendações:

O TCLE deverá ser readequado para atendimento da Resolução 466/12: 1- inserir contato do CEP; 2- Explicitar, no doc. que o mesmo está sendo apresentado e assinado em duas vias, todas a folhas rubricadas e que uma das cópias será entregue ao participante da pesquisa ou seu representante legal.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências

Considerações Finais a critério do CEP:

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais e final), de acordo com a Resolução nº 466/12, item II, II.19 e II.20, do Conselho Nacional de Saúde.

Em não havendo um biorrepositório e se houver retenção de material deverá ser solicitado o devido cadastro conforme modelo constante site do ICB.

Ao pesquisador cabe também finalizar o processo junto à Plataforma Brasil quando do encerramento deste.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto paciente FH rev DMV final.docx	03/02/2015 11:53:04		Aceito
Folha de Rosto	Folha de rosto assinada.pdf	28/05/2015 09:56:36		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_361136.pdf	28/05/2015 10:06:44		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE - Novo.doc	18/06/2015 17:33:33		Aceito
Outros	Cadastro on-line 12574 assinado.pdf	18/06/2015 17:35:03		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_361136.pdf	18/06/2015 17:35:30		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta CAPPesq inclusão do ICB.pdf	30/07/2015 18:22:38		Aceito
Informações	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_561683	31/07/2015		Aceito

Endereço: Av. Profº Lineu Prestes, 2415
Bairro: Cidade Universitária CEP: 05.508-000
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7733 Fax: (11)3091-8405 E-mail: cep@icb.usp.br

INSTITUTO DE CIÊNCIAS
BIOMÉDICAS DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 1.200.913

Básicas do Projeto	E1.pdf	15:45:53		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_561683_E1.pdf	31/07/2015 15:57:22		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 26 de Agosto de 2015

Assinado por:
Regina Scivoletto
(Coordenador)

Endereço: Av. Profº Lineu Prestes, 2415
Bairro: Cidade Universitária CEP: 05.508-000
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7733 Fax: (11)3091-8405 E-mail: cep@icb.usp.br

Dedico este trabalho ao pequeno Arthur, paciente que me instigou a buscar e entender as respostas não escritas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço sobretudo a Deus. Agradeço aos meus pais e minha família, que me ensinaram que além do amor, tudo resulta de trabalho e persistência. Ao meu esposo, que me encoraja e dá todo o suporte para as empreitadas mais audazes, sempre com amor e valorizando minha realização pessoal. À minha filha, Maria Carolina, um presente lindo, que participou de tudo desde a gestação. À minha orientadora Profa. Lourdes, que me aceitou como aluna, mesmo com toda a complexidade e limitações que um médico tem quando se depara com a ciência básica. Ao paciente ESY, motivo pelo qual este trabalho existiu. Ao José Antônio, que me precedeu com sua Tese inspiradora. A todos os colegas e funcionários, que no laboratório muito contribuíram para meu aprendizado e resultados, especialmente Elena, Paschoalina e Vinícius. Aos meus colegas de trabalho e todas as equipes que diretamente contribuíram para que o meu tempo, o trabalho, os estudos e todos estes resultados fossem possíveis.

AGRADECIMENTOS À AGÊNCIA DE FOMENTO

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro do laboratório. Processos 2010/50043-0 e 2005/09972-0.

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.” (Theodore Roosevelt)

RESUMO

MACEDO ACL. Efeito da curcumina na secreção de Fator H mutante em paciente deficiente desta proteína reguladora do sistema complemento. [Dissertação (Mestrado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

A deficiência homozigota Fator H (FH) é um fenômeno raro. Na ausência dessa proteína, principal co-fator de Fator I (FI), há descontrole na alça de amplificação da Via Alternativa do Sistema Complemento, levando a consumo exagerado de C3 e excessiva produção de C3b, com queda da concentração sérica de C3 e Fator B (FB). A deficiência completa de FI ou FH leva a maior suscetibilidade a infecções por bactérias encapsuladas. Nosso grupo estudou o paciente ESY, de ascendência japonesa e filho de pais consanguíneos primos de primeiro grau, com antecedente de infecções graves e baixa concentração de C3. Ao estudar a concentração sérica de proteínas do Complemento, foi observado níveis normais de FI e properdina, com baixos níveis de FH, FB e C9, sugerindo desregulação da Via Alternativa. O RNAm do FH deste paciente foi sequenciado, sendo encontrada a mutação CG⁴⁵³T→CA⁴⁵³T, responsável pela troca de códon Arg¹²⁷His na molécula de FH. Em estudo prévio, foi demonstrado em cultura de fibroblastos do paciente, que esta mutação causa acúmulo do FH no retículo endoplasmático e retardo na sua secreção. Estas células, quando tratadas com curcumina (utilizada por atuar como chaperona química), apresentaram aumento da secreção do FH mutante, que assim secretado, apresentava função reguladora no Sistema Complemento preservada. A curcumina é um polifenol hidrofóbico derivado do rizoma da planta *Curcuma longa*, com amplo espectro de efeitos descritos: antioxidante, anti-inflamatório, antimicrobiano e anticancerígeno. Contudo, tem baixa biodisponibilidade e metabolismo rápido. Recentemente, nova formulação de curcumina em nanopartículas foi empregada em ensaios clínicos, (Theracurmin®), apresentando melhor absorção e biodisponibilidade. Desta forma, após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa, foi iniciado o protocolo de tratamento da deficiência de FH com Theracurmin®. Em avaliação clínica e laboratorial do paciente antes do início do tratamento, foi diagnosticado lúpus eritematoso sistêmico, com grau de atividade SLEDAI 4/105. Foi realizada avaliação seriada do nível plasmático de curcumina após dose de 2 g de Theracurmin®, seguida de tratamento com 2 g de 12 em 12 h. A mesma avaliação foi feita quando iniciada a dose de 4 g de Theracurmin®. O paciente mostrou boa tolerância a Theracurmin®, sem sintomas adversos ou efeitos colaterais ao longo de 135 dias ininterruptos de tratamento experimental. Como resultado foi possível identificar através de cromatografia líquida de alta resolução acoplada à espectrometria de massas de repetição – LC-MS/MS, níveis variáveis de curcumina e seus metabólitos no soro do paciente ao longo do tratamento, porém esses níveis não repercutiram na concentração de FH avaliados por ELISA e *Western Blot*, nem na concentração de C3 no soro do paciente. O grau de atividade do lúpus se manteve estável ao longo de todo o tratamento. Foram registrados ao longo do tratamento: evolução clínica; respostas ao questionário de qualidade de vida; evolução dos parâmetros de função renal e hepática; determinação dos níveis de auto-anticorpos, concentrações de classes de imunoglobulinas e de interleucinas (IL) do paciente. Onze dias após a interrupção do tratamento com Theracurmin® para a deficiência de FH, foi introduzido hidroxicloroquina, tratamento de escolha para lúpus.

Palavras-chave: Fator H. Imunodeficiência. Tratamento experimental. Curcumina. Chaperona.

ABSTRACT

MACEDO ACL. Effect of curcumin on mutant H-factor secretion in a deficient patient of this complement regulatory system protein. [Masters thesis (Immunology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

Homozygous deficiency Factor H (FH) is a rare phenomenon. In the absence of this protein, the main cofactor of Factor I (FI), the amplification loop of the Complement System Alternative Pathway become uncontrolled, leading to excessive consumption of C3 and excessive production of C3b, with a decrease in serum concentration of C3 and Factor B (FB). Complete IF or FH deficiency leads to increased susceptibility to infections by encapsulated bacteria. Our group studied the ESY patient, of Japanese ancestry and son of consanguineous parents (first degree cousins), with a history of severe infections and low concentration of C3. When studying the serum concentration of Complement proteins, normal levels of IF and properdin were observed, with low levels of FH, FB and C9, suggesting deregulation of the Alternative Pathway. The FH mRNA of this patient was sequenced, and the mutation CG⁴⁵³T → CA⁴⁵³T was found, responsible for the exchange of the Arg¹²⁷His codon in the FH molecule. In a previous study, it was demonstrated in the patient's fibroblast culture that this mutation causes accumulation of HF in the endoplasmic reticulum and delayed its secretion. These cells, when treated with curcumin (used to act as chemical chaperone), presented increased secretion of mutant FH, which once transported, had his preserved regulatory function in the Complement System. Curcumin is a hydrophobic polyphenol derived from the rhizome of the *Curcuma longa* plant, with a broad spectrum of effects described: antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial and anticancer. However, it has low bioavailability and rapid metabolism. Recently, new formulation of curcumin in nanoparticles was used in clinical trials (Theracurmin®), presenting better absorption and bioavailability. Thus, after approval of the Research Ethics Committee, the protocol for the treatment of FH deficiency with Theracurmin® was started. In clinical and laboratory evaluation of the patient before the beginning of the treatment, systemic lupus erythematosus was diagnosed, with index of activity SLEDAI 4/105. Serum plasma level of curcumin was assessed after a dose of 2 g of Theracurmin®, followed by treatment with 2 g every 12 hours. The same assessment was made when initiating the dose of 4 g of Theracurmin®. The patient showed good tolerance to Theracurmin®, without adverse symptoms or side effects in 135 days of uninterrupted experimental treatment. In the results it was possible to identify, through high performance liquid chromatography coupled to repetitive mass spectrometry - LC-MS / MS, variable levels of curcumin and their metabolites in the patient's serum throughout the treatment, but these levels did not affect the FH evaluated by ELISA and Western Blot nor the concentration of C3 in the patient's serum. The degree of lupus activity remained stable throughout the treatment. The following were also recorded during the treatment: clinical evolution; answers to the quality of life questionnaire; evolution of renal and hepatic function parameters; determination of autoantibody levels, immunoglobulin and interleukin class (IL) concentrations of the patient. Eleven days after stopping the experimental treatment with Theracurmin® for FH deficiency, treatment of lupus (hydroxychloroquine) was introduced.

Keywords: Factor H. Immunodeficiency. Experimental treatment. Curcumin. Chaperone.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ativação do Sistema Complemento	211
Figura 2 - Principais proteínas reguladoras do Sistema Complemento.....	255
Figura 3 - Regulação da alça de amplificação da Via Alternativa pelo FH.	277
Figura 4 - Representação esquemática de FH, FHL-1 e FHRs.....	299
Figura 5 - <i>Hotspots</i> de mutações no gene <i>FH</i>	333
Figura 6 - <i>Curcuma longa</i> , seu rizoma e o pó produzido a partir dele	388
Figura 7 - Redução e conjugação da curcumina.	399
Figura 8 - Alvos moleculares da curcumina e tetrahidrocurcumina.	411
Figura 9 - Delineamento experimental deste trabalho.	511
Figura 10 - Avaliação da qualidade de vida: PedsQL paciente.	76
Figura 11 - Avaliação da qualidade de vida: PedsQL genitor.....	76
Figura 12 - Níveis plasmáticos de curcumina após ingestão de 2 g e 4 g de Theracurmin®.....	77
Figura 13 - Níveis plasmáticos de curcumina, e de curcumina e tetrahidrocurcumina tratadas com glicorunidade, após ingestão de 2g de Theracurmin®.....	78
Figura 14 - Níveis plasmáticos de curcumina, e de curcumina e tetrahidrocurcumina tratadas com glicorunidade, após ingestão de 4g de Theracurmin®.....	79
Figura 15 - Níveis plasmáticos somados de curcumina, e de curcumina e tetrahidrocurcumina tratadas com glicorunidade, após ingestão de 2 g e 4 g de Theracurmin®.....	79
Figura 16 - Quantificação de FH após ingestão de 2 g e 4 g de Theracurmin®.....	80
Figura 17 - Quantificação de FB após ingestão de 2 g e 4 g de Theracurmin®.....	81
Figura 18 - Análise da presença de FH no soro do paciente por <i>Western Blot</i> , em coleta seriada realizada após ingestão de 2 g e ao longo do tratamento com Theracurmin®.....	83
Figura 19 - Análise da presença de FH no soro do paciente por <i>Western Blot</i> , em coleta seriada realizada após ingestão de 4 g e ao longo do tratamento com Theracurmin®.....	84
Figura 20 - Concentrações séricas de IL-1 β após ingestão de Theracurmin®.....	86
Figura 21 - Concentrações séricas de IL-6 após ingestão de Theracurmin®.....	87
Figura 22 - Concentrações séricas de IL-8 após ingestão de Theracurmin®.....	87
Figura 23 - Concentrações séricas de IL-10 após ingestão de Theracurmin®.....	88
Figura 24 - Concentrações séricas de IL-12p70 após ingestão de Theracurmin®...88	
Figura 25 - Concentrações séricas de TNF-alfa após ingestão de Theracurmin®...89	

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Reguladores do Sistema Complemento.....	26
Tabela 2 - Distribuição das causas genéticas ou adquiridas identificadas na SHUa.....	34
Tabela 3 - Atividade hemolítica mediada pelo Sistema Complemento e dosagens de proteínas do Complemento no paciente e em seus familiares.....	43
Tabela 4 - Auto-anticorpos encontrados no paciente.....	44
Tabela 5 - Linha do tempo de execução do protocolo.....	54
Tabela 6 - Eletrólitos e gasometria.....	65
Tabela 7 - Concentração de proteína C-reativa no soro.....	66
Tabela 8 - Hemograma e plaquetas.....	66
Tabela 9 - Função hepática e perfil lipídico.....	67
Tabela 10 - Concentrações séricas de proteínas totais, albumina e gamaglobulina.....	68
Tabela 11 - Dosagens das classes de imunoglobulina IgE, IgA, IgM e IgG.....	68
Tabela 12 - Avaliação de IgE específica para barata, poeira, <i>Dermatophagoides farinae</i> e <i>Blomia tropicalis</i>	69
Tabela 13 - Concentrações séricas dos componentes C1q, C2, C3 e C4.....	70
Tabela 14 - Avaliação dos auto-anticorpos.....	71
Tabela 15 - Avaliação da função renal.....	72
Tabela 16 - Biópsia de pele analisada por microscopia óptica e imunofluorescência, pré- e pós-tratamento.....	73
Tabela 17 - Dosagens das citocinas no tratamento com Theracurmin®.....	85

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 Sistema Complemento	20
1.1.1 Via Alternativa	22
1.1.2 Via Clássica	23
1.1.3 Via das Lectinas	23
1.1.4 A Via Terminal comum e a formação do MAC	23
1.1.5 Regulação da ativação do Sistema Complemento	24
1.2 FH	27
1.2.1 Proteínas relacionadas ao FH e seus domínios funcionais	29
1.2.2 Doenças relacionadas a mutações nos genes <i>FH</i> e <i>FHRs</i>	31
1.2.2.1 <i>SHUa</i>	32
1.2.2.2 <i>DMRI</i>	34
1.2.2.3 <i>Glomerulopatia C3</i>	35
1.2.3 Deficiência do FH	37
1.3 Curcumina	38
1.4 O paciente estudado e os diagnósticos de deficiência do FH e lúpus eritematoso sistêmico (LES)	42
1.4.1 A deficiência de FH e a mutação Arg ¹²⁷ His do paciente	45
1.4.2 Efeito chaperona e a ação da curcumina em cultura de fibroblastos do paciente	45
1.5 LES e deficiência de proteínas do Sistema Complemento	47
1.6 Justificativa	48
2 HIPÓTESE E OBJETIVOS DO TRABALHO	50
2.1 Hipótese	50
2.2 Objetivo geral	50
2.3 Objetivos específicos	50
3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	51
4 MATERIAL E MÉTODOS	52
4.1 Avaliação do paciente	52
4.1.1 Pré-tratamento	52
4.1.2 Avaliação da primeira dose	53
4.1.3 Manutenção	53
4.1.4 Avaliação do aumento de dose	53
4.1.5 Aumento da dose e manutenção	53
4.1.6 Interrupção do tratamento	53
4.2 Microscopia óptica e Imunofluorescência	55
4.3 Avaliação de qualidade de vida	55
4.4 Avaliação da concentração plasmática de curcumina, curcumina e tetrahidrocurcumina glicorunidade	55
4.5 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	56
4.6 Western Blot	57
4.7 Quantificação da concentração sérica de interleucinas	58
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO:	59
5.1 Avaliação global do efeito do tratamento no paciente	59
5.1.1 Avaliação laboratorial	59
5.1.2 Biópsia de pele pré- e pós-tratamento:	63
5.1.3 Avaliação cardiovascular	734

5.1.4 Avaliação articular	74
5.1.5 Avaliação oftalmológica.....	74
5.1.6 Avaliação pelo <i>Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index</i> (SLEDAI) e o tratamento experimental.....	75
5.1.7 Avaliação da Qualidade de Vida com o tratamento experimental	75
5.2 Determinação da concentração plasmática da curcumina, curcumina e tetrahidrocurcumina glicorunidade.	77
5.3 Determinação das concentrações séricas de FH, FB e C3.....	80
5.3.1 FH	80
5.3.2 FB.....	81
5.3.3 Concentração sérica de C3.....	82
5.4 Avaliação da secreção de FH por <i>Western Blot</i>.....	82
5.5 Avaliação do perfil de citocinas durante o tratamento experimental	85
6 CONCLUSÕES	91
REFERÊNCIA*	92
ANEXOS	111
A - Critérios “American College of Rheumatology” para a classificação de LES.....	111
B - Critérios SLICC para diagnóstico de LES.....	112
C - Índice de atividade da doença LES 2000 (SLEDAI-2K)	114
D - PedsQLTM4.0 Relato do adolescente (13-18 anos)	115
E - PedsQLTM4.0 Relato dos pais sobre o adolescente (13-18 anos).....	117

1 INTRODUÇÃO

1.1 Sistema Complemento

O Sistema Complemento, formado por mais de 40 proteínas presentes em forma solúvel ou na superfície das membranas celulares, é reconhecido por seu papel central na defesa contra infecções na imunidade inata e adquirida. Este sistema pode sofrer ativação sequencial pelas vias: Alternativa, Clássica e das Lectinas. As três vias convergem para uma via de ativação terminal comum, com geração do Complexo de Ataque à Membrana (MAC) (**Figura1**). Durante a ativação dessas vias, são produzidas opsoninas e anafilatoxinas fundamentais para a integridade do sistema imune. A Via Alternativa é permanentemente ativada pela hidrólise espontânea de C3 gerando a molécula bioativa ($C3H_2O$), permitindo pronta reação a microrganismos invasores. Pelo reconhecimento dos *Danger-associated molecular patterns* (DAMPs) na superfície de agentes patogênicos, C1q, lectinas ligadoras de manose (MBL) e ficolinas, podem ativar as Vias Clássica e das Lectinas respectivamente. (Ricklin et al., 2010; Merle et al., 2015a; Merle et al., 2015b). Entre as principais opsoninas geradas, estão os fragmentos C3b e iC3b, que tanto se ligam covalentemente à superfície de patógenos como a receptores do Complemento (CR) CR1 e CR3 presentes nos fagócitos, facilitando a destruição de patógenos e posterior apresentação de peptídeos antigênicos aos linfócitos T (Merle et al., 2015b). O fragmento C3d interage com o receptor CR2 presente na superfície do linfócito B e ativa esta célula aumentando a produção de anticorpos específicos (Dempsey et al., 1996). Os antígenos ligados a C3d também se ligam às células foliculares dendríticas, que os mantêm retidos por longos períodos nos centros germinativos dos órgãos linfoides, onde são disponibilizados aos linfócitos B para seleção de linfócitos de alta afinidade (Fang et al., 1998). Os fragmentos C3b e C4b também podem se ligar de forma covalente a imunocomplexos e ao se ligarem ao receptor CR1 nos eritrócitos, facilitam a remoção desses imunocomplexos no fígado e baço para clareamento desses complexos na circulação (Ross et al., 1985). O componente C1q liga-se a corpúsculos apoptóticos e, juntamente com os fragmentos C4b e C3b, facilita a fagocitose de células apoptóticas e restos celulares, contribuindo para o controle da autoimunidade (Korb et al., 1997; Navratil et al., 1999; Taylor et al., 2000). As anafilatoxinas C3a e C5a podem se ligar ao receptor

C3aR (no caso de C3a), C5aR1 e C5aR2 (no caso de C5a) desgranulando basófilos e mastócitos, levando à produção e liberação de mediadores inflamatórios, e também podem recrutar leucócitos para o sítio de inflamação (Osler et al., 1959; da Silva et al., 1967; Coulthard et al., 2015). A adequada ativação do Sistema Complemento é necessária para proteção contra agentes infecciosos, sendo estritamente controlada para evitar o consumo excessivo dos fatores do Complemento bem como o dano tecidual no hospedeiro.

Figura 1 - Ativação do Sistema Complemento.

Ativação do Sistema Complemento: A Via Clássica é iniciada geralmente pela ligação de C1q ao complexo antígeno-anticorpo, formando posteriormente a C3-convertase C4b2a. A Via da Lectinas é ativada pela interação de lectinas ligadoras de manose (MBL) e Ficolinas com os carboidratos e moléculas acetiladas presentes na superfície dos microrganismos, também formando a C3-convertase C4b2a. A Via Alternativa pode ser iniciada por hidrólise espontânea de C3 e posterior ligação ao FB, que clivado pelo FD, forma a C3-convertase inicial C3(H₂O)Bb. Uma vez formada a

C3-convertase por qualquer uma dessas vias, o componente C3 pode ser clivado em C3a e C3b. O C3b serve então de substrato para formação de nova C3-convertase, que estabilizada pela properdina, funciona como uma alça de amplificação. O C3b também pode se associar às convertases previamente formadas, para formar a C5-convertase, que cliva C5 nos fragmentos C5a e C5b. Outros componentes (C6 a C9) participarão para formar o MAC (C5b6789_n). Fonte: Leshner e Song, 2010.

1.1.1 Via Alternativa

A Via Alternativa é a principal via de ativação do Complemento e é iniciada por meio de hidrólise espontânea da ligação tiol-éster intramolecular localizada na cadeia alfa de C3 nativo. Este mecanismo de hidrólise espontânea está em ativação contínua, conferindo a capacidade de amplificação rápida desse sistema na eventual presença de patógenos, o que é essencial para uma defesa eficiente. Uma vez hidrolisada tal ligação, a conformação estrutural de C3 é modificada gerando C3(H₂O), exibindo sítios para ligação do Fator B (FB) anteriormente indisponíveis na molécula nativa de C3, permitindo a formação do complexo C3(H₂O)B. O Fator D (FD) cliva FB, gerando C3(H₂O)Bb e liberando o fragmento Ba. Este complexo (C3H₂O)Bb é conhecido por C3-convertase inicial e tem capacidade de clivar C3 em fragmentos C3a e C3b. Já o C3b tem uma conformação semelhante ao C3(H₂O) e, por conseguinte, também se liga ao FB (Tack et al., 1980; Isenman et al., 1981; Pangburn et al., 1981; Isenman et al., 1982; Pangburn et al., 1983). O complexo formado C3bB sofre clivagem pelo FD, gerando C3bBb (segunda C3-convertase), liberando o fragmento Ba na fase fluida. A properdina é uma proteína reguladora positiva que promove a estabilidade da C3-convertase desta via (Fearon et al., 1975; Fearon et al., 1979; Lepow, 1980; Müller-Eberhard, Schreiber, 1980; Pangburn et al., 1983; Pangburn, Müller-Eberhard, 1984). Esta enzima C3bBb é naturalmente lábil pela dissociação espontânea de Bb do fragmento C3b, com uma meia-vida de cerca de 90 segundos a 37,8 °C na ausência de properdina. Porém, após a ligação deste regulador, a C3-convertase é estabilizada e estende a sua meia-vida em cerca de 10 vezes (Harris et al., 2012). Este mecanismo onde a C3-convertase cliva moléculas de C3 gerando novo fragmento C3b para “alimentar” a formação de novas convertases, cria um mecanismo de retroalimentação positiva de alça de amplificação da ativação do sistema Complemento, potencializando sua atividade. No entanto, esta alça de amplificação precisa ser bem regulada para evitar consumo exagerado de seus componentes.

1.1.2 Via Clássica

A Via Clássica é ativada principalmente na presença de imunocomplexos formados por anticorpos IgM ou IgG. Uma vez formado o imunocomplexo, a proteína C1q se liga às imunoglobulinas e imediatamente ativa C1r que, por sua vez, ativa em sequência C1s. Agora, C1s ativado cliva C4 em C4a e C4b (liberando C4a). O componente C2 liga-se a C4b e é clivado por C1s ativado, gerando C4b2a (a C3-convertase da Via Clássica) que, à mesma maneira das C3-convertases da Via Alternativa, tem função de clivar C3 nos fragmentos C3a e C3b (Walport, 2001; Ricklin et al., 2010).

1.1.3 Via das Lectinas

A Via das Lectinas é iniciada mesmo na ausência de anticorpos, por lectinas ligadoras de manose (MBL) ou ficolinas (ficolina-1, ficolina-2 e ficolina-3). Elas se ligam a carboidratos e moléculas acetiladas presentes na superfície de microrganismos e são estruturalmente semelhantes ao componente C1q da Via Clássica. As MBL e ficolinas podem ser encontradas complexadas com enzimas conhecidas por serino-proteases associadas à MBL (MASP) MASP 1 e MASP 2 (que são estruturalmente semelhantes a C1r e C1s). MASP1 cliva C2 e MASP2 cliva C4 e C2 para formar C4b2a (que a exemplo da C3-convertase da Via Clássica, exerce o mesmo papel das C3-convertases da Via Alternativa) (Thiel et al., 1997; Matsushita et al., 2000; Chen, Wallis, 2004; Fujita et al., 2004; Dobó et al., 2009). A MASP3 está presente nesse complexo e pode interagir com MBL e ficolinas exercendo um papel regulador na Via das Lectinas (Dahl et al., 2001; Matsushita et al., 2002; Zundel et al., 2004; Skjoedt et al., 2010) e atua também como ativadora de FD, estabelecendo uma ação indireta da Via das Lectinas na regulação da Via Alternativa (Dobó et al., 2016).

1.1.4 A Via Terminal comum e a formação do MAC

Todas as vias de ativação descritas convergem para a formação de C3-convertases com a consequente clivagem de C3. Os fragmentos C3b gerados a partir da clivagem de C3 podem se ligar a várias moléculas aceptoras incluindo a própria C3-convertase (C3bBbC3b_n ou C4b2aC3b_n) gerando assim a C5-convertase. A C5-convertase cliva C5 em C5a e C5b, onde o fragmento C5a é liberado e atua como potente anafilatoxina e fator quimiotático de células inflamatórias. O fragmento C5b

se liga ao próximo componente da cascata C6 (gerando C5b6) que permite a incorporação de C7 para formar C5b67. Este complexo liga-se firmemente à membrana da célula, seguido por ligação sucessiva de C8 a C7 para gerar C5b678. Este complexo tem atividade lítica, que é potencializada quando várias moléculas C9 são incorporadas para formar o MAC (C5b6789_n) (Mayer, 1972; Whaley, Lemercier, 1993; Morgan, 1999; Walport, 2001). O MAC tem uma estrutura anelar com um diâmetro interno de 5 nm (Podack, Tschopp, 1982; Whitlow et al., 1985). A montagem deste complexo na superfície da membrana forma um poro que causa um desbalanço osmótico e finalmente pode provocar a lise da célula.

1.1.5 Regulação da ativação do Sistema Complemento

A ativação do Sistema Complemento ocorre de forma contínua em baixo grau, mas, uma vez iniciada, a cascata proteolítica pode ser rapidamente amplificada e mesmo danosa se não controlada devidamente, com excessivo consumo de C3 e outros componentes, e exagerada ativação da resposta inflamatória. A regulação do Sistema Complemento é de extrema importância para preservar a ação lítica sobre o microrganismo invasor, mas evitando que haja dano para as células e órgãos do hospedeiro.

O Sistema Complemento é regulado por várias proteínas plasmáticas ou associadas à membrana celular (Kim, Song, 2006). Os principais reguladores plasmáticos do Sistema Complemento são: Inibidor de C1 (*C1 inhibitor* – C1-INH), Fator H (FH), Proteínas Relacionada ao FH (*Factor H related proteins* – FHRs), Fator I (FI), *C4 binding protein* (C4BP), Vitronectina e Clusterina (**Figura 2**). As principais proteínas de membrana com atividade reguladora do Sistema Complemento são: proteína de membrana com atividade de co-fator (*membrane cofactor protein* - MCP, CD46), fator acelerador de decaimento (*decay accelerating factor* – DAF, CD55) e CD59 (Ricklin et al., 2010; Merle et al., 2015a). Mutações nesses reguladores ou auto-anticorpos adquiridos contra eles afetam determinados pontos das vias de ativação do Sistema Complemento, ocasionando distintas doenças devastadoras para o hospedeiro (**Tabela1**) (Ricklin et al., 2010; Wagner, Frank, 2010)

Figura 2 - Principais proteínas reguladoras do Sistema Complemento.

Principais proteínas reguladoras do Sistema Complemento. Destacadas Inibidor de C1 (C1-INH), FH, FI, e *C4 binding protein* (C4BP) proteína de membrana com atividade de co-fator (*membrane cofactor protein* - MCP, CD46), fator acelerador de decaimento (*decay accelerating factor* – DAF, CD55), CD59, carboxipeptidase N (CPN), Receptor do complemento 1 (CR1), Clusterina e Vitronectina. Fonte: site Humpath.com - Human pathology.

Tabela 1 - Reguladores do Sistema Complemento.

Reguladores solúveis	Via	Ação	Doenças relacionadas
C1-INH	VC, VL	Inibe C1r, C1s e MASPs	Angiodema hereditário
C4BP	VC, VL	Dcaimento de C4b2a, cofator para FI	
FH	VA	Dcaimento de C3-convertase, cofator para FI	Infecção, SHUa, DMRI, GC3
FI	VC, VL, VA	Cliva C3b e C4b, na presença dos cofatores	Infecção, SHUa
Vitronectina	VTC	Liga-se a C5b-9 e previne a formação do MAC	
Clusterina	VTC	Liga-se a C7-C9 e previne a formação do MAC	
Reguladores de membrana	Via	Ação	Doenças relacionadas
MCP	VC, VL, VA	Cofator para FI na clivagem de C3b e C4b, contribui para o decaimento da C3-convertase	SHUa e DMRI
DAF	VC, VL, VA	Acelera decaimento das C3-convertases	HPN
CD59	VTC	Impede a ligação de C9 e a formação do MAC	HPN

Reguladores do Sistema Complemento à esquerda, com via de ativação envolvida e principal ação relacionada. Na coluna à direita exemplos de doença ocasionadas pela presença de mutações ou de auto-anticorpos formados contra proteínas reguladoras. Abreviações: VC (Via Clássica), VL (Via das Lectinas), VA (Via Alternativa), VTC (Via Terminal Comum), SHUa (síndrome hemolítico-urêmica atípica), DMRI (doença macular relacionada à idade), GC3 (glomerulopatia C3), HPN (hemoglobinúria paroxística noturna), MAC (complexo de ataque à membrana).

1.2 FH

O FH foi descrito pela primeira vez em 1965, com o nome de Beta 1-H Globulina, então uma proteína de função desconhecida encontrada nas preparações de C3. Somente em 1976, foi descrito seu papel como fator de aceleração do decaimento da C3-convertase e como co-fator de FI (Zipfel, Skerka, 1994). Sem a regulação do FH e FI, a alça de amplificação da Via Alternativa acaba por consumir praticamente todo o C3 disponível. Essa situação é controlada pela ligação do FH ao C3b (competindo com FB), e também pela clivagem de C3b pelo FI (onde o FH atua como co-fator do FI) para formar iC3b, interrompendo assim a alça de amplificação (Carreno et al., 1989) (**Figura 3**).

Figura 3 - Regulação da alça de amplificação da Via Alternativa pelo FH.

Regulação da alça de amplificação da Via Alternativa pelo FH: (A) alça de amplificação da Via Alternativa sem seus reguladores. (B) FH atuando como cofator de FI, clivando C3b em iC3b, e também competindo com o FB pela ligação no C3b, interrompendo assim a alça de amplificação da Via Alternativa.

Na ausência de FH, há consumo desregulado de C3 e FB, gerando grandes quantidades do fragmento C3b. O FH está presente no plasma de indivíduos adultos saudáveis na concentração de $443 \mu\text{g/mL} \pm 106 \mu\text{g/mL}$ (de Paula, 2003).

O FH é uma glicoproteína de cadeia simples (Sim, DiScipio, 1982; Ripoché et al 1988). Sua forma glicosilada tem peso molecular de aproximadamente 155 kDa, enquanto sua forma não glicosilada tem 139 kDa (Pouw et al., 2015). É constituído por uma sequência de vinte domínios globulares (chamados *Complement Control*

Protein domain - CCP ou *Short Consensus Repeat* - SCR), cada um com cerca de 60 aminoácidos arranjados em seis a oito filamentos beta, numerados $\beta 1$ a $\beta 8$ (Saunders et al., 2007), sendo cada CCP dependente de quatro cisteínas (Cys) (Aslam, Perkins, 2001). Os quatro resíduos Cys formam pontes entre as Cys1-Cys3 e Cys2-Cys4, com Cys2 no filamento $\beta 2$ e Cys3 no filamento $\beta 6$, sendo essas duas pontes cruciais para a integridade do domínio CCP (Rodriguez et al., 2014). A região compreendida pelos CCP 1-4 na região N-terminal é indispensável para a função do FH de co-fator do FI no decaimento da atividade da C3-convertase (Gordon et al., 1995; Kühn et al., 1995). Essa região se liga preferencialmente ao C3b, enquanto o CCP 19-20 na região C-terminal se liga tanto ao C3b, como ao iC3b e C3d (Jokiranta et al., 2000; Jokiranta et al., 2005; Józsi et al., 2007). As regiões correspondentes aos CCPs 6-8 e CCP 20 são importantes para a ligação de resíduos poliânions (como os glicosaminoglicanos, sulfato de heparana e ácido siálico na superfície de células autólogas), permitindo a regulação do Complemento pelo FH junto à superfície celular de células do hospedeiro (Blackmore et al., 1996; Blackmore et al., 1998; Józsi et al., 2007; Prosser et al., 2007). A regulação do FH sobre a membrana de células autólogas dá-se pela ligação dos CCPs 1-4 e CCPs 19-20 aos fragmentos C3b depositados, enquanto os domínios CCPs 6-8 e CCP 20 contribuem para a interação direta com poliânions expressos na superfície das células (Pouw et al., 2015) (**Figura 4**).

O gene *FH* está localizado no cromossomo humano 1q32, em uma região relacionada à regulação do Complemento (*regulation of complement activation* - RCA) que também contém os genes codificantes das cinco Proteínas Relacionadas ao FH (FHRs 1-5) e de outras proteínas reguladoras do Complemento como DAF, MCP e C4BP (Hourcade et al., 1989; Józsi, Zipfel, 2008). O gene *FH* codifica também o FH-Like 1 (FHL-1), por *splicing* alternativo. O FHL-1 possui 49 kDa e compartilha os mesmos primeiros sete CCPs do FH, seguidos por uma sequência única de quatro aminoácidos SFTL: Ser, Phe, Thr e Leu (Ripoche et al., 1988). O FHL-1 também atua como regulador do Complemento como co-fator para FI, acelerando o decaimento da C3-convertase da Via Alternativa (Ricklin et al 2010).

Figura 4 - Representação esquemática de FH, FHL-1 e FHRs.

Representação esquemática de FH, FHL-1 e FHRs com seus domínios CCP: região de regulação e ligação com C3b (CCP 1-4), região ligadora de resíduos poliânions (CCP 6-8 e CCP 19-20). SFTL: sequência terminal de aminoácidos (Ser, Phe, Thr e Leu). Setas pretas indicam os locais de regiões confirmadas de glicosilação. Seta cinza indica região provável de glicosilação e seta branca, região pouco provável de glicosilação. Os números acima de cada CCP indicam a porcentagem de homologia entre FHRs e o FH. Fontes: Skerka et al (2013), Pouw et al (2015).

1.2.1 Proteínas relacionadas ao FH e seus domínios funcionais

Os genes que codificam as proteínas da família do FH (FHR-1, FHR-2, FHR-3, FHR-4, FHR-5 e FH) estão localizados em um segmento distinto do cromossoma humano 1q32, dentro do “cluster” gênico RCA (Díaz-Guillén et al, 1999; Male et al., 2000) e codificam proteínas compostas também por domínios CCPs. A região reguladora CCP 1-4 do FH (presente também no FHL-1) não é conservada nas proteínas FHR, mas as proteínas FHR abrigam regiões que apresentam homologia em graus variados com certos domínios CCP do FH (**Figura 4**). A região N-terminal das proteínas FHR conserva elevada homologia com os CCPs 6-9, e a região C-terminal das proteínas FHR conservam homologia com a região C-terminal CCP 18-20 do FH. As proteínas FHR-1, FHR-2, FHR-5 são capazes de formar homodímeros por

meio dos seus dois domínios CCP N-terminais. As proteínas FHR-3 e FHR-4, não expressam o motivo de dimerização na extremidade N-terminal (Skerka et al., 2013).

- FHR-1 – Esta proteína atua como reguladora da C5-convertase inibindo a clivagem de C5 (Ricklin et al., 2010). Como sua atividade é mediada ainda é incerto. Também é descrita sua função como reguladora da Via Terminal, inibindo a montagem do MAC (Heinen et al., 2009). O FHR-1 ainda pode competir com o FH pela ligação ao C3b, provavelmente mediada pela sua porção C-terminal (Goicoechea et al., 2013). A FHR-1 pode ser encontrada em duas formas glicosiladas distintas, FHR-1 alfa e FHR-1 beta, com pesos moleculares de 37 e 42 kDa, respectivamente (Timmann et al., 1991)
- FHR-2 – A atividade de regulação do Complemento por esta proteína ocorre pela inibição da atividade da C3-convertase, inibindo a alça de amplificação da Via Alternativa (Eberhardt et al., 2011), porém o FHR-2 em concentrações fisiológicas não compete com FH para a ligação a C3b (Goicoechea et al., 2013). A FHR-2 pode ser encontrada em duas formas distintas, uma não glicosilada com 24 kDa e outra glicosilada FHR-2 alfa com 29 kDa (Skerka et al., 1992).
- FHR-3 – Esta proteína liga-se a C3b, C3d e heparina, mas seu papel exato na ativação do Complemento ainda é incerto (Hellwage et al., 1999). O FHR-3, como o FHR-1, também pode competir pela ligação de C3b com o FH (Fritsche et al., 2010). A FHR-3 pode ser encontrada em quatro formas glicosiladas distintas, com pesos moleculares de 35 a 56 kDa (Skerka et al., 2013)
- FHR-4 – O papel de FHR-4 ainda é incerto sobre a regulação do Complemento. Esta proteína liga-se a C3b, sendo referida uma atividade moduladora na forma de co-fator do FH, potencializando sua atividade (Hellwage et al., 1999). A FHR pode ser encontrada em duas formas proteicas distintas por splicing alternativo, sendo FHR-4A com 86 kDa e FHR-4B com 42 kDa (Józsi et al., 2005).
- FHR-5 – Esta proteína se liga a heparina e C3b (assim como FH), e é capaz de reconhecer e ligar-se a C3b na superfície das células (McRae et al., 2005). O FHR-5 compete pela ligação a C3b com o FH e pode ligar-se ao iC3b

(Goicoechea et al., 2013). Seu peso molecular é da ordem de 65kD (McRae et al., 2005).

1.2.2 Doenças relacionadas a mutações nos genes *FH* e *FHRs*

Vários estudos demonstram que mutações nestes genes estão associadas ao desenvolvimento de síndrome hemolítico-urêmica atípica (SHUa), degeneração da mácula relacionada à idade (DMRI), glomerulopatia C3, e infecções bacterianas recorrentes (Reis et al., 2006; Córdoba, Jorge, 2008; Leshner, Song, 2010; Skerka et al., 2013; Zipfel et al., 2015). Os domínios CCP 19-20 e CCP 15-18 são considerados *hotspots* de mutação, pois são encontradas mutações com maior frequência que nos CCP 1-4 e 6-8 (Rodriguez et al., 2014) (**Figura 5**). As mutações podem ser classificadas em tipo I, quando a concentração da proteína plasmática é baixa em decorrência de um defeito secretório ou de rápida degradação, ou mutação tipo II, com níveis plasmáticos normais, porém acompanhada por um defeito funcional na atividade da proteína (Rodriguez et al., 2014). Disso resulta que em alguns casos o FH chega a ser produzido, mas existe um defeito de processamento com retenção da proteína no retículo endoplasmático ou eliminação defeituosa (Schmidt et al., 1999; Józsi et al., 2006) da proteína. Em outros casos pode ocorrer a eliminação da proteína em quantidades normais, porém com função reguladora prejudicada. Em conclusão, a concentração normal do FH no soro não afasta necessariamente um defeito funcional da sua atividade reguladora ou a presença de auto-anticorpos formados contra ele (Zipfel et al., 2015).

Atualmente, mais de 193 mutações distintas no FH foram descritas na forma esporádica ou familiar (<http://www.FH-HUS.org>), sendo os casos reportados distribuídos em:

- Mutações tipo I: 20
- Mutações tipo II: 25
- Mutações com fenótipo desconhecido: 89
- Mutações “missense”: 119
- Mutações “nonsense”: 21
- Outras mutações: 53

No caso de mutações encontradas nos demais genes que codificam as proteínas FHR 1-5, também são várias as mutações descritas e elas podem se associar com doenças renais e SHUa, à semelhança das mutações no FH.

1.2.2.1 SHUa

A síndrome hemolítico-urêmica é uma doença caracterizada por anemia microangiopática não imune, trombocitopenia e alteração da função renal, podendo acometer também outros órgãos como coração, intestino, pâncreas, pulmões e especialmente o cérebro. Na sua forma típica, a doença é causada por infecção entérica por bactérias produtoras de shigatoxina (Ruggenti et al., 2001). Por outro lado, a SHUa (atípica) é uma doença rara, com incidência anual aproximada de 2/1.000.000 para adultos e 3,3/1.000.000 em indivíduos menores de 18 anos (Constantinescu et al., 2004; Ohanian et al., 2011; Sellier-Leclerc et al., 2007). No caso da SHUa, embora a tríade diagnóstica (anemia microangiopática, trombocitopenia e alteração da função renal) seja a mesma, a doença tem caráter crônico e mau prognóstico, culminando em óbito ou insuficiência renal crônica se não for adequadamente tratada (Noris et al., 2010). A SHUa é causada por hiperativação da Via Alternativa do Complemento, secundária a um evento desencadeante como episódios de infecção ou gestação, por exemplo. Cerca de 60% dos pacientes com SHUa apresentam anormalidades genéticas ou adquiridas nas proteínas relacionadas à Via Alternativa do Complemento. O primeiro caso de mutação no gene *FH* em SHUa foi descrito em 1998 (Warwicker et al., 1998). Certas mutações do FH representam a anormalidade genética mais frequente (20 a 30% dos casos) em pacientes com SHUa, somados ainda cerca de mais 10% onde a anormalidade encontrada é a formação de auto-anticorpos contra o FH (Mele et al., 2014) (**Tabela 2**).

Figura 5 - Hotspots de mutações no gene *FH*.

Figura 5 – Mutações no gene *FH* relacionadas a doenças, com maior concentração de mutações nos domínios CCPs 15-18 e 19-20. Fonte: Rodriguez et al. 2014.

Tabela 2 - Distribuição das causas genéticas ou adquiridas identificadas na SHUa.

Anormalidades genéticas ou adquiridas	Frequência %
Mutação <i>FH</i>	20 a 30
Genes híbridos <i>FH/FHR</i>	3 a 5
Auto-anticorpo anti-FH	5 a 10
Mutação em <i>MCP</i>	10 a 15
Mutação no <i>FI</i>	4 a 10
Mutação em <i>C3</i>	2 a 10
Mutação no <i>FB</i>	1 a 4
Mutação no <i>THBD</i>	3 a 4
Mutações combinadas de genes do Complemento	3 a 4
Mutação no <i>DGKE</i>	Raro

Distribuição das causas genéticas identificadas de SHUa relacionadas a cada gene, com predominância de mutações e auto-anticorpos relacionados ao FH. As mutações nos genes *THBD* (trombomodulina) e *DGKE* (diacylglycerol kinase épsilon) representam causas mais raras de SHUa, não relacionadas diretamente à atividade do Sistema Complemento. Fonte: Mele et al. 2014.

1.2.2.2 DMRI

A DMRI é uma das causas mais frequentes de perda da visão e cegueira adquirida nos países desenvolvidos. Certos fatores genéticos podem aumentar em até mais de 50% de risco para DMRI. Fatores não genéticos como envelhecimento e tabagismo também podem contribuir para o desenvolvimento e progressão da doença (Horie-Inoue, Inoue, 2014). A DMRI afeta a retina e seus fotorreceptores, levando à perda da visão central. Nas fases iniciais da doença, os depósitos (drusas) se formam entre o epitélio pigmentado da retina e a membrana de Bruch. Quando a doença progride, forma-se a atrofia geográfica, também referida como “DMRI seca”. Pela ação do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) quando secretado, novos vasos crescem para dentro destas regiões e a neovascularização aberrante coroidal resulta na chamada “DMRI úmida” (Jong, 2006; Swaroop et al., 2007; Sivakumaran et al., 2011; Miller, 2013). Estudos sobre a composição de drusas têm implicado a inflamação, especificamente a ativação local do Complemento pela Via Alternativa, na patogênese da DMRI (Hageman et al., 2001). Níveis plasmáticos mais elevados dos fragmentos Bb e C5a foram observados em pacientes com DMRI avançada em comparação com indivíduos controle, confirmando a ativação contínua da Via Alternativa no desenvolvimento da DMRI (Reynolds et al., 2009). Entre as numerosas substâncias encontradas em drusas de

pacientes com DMRI, foram detectadas as proteínas do Complemento C1q, C3, C4, C5, FH, MCP, DAF, anafilatoxinas C3a e C5a, Clusterina, Vitronectina, imunoglobulinas, proteína C-reativa, ésteres de colesterol, e lipoproteína de baixa densidade. Fragmentos de C3 e C5 e MAC também foram identificados no espaço sob as células do epitélio pigmentar da retina e entre os capilares da coróide (Crabb et al., 2002; Sivaprasad, Chong, 2006; Skerka et al., 2007).

Embora o FH seja sintetizado predominantemente no fígado, as células do epitélio pigmentar da retina também podem produzi-lo (Klein et al., 2005). Pesquisas têm demonstrado que variantes no gene *FH* estão relacionadas com risco aumentado de desenvolver DMRI (Jokiranta et al., 1996; Ufret-Vincenty et al., 2010; Zipfel et al., 2010). Uma delas associa a DMRI com o polimorfismo de FH Tyr⁴⁰²His (CCP 7), uma vez que indivíduos homozigotos com a variante FH His⁴⁰² são cinco a sete vezes mais propensos a desenvolver DMRI (Hageman et al., 2005; Klein et al., 2005). Esse mesmo polimorfismo também foi encontrado como fator de risco para o desenvolvimento de DMRI em pacientes brasileiros com taxas de risco de 1,4 para pacientes portadores de apenas um alelo 1277C (CT heterozigotos; His/Tyr) e 4,6 para aqueles que transportam dois alelos 1277C (CC homozigotos; His/His) em comparação com o grupo de controle (Teixeira et al., 2010). Também há evidência que o polimorfismo de C3 (Arg¹²⁰Gly) e (Arg⁸⁰Gly) aumente o risco de desenvolvimento de DMRI (Yates et al., 2007; Spencer et al., 2008). Atualmente pode-se agrupar os genes conhecidos relacionados à DMRI em cinco vias biológicas distintas: (a) a via do Complemento e resposta imune (b) via de transporte lipídico, (c) via de remodelação, (d) via de angiogênese e (e) sobrevivência celular, reparo de DNA, apoptose e resposta ao estresse. De todas essas vias biológicas, as variantes dos genes codificadores das proteínas do Complemento FH, FB, FI, C2 e C3 contam com aproximadamente 57% das variantes de risco aumentado para DMRI conhecidas, enfatizando o importante papel do Sistema Complemento na sua patogênese (Fritsche et al., 2014).

1.2.2.3 Glomerulopatia C3

A denominação glomerulopatia C3 (GC3) engloba um grupo de doenças renais caracterizadas pela deposição de C3 no glomérulo, dentre elas doença de depósito denso (DDD, conhecida também por glomerulonefrite membrano-proliferativa tipo II -

GNMPII), glomerulonefrite com depósitos isolados de C3 (C3GN) e glomerulonefrite dependente de FHR-5 (Fakhouri et al., 2010; Zipfel et al., 2015). Na avaliação de biópsias renais por imunohistoquímica ou imunofluorescência, observam-se depósitos de C3 ao longo da membrana basal glomerular na GC3, decorrentes de hiperativação local da Via Alternativa do Complemento, geralmente com ausência de depósitos de imunoglobulinas. Essa hiperativação está relacionada com a formação de auto-anticorpos contra proteínas do Complemento (C3, C4 e FH), à presença de mutações nas proteínas do Sistema Complemento ou ainda relacionada a mutações nas suas proteínas reguladoras (Fakhouri et al., 2010; Martinez-Barricante et al., 2010; Servais et al., 2012). Entre as mutações mais descritas encontram-se as mutações nos genes *FH*, *FHR* e *C3* (Zipfel et al., 2015). As mutações no gene *FH* contribuem principalmente com os casos de C3GN e DDD, tanto em homozigose quanto em heterozigose composta. A posição da mutação no gene *FH*, tem implicações funcionais, que podem resultar em ausência da proteína no soro, ou presença da mesma em pequenas quantidades, ou até mesmo em detecção de quantidades normais, porém com função reguladora prejudicada. Mutações localizadas nos CCPs 1-7 podem afetar tanto a função do FH quanto do FHL1 (Zipfel et al., 2015). Os CCPs 19-20 têm diferentes especificidades de ligação nos domínios C-terminais que são determinantes na ligação ao endotélio renal (Clark et al., 2013), sendo mais comum na GC3 as mutações que envolvem esse sítio, mas existem mutações descritas relacionadas a pelo menos 10 dos 20 CCPs de FH também implicados em doenças renais (Zipfel et al., 2015). Os auto-anticorpos mais relacionados a GC3 são C3Nef e C4Nef, também chamados de Fator Nefrítico ou Fator Nefritogênico, que estabilizam a C3-convertase, aumentando sua meia vida com consumo de C3 e FB) e o anti-FH (que impede a ação reguladora do FH) (Józsi et al., 2014). Auto-anticorpos Anti-FB e anti-C3b também foram descritos em relatos de casos esporádicos de GC3 (Chen et al., 2011). Esses pacientes podem apresentar síndrome nefrótica (hipoalbuminemia, proteinúria, e edema), hematúria isolada ou acompanhada de proteinúria não nefrótica, e progridem com frequência para falência renal. A recorrência no rim transplantado é comum, e sua incidência varia de acordo com a causa da C3G (Alpers, 2005; Smith et al., 2007; Athanasiou et al., 2011).

1.2.3 Deficiência do FH

A deficiência completa (homozigota) de FH é um fenômeno raro, descrita até o momento em 33 pacientes oriundos de 15 famílias (Pickering, Cook, 2008). A deficiência de FH é decorrente de mutações tipo I, onde o nível de proteína plasmática é baixo pela existência de um defeito secretório, ou por códon de parada prematura, ou pela rápida degradação da mesma (Rodriguez et al., 2014). Esse fenótipo representa aproximadamente 18% das mutações descritas em FH, onde a mutação na maioria das vezes envolve um dos quatro resíduos Cys que estabilizam as pontes dissulfeto nos filamentos beta. Essas mutações geralmente estão relacionadas à instabilidade estrutural e mal dobramento proteico. Pela grande variação dos níveis de FH no plasma dos pacientes e pelos diferentes métodos utilizados para a definição quantitativa da proteína nos diversos laboratórios, por vezes, essa divisão entre fenótipo tipo I e tipo II não é estritamente clara (Rodriguez et al., 2014). A população afetada por esta deficiência inclui indivíduos brancos, africanos, asiáticos, beduínos, americanos, além de outras populações (Reis et al., 2006; Albuquerque et al., 2012). Em função da ausência desta proteína, principal cofator de FI da Via Alternativa, há descontrole na formação da alça de amplificação da Via Alternativa. Com isso, há consumo exagerado de C3 e excessiva produção de C3b. Nesta situação, a concentração de C3 diminui, acompanhada também pela redução significativa de FB. Consequentemente, indivíduos com deficiência completa de FI ou de FH apresentam quadro semelhante àquele observado nos deficientes primários de C3. Tais pacientes apresentam maior suscetibilidade a infecções microbianas por bactérias encapsuladas, incluindo infecções por *Neisseria meningitidis*, provavelmente decorrentes da deficiência secundária por consumo de C3 e dos componentes C5-C9 (Dragon-Durey et al., 2004; Reis et al., 2006; Falcão et al., 2008). Turley et al. avaliaram uma série de 77 pacientes deficientes de componentes do Sistema Complemento, descrevendo aumento global de infecções bacterianas nesses pacientes, sendo a infecção por meningococo mais comum nos pacientes com deficiência de proteínas da Via Alternativa, quando comparados aqueles com deficiência na Via Clássica (Turley et al., 2015), sendo uma recomendação a vacinação para meningococo e uso de antibioticoprofilaxia para esses pacientes. Em revisão realizada por Pickering e Cook (2008) com pacientes deficientes de FH em homozigose, destacou-se também a susceptibilidade

aumentada a doenças com manifestações renais como GNMP II e SHUa em 28 dos 33 pacientes descritos.

1.3 Curcumina

A curcumina é um composto natural, polifenol hidrofóbico derivado do rizoma da planta *Curcuma longa*, usado na culinária como tempero e para coloração de alimentos, também conhecido como açafrão-da-Índia (**Figura 6**). Há séculos a curcumina tem sido usada na medicina tradicional indiana Ayurveda, sendo atribuída a ela efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios e antitumorais (Goel et al., 2008).

Figura 6 - *Curcuma longa*, seu rizoma e o pó produzido a partir dele.

Representação da planta *Curcuma longa*, seu rizoma e o pó comercialmente vendido como tempero.

A curcumina comercializada em sua forma natural é uma mistura contendo cerca de 77% de curcumina, 18% de demetoxicurcumina e 5% de bisdemetoxicurcumina (Kurita, Makino, 2013; Sueth-Santiago et al., 2015). No Brasil existe a apresentação farmacológica de extrato seco de cúrcuma longa, em cápsulas transparentes de 250mg (Motore®, laboratório Aché), comercializado como medicamento fitoterápico destinado ao tratamento da osteoartrite e artrite reumatoide com descrição de ação anti-inflamatória e antioxidante, com bula aprovada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) em 2012. Apesar de sua baixa absorção, uma vez absorvida a curcumina segue duas vias metabólicas principais. Em uma delas, ela é rapidamente metabolizada por redução, principalmente pela enzima álcool-

desidrogenase, formando dihidrocurcumina, tetrahidrocurcumina e hexahidrocurcumina. Na outra via, tanto a curcumina quanto suas formas reduzidas (dihidrocurcumina, tetrahidrocurcumina e hexahidrocurcumina) são conjugadas via UDP-glicorunil transferase com ácido glicurônico e via sulfotransferases com sulfato (Hoehle et al., 2006; Kurita, Makino, 2013, Jäger et al, 2014; Sueth-Santiago et al., 2015) (**Figura 7**).

Figura 7 - Redução e conjugação da curcumina.

Redução e conjugação da curcumina. A curcumina após absorção por via oral, em parte é reduzida à dihidrocurcumina, tetrahidrocurcumina e hexahidrocurcumina e em outra parte é conjugada com ácido glicurônico. Fonte: Jäger et al. 2014.

Devido às características de absorção, instabilidade em meio fisiológico e rápido metabolismo, a biodisponibilidade da curcumina em sua forma natural é muito baixa. A máxima concentração de curcumina no plasma geralmente é observada entre 1 h e 2 h após ingestão. Ensaios clínicos mostraram eficácia farmacológica em doses de curcumina que excedem a ingestão diária normal. Estes estudos clínicos não mostraram efeitos adversos com doses de até 12 g de curcumina (200 mg/kg de peso corporal) por dia durante um período de 4 meses administrados via oral em humanos (Esatbeyoglu et al., 2012). Uma das estratégias utilizadas para aumentar sua biodisponibilidade é a utilização de adjuvantes que interferem nas suas vias metabólicas, sendo a piperina uma das mais utilizadas. A piperina é um inibidor da

glicorunidação hepática e intestinal, aumentando a biodisponibilidade da curcumina (Shoba et al., 1998).

Nos últimos anos, várias formulações foram desenvolvidas, entre elas tabletes, cápsulas, emulsões lipídicas, formulação lipossomal e nanopartículas (Gupta et al., 2013). Entre elas destaca-se o emprego de nanopartículas (Theracurmin®), uma formulação feita a partir da mistura de curcumina com glicerina, goma ghatti e água, seguida de moagem úmida e dispersão por homogeneização de alta pressão, que permite melhor absorção e melhor biodisponibilidade da curcumina após ingestão por via oral. O produto Theracurmin® (Theravalues Corporation, Tóquio, Japão) foi utilizado previamente em ensaios clínicos tanto em voluntários sadios quanto em pacientes com câncer, mostrando melhor absorção e biodisponibilidade com perfil adequado de segurança, possibilitando o uso de doses de 2 g e 4 g/dia (contendo apenas 200 mg e 400 mg de curcumina, respectivamente), doses essas bem mais baixas do que as anteriormente empregadas em outras apresentações farmacológicas (Kanai et al., 2012; Kanai et al., 2013; Kurita, Makino, 2013).

A curcumina pode ativar mecanismos antioxidantes pela estimulação do fator de transcrição nuclear *factor-erythroid-2-related factor 2* (Nrf2), que atua regulando vários genes que codificam antioxidantes intracelulares, citoprotetores e proteínas de desintoxicação (Scapagnini et al., 2011; Chandran, Goel, 2012). Ela também possui ação anti-inflamatória ao inibir a produção de citocinas como interleucinas (IL)-1, IL-2, IL-8, IL-12, fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa), quimiocinas, moléculas de adesão e fatores de crescimento. Isto ocorre devido à capacidade da curcumina inibir a via de sinalização do NF κ B e outras vias pró-inflamatórias, incluindo COX-2, AP-1, Egr-1, STAT e MAP quinases (Scapagnini et al., 2011; Chandran, Goel, 2012). Sua ação antitumoral se atribui aos efeitos sobre fatores de transcrição, moléculas de adesão, indução de genes responsáveis por apoptose e reguladores da angiogênese e moléculas de sinalização celular, inibindo a ativação da transcrição de genes que contribuem para tumorigênese, proliferação celular e angiogênese, como NF κ B e AP-1, diminuindo a expressão de COX-2, Bcl-2 e Bcl-xL (Goel et al., 2008). Recentes estudos mostraram resultados animadores do tratamento com curcumina em pacientes com nefrite causada por lúpus eritematoso sistêmico, pacientes com artrite reumatoide e pacientes com neoplasia colorretal (Caroll et al., 2011; Chandran, Goel, 2012; Khajehdehi et al., 2012). Além destes

efeitos descritos, outros trabalhos demonstraram que a curcumina também pode induzir o aumento de expressão de proteínas responsáveis pelo dobramento proteico, atuando como chaperona química facilitadora do dobramento e secreção de proteínas mutantes (Filippo et al., 2006; Norez et al., 2006; Albuquerque et al., 2012; Maiti et al., 2014; Ferreira et al., 2016).

Nos últimos anos, houve crescente interesse sobre a curcumina e seus metabólitos, sendo atualmente explorado pela literatura quais dentre seus efeitos descritos se devem à curcumina propriamente dita ou à tetrahydrocurcumina, seu principal metabólito (**Figura 8**) (Aggarwal et al., 2014).

Figura 8 - Alvos moleculares da curcumina e tetrahydrocurcumina.

Alvos moleculares de maior atividade de curcumina *versus* tetrahydrocurcumina. Em amarelo alvos moleculares onde a curcumina é mais efetiva que a tetrahydrocurcumina. Em branco alvos moleculares onde a tetrahydrocurcumina é mais efetiva que a curcumina. Em azul alvos moleculares onde a curcumina interage, mas não a tetrahydrocurcumina. Em Fonte: Aggarwal et al. 2014.

1.4 O paciente estudado e os diagnósticos de deficiência do FH e lúpus eritematoso sistêmico (LES)

Nosso grupo estudou um paciente do sexo masculino (EYS) descendente de família japonesa e filho de pais consanguíneos primos de primeiro grau. Aos 2 anos e 8 meses de idade, apresentou pneumonia complicada com derrame pleural bilateral, com internação em unidade de terapia intensiva, sendo tratado com antibioticoterapia e drenagem torácica bilateral, com boa recuperação. Poucos meses após, ele apresentou novo episódio de pneumonia com internação em unidade de terapia intensiva com necessidade de ventilação invasiva, recebendo tratamento com boa recuperação e alta hospitalar após três semanas. Na ocasião, o paciente não apresentava atividade hemolítica detectável mediada tanto pela Via Clássica como pela Via Alternativa, além de níveis muito baixos de C3. Ao analisar a concentração plasmática de várias proteínas do Sistema Complemento no soro do probando, foram observados níveis normais de FI e properdina, contudo baixos níveis de FH e FB no soro, associados à redução de C3, sugerindo desregulação da Via Alternativa, acompanhado ainda por baixos níveis de C9 devido ao consumo excessivo dessa proteína (Falcão et al., 2008) (**Tabela 3**). Na mesma época também foram avaliados os soros dos familiares. O pai apresentou níveis baixos de FH, mas com atividade hemolítica dependente de Complemento normal. A mãe apresentou 50% da concentração de FH normal no soro e baixos níveis de C3, FI e FB, sendo esta redução a provável causa da diminuição da atividade hemolítica para a Via Alternativa encontrada no seu soro. Além disso, sua irmã também apresentou redução de 50% da concentração de FH no soro com atividade hemolítica dependente de Complemento normal (**Tabela 3**).

Em 2015, o paciente então com 18 anos de idade, foi convidado para o presente estudo após aprovação pela CEP. Em anamnese à admissão no protocolo, o paciente referia que após as duas internações pregressas, não tivera mais infecções graves. Após a segunda internação, iniciou uso de amoxicilina profilática, utilizada até os 10 anos de idade. Teve episódio de varicela aos 6 anos de idade, sem outras complicações. Referia na ocasião da anamnese admissional, que há cerca de 4 anos apresentava lesão de pele em face que piorava à exposição solar, e há cerca de 3 anos lesão de pele cervical posterior e peitoral, persistentes.

Tabela 3 - Atividade hemolítica mediada pelo Sistema Complemento e dosagens de proteínas do Complemento no paciente e em seus familiares.

Componente	ESY	Pai	Mãe	Irmã	Valor de referência
VC (%)	0	127,5	77,2	119,6	56-192
VA (%)	0	117,5	49,2	82,2	71-171
C3 (µg/ml)	<<	963,5	382,6	1271,1	800-1900
C4 (µg/ml)	467,7	807,3	514,4	615,5	450-600
FH (µg/ml)	16,8	190,9	140,5	143,6	242-759
FI (µg/ml)	51,6	52,2	23,6	ND	39-100
FB (µg/ml)	<<	105,9	62,4	ND	74-286
Properdina (µg/ml)	12	ND	ND	ND	13-38
C9 (µg/ml)	5,6	38,5	33,5	30	22-35

Atividade hemolítica mediada pelo Sistema Complemento não foi detectada no paciente ESY e os níveis de C3, FB e C9 encontrados foram muito baixos em provável consequência da deficiência de FH. Pai, mãe e irmã apresentaram baixos níveis de FH. A mãe apresentou também baixos níveis de C3, FI e FB, com diminuição da atividade hemolítica pela Via Alternativa do Complemento. Pai e irmã, apesar da redução da concentração de FH no soro, apresentaram atividade hemolítica dependente de Complemento normal. VC: Via Clássica, VA: Via Alternativa, <<: concentrações abaixo da resolução do método. ND: não determinado. Fonte: Falcão et al. 2008.

Nos últimos 2 anos, o paciente vinha apresentando episódios de dor articular, cerca de 2-3 vezes ao ano nas articulações: cotovelo direito (restrição da extensão e inchaço), tornozelo direito (inchaço, com duração de cerca de 5 dias, com melhora com anti-inflamatórios não esteroides - AINE) e 4º dedo da mão direita (inchaço e vermelhidão por cerca de 4-5 dias, com melhora com AINE), não simultâneas. Em ocasião que apresentara sintoma articular, foi realizado USG da articulação do cotovelo, que documentou sinovite com pequeno derrame articular, com espessamento sinovial nas fossas olecranianas e com bolsa olecraniana de aspecto normal. O paciente também reportou avaliação pregressa para alérgenos, positiva para ácaro, barata, pó e pigmentos de tinta.

O paciente fora avaliado para as concentrações dos auto-anticorpos apenas mais recentemente e ao início da realização deste projeto com FAN Hep2 (fator anti-núcleo), anti-DNA, ANCA (anticorpos anti-citoplasma de neutrófilos), anti-JO1 (anti-histidil T-RNA sintetase), anti SCL-70 (anti-topoisomerase I), anti-RNP-SM, anti-SM, anti-Ro, anti-La, IgG anti-cardiolipina, IgM anti-cardiolipina e Fator reumatoide, com

os títulos positivos listados na **Tabela 4**, sendo então diagnosticado lúpus pelos dois critérios de classificação mais utilizados:

- classificação *American College of Rheumatology* (ACR) (Hochberg, 1997) (**Anexo A**): eritema malar, fotossensibilidade, artrite não erosiva, FAN, anti-SM e anticardiolipina (IgG ou IgM).
- classificação *Systemic Lupus International Classification Criteria* (SLICC) (Petri et al., 2012) (**Anexo B**): lúpus cutâneo agudo, lúpus cutâneo crônico, sinovite, FAN, anti-SM e baixos níveis de C3.

Apesar dos baixos níveis de C3 serem secundários à deficiência de FH, o paciente apresentava 6 dos 11 critérios de classificação pela ACR e também preenchia 3 critérios clínicos e 3 critérios imunológicos pela classificação SLICC. A sensibilidade e especificidade dos critérios ACR para lúpus pediátrico são de 96% e 100%, respectivamente (Ferraz et al., 1994).

Tabela 4 - Auto-anticorpos encontrados no paciente.

Auto-anticorpo	resultado
FAN Hep2	1:1280
anti- RNP-SM (referência <15 U/ml)	>200 U/ml
anti-SM (referência <15 U/ml)	42,8 U/ml
anti-Ro (referência <15 U/ml)	>200 U/ml
anti-La (referência <15 U/ml)	35,92 U/ml
IgG anti-cardiolipina (referência <10 GPL/ml)	21,58 GPL/ml
IgM anti-cardiolipina (referência <7 MPL/ml)	26,11 MPL/ml
Fator reumatoide (referência <14 U/mL)	219,2 U/ml

Auto-anticorpos encontrados no paciente, entre parênteses seus valores de referencias e os resultados das quantificações.

Ao início do protocolo o paciente ESY apresentava sinais vitais e exame físico dentro da normalidade, exceto pelas lesões de pele em face predominante em região malar e nasal (hiperemiada, levemente edematosa e finamente descamativa), e em região cervical posterior e tórax anterior (hiperemiadas com hiperqueratose e escoriações), com baixo escore de atividade do lúpus, totalizando 4/105 na classificação de *Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index* (**Anexo C**).

1.4.1 A deficiência de FH e a mutação Arg¹²⁷His do paciente

O perfil das proteínas do Complemento para a família do probando indicou um padrão de herança autossômica recessiva (Falcão et al., 2008). O cRNA de FH do paciente foi sequenciado e uma mutação de simples troca de nucleotídeo **CG⁴⁵³T→CA⁴⁵³T** foi encontrada, responsável pela troca de códon de Arg¹²⁷His na molécula de FH deste paciente, seguindo um padrão de herança autossômica recessiva confirmado pela heterozigose dos pais para tal mutação (Falcão et al., 2008). A Arg¹²⁷ da molécula de FH é essencial para a secreção desta proteína por fibroblastos. Nosso grupo demonstrou em experimento realizado *in vitro*, que a mutação encontrada no FH (Arg¹²⁷His) do paciente ESY causava a retenção da proteína mutante no retículo endoplasmático (Albuquerque et al., 2012).

1.4.2 Efeito chaperona e a ação da curcumina em cultura de fibroblastos do paciente

A manutenção do proteoma nas células eucariotas requer uma organização equilibrada entre síntese, dobramento, degradação e tráfico proteico. Nos seres humanos, mais de 2000 genes estão integrados nesse processo funcional (Morimoto, Cuervo, 2009; Lindquist, Kelly, 2011). Esse processo também pode ser influenciado por características individuais de cada proteína, onde cada uma delas possui cinética e termodinâmica de dobramento particulares com distintas capacidades de agregação (Lindquist, Kelly, 2011; Noack et al., 2014). As doenças causadas por mal dobramento proteico podem ser causadas por desequilíbrio desse sistema, pelo estresse e sobrecarga do retículo endoplasmático (Park, Ozcan, 2013), ou decorrente de mutações no DNA ou no RNAm responsável pela produção da proteína, causando substituições de aminoácidos, deleções ou interrupções precoces da formação da cadeia polipeptídica. Essas mutações podem ter como consequência a degradação proteica, retenção intracelular da proteína, ou mal acoplamento da proteína na membrana plasmática (Noack et al., 2014). O mal funcionamento ou a sobrecarga desse aparato pela formação excessiva de proteínas mal dobradas recai sobre o retículo endoplasmático, organela responsável pela síntese e maturação de proteínas secretadas e de membrana (Park, Ozcan, 2013; Noack et al., 2014). O estresse do retículo endoplasmático ativa um mecanismo adaptativo de proteção e auto-regulação conhecido por *unfolded protein response* (UPR), que quando desregulado favorece o surgimento de doenças como

diabetes tipo II, doenças neurodegenerativas e obesidade, entre outras (Park, Ozcan, 2013; Lee, Ozcan, 2014). O equilíbrio desse sistema depende de um aparelho celular onde chaperonas, muitas delas conhecidas como *Heat Shock Proteins*, ligam-se a enzimas, transportadores, receptores e canais iônicos para corrigir o dobramento proteico e retificar o trânsito celular das proteínas. Entre elas, podemos citar: Hsp100 (ClpB), Hsp70/110 (DnaK), Hsp60 (GroEL), Hsp90 (HtpG), Small-Hsps, J-Proteins (Mattoo, Goloubinoff, 2014). Elas exercem um papel regulador e de controle de qualidade, mantendo o equilíbrio entre produção e armazenagem (ou retenção e degradação das proteínas inadequadas), e mobilização, transporte e liberação das proteínas produzidas (Gidalevitz et al., 2013). Pela atuação dessas chaperonas moleculares, o dobramento proteico adequado converte cadeias lineares de polipeptídios em estruturas tridimensionais de baixa conformação energética. A sequência de aminoácidos de cada proteína contém a informação que indica a estrutura nativa e caminho para atingir sua conformação terciária. A estrutura terciária pode envolver ligações covalentes em forma de pontes dissulfeto entre dois resíduos de cisteína. Esse processo pode ocorrer de forma espontânea em condições específicas (Anfinsen, 1973), mas em situações de estresse requer que chaperonas acelerem e controlem esse processo, de acordo com as demandas fisiológicas do indivíduo. Nessas condições, os polipeptídios corretamente dobrados têm as porções hidrofóbicas de seus aminoácidos voltadas para o interior da molécula, ao passo que os componentes hidrofílicos voltam-se para o exterior. Isto possibilita solubilidade em meio aquoso e impede agregação espontânea (Dobson, 2003). A partir do conhecimento de que algumas substâncias exógenas podem atuar como chaperonas e exercer esse papel de facilitação e regulação do tráfico celular de proteínas (Noack et al., 2014), ainda que por vias não completamente compreendidas, muitos estudos têm se dedicado a intervir nessas vias biológicas para o tratamento de doenças de mal dobramento com uso de chaperonas químicas e farmacológicas. Chaperonas químicas são substâncias que podem interferir no transporte proteico celular, como o 4-ácido fenilbutírico, ácido tauro-ursodeoxicólico, betaína (Roth et al., 2012) e curcumina (Albuquerque et al., 2012). Chaperonas químicas são moléculas artificialmente desenvolvidas com sítios específicos de ligação, com intenção de substituir moléculas nativas defeituosas e assim retificar o tráfico intracelular de proteínas.

Atualmente várias delas estão sendo desenvolvidas e testadas em ensaios clínicos (Suzuki, 2013; Esposito et al., 2016) para tratamento de doenças relacionadas ao mal dobramento proteico.

Uma vez que a mutação encontrada no paciente ESY causava a retenção da proteína mutante no retículo endoplasmático, a cultura de fibroblastos do paciente foi tratada com as chaperonas químicas ácido fenilbútrico e curcumina, e ambas promoveram aumento de secreção do FH mutante (Albuquerque et al., 2012). Apesar da mutação encontrada no FH, uma vez secretada a proteína com auxílio dessas chaperonas químicas, foi demonstrado que sua atividade funcional não era afetada. Dentre estas duas substâncias com ação de chaperonas, a curcumina mostrou-se mais promissora devido a maior indução de secreção de FH, quando comparada ao ácido fenilbútrico (Albuquerque et al., 2012).

1.5 LES e deficiência de proteínas do Sistema Complemento

O LES é uma doença de caráter autoimune, com produção de auto-anticorpos contra constituintes do núcleo celular como DNA, histonas e ribonucleoproteínas. É uma doença multissistêmica, com deposição de imunocomplexos em vários órgãos, principalmente nos rins, articulações e pele, provocando inflamação, dano tecidual e uma gama variada de manifestações clínicas e alterações laboratoriais, que juntos compõem seus critérios diagnósticos (Liu, Ahearn, 2007; Ippolito et al., 2011; Grammatikos, Tsokos, 2012; Petri et al., 2012). Em 1982 os critérios de classificação para LES foram definidos pelo *American College of Rheumatology* (ACR) (Tan et al., 1982), e posteriormente revisados em 1997 (Hochberg, 1997) (**Anexo A**). Em 2012, o *Systemic Lupus Collaborating Clinics* (SLICC) (Petri et al., 2012), definiu e validou um novo critério de classificação, sendo considerado para definição de LES a presença de 4 em um total de 17 critérios, sendo pelo menos um critério clínico e um critério imunológico ou a presença de nefrite lúpica classificada por biópsia renal na presença de auto-anticorpos fator anti-núcleo (FAN) ou anti-DNA positivos (**Anexo B**) (Petri et al., 2012). Como já se definia na classificação anterior, os critérios diagnósticos são cumulativos e não necessitam estar presentes simultaneamente. A incidência de LES varia de 1-10 por 100.000 indivíduos por ano, com prevalência variando entre 20 e 70 por 100.000. A doença predomina em mulheres em idade fértil (proporção homem:mulher de 1:9), com uma incidência maior em afro-

americanas, mas pode acometer ambos os sexos em qualquer idade (McCarty et al., 1995; Fernandez et al., 2007; Pons-Estel et al., 2010). A doença iniciada antes dos 16 anos de idade representa 15-20% dos casos de LES, apresenta evolução mais grave e maior incidência de nefrite, alterações hematológicas, fotossensibilidade, eritema malar e úlceras de mucosa. A doença iniciada antes dos 5 anos de idade é extremamente rara, e quando presente, deve levantar suspeita sobre condições genéticas e imunodeficiências predisponentes para LES (Papadimitraki, Isenberg, 2009; Malattia, Martini, 2013; Morgan et al., 2013; Choi et al., 2015; Tarr et al., 2015). Uma das condições genéticas mais relacionadas ao LES é a deficiência dos fatores da Via Clássica do Sistema Complemento (Macedo, Isaac, 2016), principalmente a deficiência de C1q (90-93%), C1r/C1s (50-57%), C4 (75%) e C2 (10%) (Walport et al., 1998; Pickering et al., 2000; Barrila-La Barca, Atkinson, 2003; Kallel-Sellami et al., 2007). Turley et al. avaliaram uma série de 77 pacientes deficientes de componentes do Sistema Complemento e encontraram lúpus ou síndrome clínica semelhante a lúpus em 37% dos pacientes com deficiências da Via Clássica (Turley et al., 2015). Considerando a amostra de pacientes portadores de lúpus, cerca de 1% tem deficiência homozigota de componentes do Sistema Complemento (Walport et al., 1997). No lúpus juvenil, a deficiência de componentes da Via Clássica do Complemento responde por cerca de 8% em amostra selecionada de pacientes brasileiros (Jesus et al., 2011) e 20% em amostra selecionada de pacientes indianos (Bhattad et al., 2015). A associação de LES com deficiência de fatores da Via Alternativa é extremamente rara, resumindo-se a poucos relatos de casos. A associação de deficiência de FH e lúpus apresentada aqui neste trabalho pelo paciente ESY é incomum, havendo apenas outros dois casos descritos na literatura (Brai et al., 1988; Fijen et al., 1996), sendo um deles associado também à deficiência do componente C2 da Via Clássica, e o outro com deficiência associada de C2, C4 e C1q, não permitindo concluir nestes casos relatados que a deficiência de FH *per se* fosse uma causa predisponente do LES.

1.6 Justificativa

O paciente ESY apresenta deficiência de FH associada ao LES, com descrição de grande morbidade associada à susceptibilidade a infecções graves principalmente na infância e com um risco potencial de desenvolvimento de doença renal. Em

estudo prévio realizado em cultura de fibroblastos do paciente, foi demonstrado que a mutação apresentada Arg¹²⁷His causa acúmulo do FH no retículo endoplasmático e retardo na sua secreção. Estes mesmos fibroblastos tratados *in vitro* com curcumina, aumentaram a secreção do FH mutante, o qual por sua vez manteve preservada sua função reguladora do Sistema Complemento. Dado que *in vitro* a curcumina melhorou a secreção do FH mutante por fibroblastos do paciente, especulou-se que este poderia ser um tratamento alternativo promissor para a deficiência de FH no paciente EYS, podendo aumentar os níveis de FH no soro e eventualmente regular a Via Alternativa do Sistema Complemento do paciente, diminuindo as infecções recorrentes e atuar retardando potenciais complicações dessa deficiência. Em modelo murino de lúpus, a curcumina foi capaz de reduzir o nível de proteinúria e os níveis séricos do auto-anticorpo anti-DNA IgG, com redução da deposição de imunocomplexos nos glomérulos (Lee et al., 2013). Em pacientes com nefrite lúpica, a suplementação oral de curcumina proporcionou redução da proteinúria e da hematúria, e diminuição da pressão sistólica (Khajehdehi et al., 2012). Como este último estudo mostrou boa tolerância e segurança no uso da curcumina, com benefício para estes pacientes, e dado o baixo grau de atividade da doença lúpica no paciente ESY, o diagnóstico de LES ao início do protocolo não foi considerado um impedimento para o tratamento da deficiência de FH com a curcumina.

2 HIPÓTESE E OBJETIVOS DO TRABALHO

2.1 Hipótese

A curcumina utilizada de forma regular por via oral poderia funcionar como chaperona química, a exemplo do que foi documentado com cultura de fibroblastos do paciente ESY *in vitro*. Ao administrá-la ao paciente, o transporte do FH mutante poderia ser retificado, e os níveis séricos de C3 e a funcionalidade da Via Alternativa do Complemento poderiam eventualmente ser normalizados.

2.2 Objetivo geral

Avaliar a eficácia do tratamento com Theracurmin® em aumentar a secreção e os níveis séricos de FH mutante no paciente EYS.

2.3 Objetivos específicos

Avaliar se o tratamento com Theracurmin® seria capaz de aumentar a concentração de FH mutante, FB e C3 no soro do paciente.

Monitorar a função renal, a resposta imunológica e a tolerância ao Theracurmin®, bem como o surgimento de efeitos colaterais avaliados por meios clínicos e laboratoriais.

3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Figura 9 - Delineamento experimental deste trabalho.

Delineamento experimental: acima linha de planejamento terapêutico. Abaixo as frentes de avaliação do paciente durante o tratamento experimental com Theracurmin®: exame clínico global, exames em soro e plasma, exames em urina e biópsia de pele com lesão.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Avaliação do paciente

A medicação foi obtida da Theravalues Corporation, companhia japonesa sediada em Tóquio, entregue por correio em embalagem opaca de 1 kg, e então alíquotada em envelopes de 2 g também opacos. Após dose inicial feita sob monitorização médica, os envelopes foram dispensados ao paciente para uso regular conforme protocolo. O paciente foi submetido a avaliação clínica nos seguintes dias de protocolo: D1, D10, D72, D93, D113, D136, D147 e D201, correspondentes às datas e aos eventos ocorridos durante o seguimento, listados na **Tabela 5**. Neste estudo, foram feitas as avaliações laboratoriais de ureia, creatinina, sódio, potássio, cálcio, fósforo, magnésio, cloro, transaminase oxalacética, transaminase pirúvica, perfil lipídico, proteínas totais e frações, proteína C-reativa, hemograma, concentração e classes de imunoglobulinas, detecção e títulos de auto-anticorpos, C3, C4, urina tipo I, proteinúria isolada, microalbuminúria isolada, creatinina de urina isolada, beta-2 microglobulina isolada, realizados no Instituto da Criança e Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP.

A avaliação seriada dos títulos de auto-anticorpos ao longo do tratamento experimental, foi realizada no momento inicial (D1) pré-tratamento, em vigência de tratamento com 2 g (D10) e em tratamento com 4 g (D113), por cortesia do Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento do Laboratório Fleury.

A dosagem de C2 por imunodifusão radial e dosagem de C1q por imunonefelometria foram realizadas no soro do paciente no momento inicial (D1), por gentileza do Hospital Israelita Albert Einstein em parceria com o Laboratório Internacional Cerba (Espanha) com a colaboração do Dr Cristóvão L. P. Manguiera.

Os exames de ecocardiograma, USG articular (cotovelo direito) e Raio-X de articulação de cotovelos bilateralmente, foram todos realizados no setor de Radiologia do Instituto da Criança HCFMUSP. A avaliação oftalmológica do paciente foi feita gentilmente pelo oftalmologista Dr. Luiz Carlos Ferreira de Sá, no Instituto da Criança, HC-FMUSP.

4.1.1 Pré-tratamento

Avaliação inicial, clínica e laboratorial (**Figura 9**).

4.1.2 Avaliação da primeira dose

Administração oral de dose de 2 g de Theracurmin® diluído em água (apresentação em pó, correspondente a 200 mg de curcumina), seguida por determinação da concentração plasmática de curcumina em relação ao tempo zero (imediatamente antes da dose) e em 30 min, 60 min, 90 min, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h e 24 h após a dose (curva de Theracurmin® 2 g), e avaliação comparativa com os níveis séricos de FH alcançados nos mesmos horários.

4.1.3 Manutenção

Tratamento com 2 g de Theracurmin® administrada em uso contínuo de 12 em 12 h, e avaliação de tolerância ao tratamento por parâmetros clínicos e laboratoriais.

4.1.4 Avaliação do aumento de dose

Administração de dose de 4 g de Theracurmin® (correspondente a 400 mg de curcumina), seguida por determinação da concentração plasmática de curcumina em relação ao tempo zero (imediatamente antes da dose) e 30 min, 60 min, 90 min, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h e 24 h após a dose (curva de Theracurmin® 4 g), e avaliação comparativa com os níveis séricos de FH alcançados nos mesmos horários.

4.1.5 Aumento da dose e manutenção

Tratamento com Theracurmin® 4 g administrada em uso contínuo de 12 em 12 h, e avaliação de tolerância ao tratamento por parâmetros clínicos e laboratoriais.

4.1.6 Interrupção do tratamento

Suspensão do tratamento com Theracurmin® com seguimento clínico e avaliação laboratorial do paciente. Biópsia de pele para análise comparativa.

Tabela 5 - Linha do tempo de execução do protocolo.

Data	07/abr	16/abr	17/jun	08/jul	13/jul	22/jul	28/jul	20/ago	31/ago	24/out
Dia	D1	D10	D72	D93	D98	D107	D113	D136	D147	D201
Theracurmin®	2g	2g	2g	2g	2g	4g	4g	Interrupção	hidroxicloroquina	
Evento			sinusite	artrite	caxumba		exposição solar excessiva e artrite			
Aderência			má aderência						má aderência	

Na coluna à esquerda: Data (referente ao ano de 2016); Dia (correspondência entre a data e o dia de protocolo); Theracurmin® (Theracurmin® com dose apresentada nesta tabela, administrada de 12 em 12 h; interrompido o uso de Theracurmin® em 20/08, e em 31/08 foi introduzido o tratamento com hidroxicloroquina); Evento (intercorrência clínica ou evento reportado ao longo do protocolo); Aderência (aderência reportada pelo paciente em relação ao uso da medicação. No primeiro evento de má aderência, foi reportado o uso de Theracurmin apenas uma vez ao dia; no segundo evento de má aderência foi reportado a interrupção do uso da hidroxicloroquina por 10 dias, com retorno espontâneo ao uso da medicação após piora do eritema malar.

4.2 Microscopia óptica e Imunofluorescência

Foram realizadas biópsias de pele de lesão de pele crônica no tórax (região não submetida à exposição solar) no início do protocolo e pós-tratamento, para avaliação da dermatite e do impacto do tratamento na mesma. As biópsias foram analisadas pelo serviço de Patologia Clínica (Laboratório de Dermatologia) do Hospital das Clínicas, sendo elas: microscopia óptica (com conservação do fragmento em formol), e imunofluorescência (com conservação do fragmento em meio de Michel) empregando como anticorpos primários anti-IgA, anti-IgM, anti-IgG e anti-C3.

4.3 Avaliação de qualidade de vida

Considerando o paciente como portador de uma doença crônica (imunodeficiência) que poderia interferir na qualidade de vida e que o tratamento poderia ter impacto sobre a mesma, foi aplicado questionário de avaliação preenchido nas ocasiões D1 (pré-tratamento), D136 (durante tratamento com Theracurmin® 4 g de 12 em 12 h), e D201 (após suspensão do tratamento com Theracurmin® e com 54 dias de tratamento com hidroxiclороquina). O instrumento selecionado para a avaliação da qualidade de vida foi o *Pediatric Quality of Life Inventory 4.0* (PedsQL 4.0) (Varni et al., 2001; Klatchoian et al., 2008) validado para o português do Brasil, com o uso de da versão que se aplica ao adolescente (13 a 18 anos) e aos pais. O questionário inclui quatro domínios que abrangem saúde e disposição física, aspectos emocionais, aspectos sociais, e desempenho escolar, distribuídos em 23 itens, questionados em escala Likert de cinco pontos (0 - nunca, 1 - quase nunca, 2 - às vezes, 3 - frequentemente e 4 - quase sempre), com soma da pontuação variando entre zero e 92, admitindo-se que a menor pontuação corresponde a melhor a qualidade de vida.

4.4 Avaliação da concentração plasmática de curcumina, curcumina e tetrahidrocurcumina glicorunidade

A avaliação do nível plasmático de curcumina foi realizada por Dr Nilo J. C Duarte, Persio A. R. Ebner, Paschoalina Romano e Vinicius M. Rezende, no Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP em sangue

venoso periférico coletado em EDTA, centrifugado a 4000 rpm por 10 min, e armazenado a 70 °C negativos, para posterior processamento. O método utilizado foi a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplada à espectrometria de massas, com ionização realizada no modo de ionização positiva (UPLC-MS/MS). O equipamento utilizado foi o Acquity® (Waters Corporation, Milford, Massachusetts). As amostras, calibradores e padrão interno em plasma foram precipitados e a extração líquido-líquido (50 µL de amostra de plasma, calibradores e controles foram desproteinizados com sulfato de zinco 0,1 M em água e metanol (20%) e acetonitrila), centrifugados em 13.500 rpm por 8 min, e os sobrenadantes (10 µL) foram injetados no sistema cromatográfico. Combinações precursor > produto, de relação massa/carga (m/z 369,1 > 177 e m/z 369,1 > 285), foram usadas para quantificar a curcumina e padrão interno (IS curcumina deuterada-d6, m/z 375 > 180). Os padrões de referência de curcumina (1 g) e curcumina deuterada-d6 (5 mg), com pureza superior a 95% foram adquiridos da empresa Toronto Research Chemicals Inc, Toronto Canadá; e acetonitrila, metanol, acetato de amônia grau LC-MS e ácido fórmico (99%) foram adquiridos da Sigma-Aldrich Co, Steinheim, Alemanha. Para avaliação dos metabólitos formados, avaliamos a Curcumina após a adição de Beta glucoronidase e analisamos ainda a tetrahidrucurcumina (m/z 373,19 > 137 e m/z 373,19 > 94,0). O calibrador de tetrahidrucurcumina utilizado foi da Sigma-Aldrich Co, Steinheim, Alemanha. O método apresentado foi avaliado de acordo com a performance em precisão, coeficiente de variação intraensaio de 6,8-11,6%, coeficiente de variação interensaio de 4,9-6,5%, exatidão (com recuperação obtida de 99,0-104,6%), linearidade (1021 ng/mL) e limite mínimo de detecção (0,13 ng/mL), com resultados adequados para detectar as concentrações da Curcumina e seu metabólito. Não foi observado efeito matriz.

4.5 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

A quantificação do FH mutante e FB séricos foi realizada por ELISA em nosso laboratório empregando *kits* adquiridos da Abcam. Cada *kit* conta com: soluções para diluição e lavagem, padrão para confecção da curva de calibração, placas já contendo anticorpo primário para adição da amostra de soro diluída, anticorpo de detecção biotinilado, anticorpo streptavidina peroxidase conjugado, substrato de coloração, e solução para interrupção da reação, sendo recomendado no próprio *kit*

o fator de diluição do soro e a leitura em absorbância de 450nm de comprimento de onda. Para a quantificação do FH mutante foi utilizada a diluição de soro a 1:50.000. Para a quantificação FB foi utilizada a diluição de soro 1:2.000.

A lipocalina associada a gelatinase neutrofílica (NGAL) é uma proteína considerada biomarcador de lesão renal, e tem sua expressão aumentada em células tubulares renais em decorrência de lesão renal aguda (Kuwabara et al., 2009). A quantificação de NGAL foi realizada em amostras de urina ao longo de todo o protocolo em *kit* de ELISA (Quantikine ELISA Human Lipocalin-2/NGAL da R&D Systems código DLCN20), no Laboratório de Investigação Médica LIM 36 do Instituto da Criança – HCFMUSP.

4.6 Western Blot

A análise da presença do FH por *Western Blot* foi feita gentilmente pela doutoranda Lazara Elena Santisteban Lores do nosso laboratório, empregando amostras de soro do paciente, diluído 1:300 e submetido à separação proteica por eletroforese em gel de SDS-PAGE em condições redutoras. Foram utilizados géis de 1,5 mm de espessura, na concentração de 5% no gel de empilhamento e 10% no gel de separação. As corridas eletroforéticas foram efetuadas a 120 V em temperatura ambiente. Em seguida, as proteínas foram transferidas do gel para uma membrana de nitrocelulose em sistema Mini-Trans-Blot-Cell (Bio-Rad Laboratories, Califórnia, CA, Estados Unidos), por 75 min a 350 mA. Após a transferência, os sítios de ligação inespecíficos na membrana foram bloqueados com leite desnatado a 10%, *overnight* a 4 °C. Após três lavagens com PBS com 0,05% de Tween 20 (PBS-T), a membrana foi incubada por 1 h em temperatura ambiente com anticorpo anti-FH humano produzido em cabra (Complement Technology, Texas, TX, Estados Unidos) diluído 1:5.000 em leite desnatado a 10%. Após nova lavagem foi adicionado anticorpo anti-cabra conjugado à peroxidase, produzido em coelho (Complement Technology, Texas, TX, Estados Unidos) diluído a 1:10.000 em leite desnatado a 10%. Para a revelação, a membrana foi incubada com o *kit* de substrato quimioluminiscente (SuperSignal®, Thermo Scientific) e exposta ao filme de alta sensibilidade Hyperfilm™ (GE Healthcare, Reino Unido) até atingir a intensidade adequada, empregando-se revelador e fixador da KODAK.

4.7 Quantificação da concentração sérica de interleucinas

Os níveis séricos de IL-1beta, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 e TNF-alfa foram quantificados no Laboratório de Investigação Médica (LIM 56) da Dermatologia por gentileza do Prof. Dr Dewton de Moraes Vasconcelos, utilizando-se o sistema de ensaio com microesferas fluorescentes (*Cytometric Bead Array* – CBA – BD, Estados Unidos) seguindo a metodologia sugerida pelo fabricante. Esta técnica emprega uma mistura de 6 esferas de poliestireno, de intensidades de fluorescência discretas e distintas, recobertas com anticorpos específicos para as citocinas humanas detectadas no canal de fluorescência 3 (FL-3) ou fluorescência 4 (FL-4). Essa metodologia permite a avaliação simultânea de diversas citocinas de interesse no mesmo ensaio, empregando pequenos volumes de amostra. Para aquisição dos dados, o aparelho foi ajustado utilizando o BD FACSComp Software e o BD Calibrate Beads. Os valores correspondentes à intensidade média de fluorescência FL-2 na escala logarítmica foram utilizados como a unidade de análise semi-quantitativa para cada citocina analisada.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO:

5.1 Avaliação global do efeito do tratamento no paciente

Na **Tabela 4** apontada em Material e Métodos, estão apresentadas as datas e o dia correspondente do protocolo, bem como as intercorrências infecciosas e a má aderência ao uso do medicamento reportada pelo próprio paciente. ESY apresenta a associação de deficiência de FH e lúpus. Durante o protocolo, o paciente apresentou episódios de artrite, à semelhança dos episódios que havia reportado previamente em anamnese inicial, sem necessidade de intervenção terapêutica. Apresentou episódio de sinusite avaliado no D72 tratado com antibiótico amoxicilina-clavulonato, episódio de caxumba reportado no D98 (em época que fora documentada epidemia viral de caxumba em São Paulo), e piora da dermatite relacionada à exposição solar indevida, avaliada no D136. O paciente não reportou nenhum efeito adverso com o uso de Theracurmin®, em concordância com a literatura, que reporta boa tolerância ao seu uso com baixa incidência de efeitos colaterais (Kanai et al. 2012, Kanai et al. 2013).

5.1.1 Avaliação laboratorial

Considerando a avaliação laboratorial do paciente, podemos concluir que o paciente não apresentou alterações eletrolíticas e gasométricas significativas ao longo de todo protocolo, sendo notada apenas a queda do lactato após a introdução de hidroxicloroquina, iniciada no D147 (**Tabela 6**).

A proteína C-reativa (PCR) é uma proteína de fase aguda, sendo um marcador inespecífico de inflamação sistêmica (Pepys, Hirschfield, 2003; Amalraj et al., 2017). A avaliação de PCR no soro do paciente ao longo do protocolo, revelou aumento deste marcador para 5,11 mg/dl durante o episódio de sinusite avaliado no D72. Seu valor no início do protocolo foi de 2,18 mg/dl, apresentando queda posterior até 0,9mg/dl, e depois voltando a subir no final do protocolo, após retirada do tratamento experimental (**Tabela 7**). O uso de curcumina pode, pelos seus efeitos anti-inflamatórios, levar à queda da PCR, como já foi demonstrado em estudos em pacientes com artrite reumatóide ativa (Chandran, Goel, 2012; Amalraj et al., 2017). Os índices hematimétricos não apresentaram alterações significativas ao longo do protocolo, exceto pela porcentagem de eosinófilos discretamente aumentada, com

valores que oscilaram ao longo do protocolo, e com um aumento um pouco maior após suspensão do tratamento experimental com Theracurmin® (**Tabela 8**). A contagem de eosinófilos é aumentada em pacientes atópicos, e foi observada no paciente ESY, que referia alergia pregressa a ácaro, barata, pó e pigmentos de tinta. Apesar de a curcumina demonstrar *in vitro* propriedades anti-inflamatórias e inibir respostas alérgicas, em ensaio clínico com pacientes com asma atópica persistente, a suplementação com 1 g de curcumina (cápsulas de curcumina - Sabinsa Corporation, New Jersey, USA) duas vezes por dia não afetou significativamente: o volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF1) pós-broncodilatador, o uso de broncodilatador de resgate, a dose de corticosteróide inalado, os níveis de IgE sérica e de eosinófilos sanguíneos nestes pacientes (Kim et al., 2011).

A função hepática e o perfil lipídico do paciente mantiveram-se dentro da normalidade ao longo de todo o protocolo (**Tabela 9**).

O perfil eletroforético de proteínas do paciente mostrou apenas um leve aumento da fração gama desde a avaliação inicial, mas sem, contudo, configurar um pico monoclonal. Esse perfil não foi alterado pelo tratamento com Theracurmin® ou pela suspensão do mesmo (**Tabela 10**). Fijen et al. (1996) em caso relatado de deficiência de FH associado a lúpus (com concentração sérica de C2 também reduzida), também descreveu o mesmo achado em relação ao aumento da concentração de gamaglobulina na sua paciente.

A concentração de imunoglobulinas do paciente ESY mostrou-se alterada desde a avaliação inicial, com aumento da concentração das classes de imunoglobulinas IgA, IgM e IgE, sendo provavelmente o aumento de IgA e IgM decorrente de um efeito imunológico compensatório pela deficiência de C3 apresentada pelo paciente. O aumento da concentração sérica de IgE é descrito em processos alérgicos, e o paciente referia investigação pregressa com alergia documentada à ácaro, barata, pó e pigmentos de tinta. Um efeito digno de nota ao longo do protocolo foi a queda dos níveis de IgE do paciente, mas ainda mantendo valores muito acima da normalidade (**Tabela 11**).

Para avaliar o efeito do uso de Theracurmin® sobre o quadro alérgico previamente descrito pelo paciente, os títulos de IgE específicas contra barata, poeira, e ácaros *Dermatophagoides farinae* e *Blomia tropicalis*, foram também determinados em três momentos distintos: pré tratamento, em uso de Theracurmin® 2 g (D10) e em uso de

Theracurmin® 4 g (D113). Os títulos de IgE específica para barata foram negativos nas três amostras. Os títulos do IgE específica para poeira e *Dermatophagoides farinae* permaneceram muito elevados nas três coletas. Os títulos de IgE específica para *Blomia tropicalis*, diminuíram ao longo do tratamento, mas ainda permanecendo em valores altos (**Tabela 12**). Kim et al. (2011) em ensaio clínico com pacientes com asma atópica persistente suplementados com 1 g de curcumina (cápsulas de curcumina - Sabinsa Corporation) duas vezes por dia por 6 meses, também não encontrou diferenças nos títulos de IgE específicas para *Dermatophagoides pteronyssinus* e *Dermatophagoides farinae* ao longo do tratamento.

Ao longo de todo o protocolo foram dosados os níveis séricos dos componentes C3 e C4, e nenhuma alteração foi observada nos seus valores em decorrência do uso ou da suspensão de tratamento experimental, sendo o C3 muito baixo desde antes do início do protocolo e C4 sempre dentro dos valores de normalidade. A introdução de hidroxiquina ao final do tratamento experimental também não afetou tais valores. As dosagens séricas de C2 e C1q foram realizadas apenas no momento inicial do protocolo (D1), uma vez que a deficiência desses componentes está relacionada à maior suscetibilidade a lúpus (Macedo, Isaac, 2016) (**Tabela 13**).

Avaliação dos auto-anticorpos foi realizada durante o tratamento experimental em três momentos distintos: pré tratamento, em uso de Theracurmin® 2 g (D10) e em uso de Theracurmin® 4 g (D113) para avaliar algum possível efeito do uso da curcumina sobre a autoimunidade. Foram investigados os auto-anticorpos: anti-C1q, anti-nucleossomo, anti-RNP, anti-Sm, anti-Ro, anti-La, IgG anti-cardiolipina, IgM anti-cardiolipina e FAN. O tratamento com Theracurmin® não afetou a positividade dos auto-anticorpos investigados, sendo que o anticorpo anti-C1q foi o único que apresentou variação dos seus títulos ao longo do tratamento (**Tabela 14**). Na literatura, a associação de imunodeficiência e autoimunidade já é bem estabelecida (Bussone, Mouthon, 2009). Turley et al. estudaram 77 pacientes deficientes em Complemento, e documentou que 37% dos pacientes com defeitos na Via Clássica apresentavam doença clínica semelhante a lúpus. A associação genética mais comumente relacionada a lúpus é a deficiência de componentes iniciais da Via Clássica, principalmente de C1q (90-93%), C1r / C1s (50-57%), C4 (75%) e de C2 (10%). Estes pacientes costumam apresentar lúpus em idade mais precoce, com sintomas graves e com pior prognóstico (revisado em Macedo, Isaac, 2016). Por

outro lado, a associação de lúpus com componentes da Via Alternativa do Complemento é extremamente rara. Para nosso conhecimento, existem apenas dois casos na literatura com a rara associação da deficiência de FH e lúpus (Fijen et al., 1996, Brai et al., 1988). Um dos casos trata-se de mulher caucasiana filha de pais não consanguíneos, com lúpus cutâneo subagudo, com FAN e anti-DNA positivos, C3 indetectável e sem atividade hemolítica documentada tanto pela Via Alternativa quanto pela Via Clássica. Seus níveis de C2 eram reduzidos, com concentrações séricas de C4 e C1q normais. Esta paciente, à semelhança do nosso, apresentava também aumento na concentração sérica da gamaglobulina, e até o período em que o caso fora publicado, aos 59 anos, não havia apresentado glomerulonefrite (Fijen et al, 1996). O outro caso trata-se de caucasiana filha de pais consanguíneos (primos de primeiro grau) com quadro de artrite, febre, eritema malar, anemia e nefrite, com FAN positivo e fluorescência intensa para IgG em núcleos de queratinócitos na biópsia de pele. A paciente tinha concentrações não detectáveis de FH, C3 e FB, apresentando também concentração de C2 de apenas 15% da referência de soro humano normal, e níveis também baixos de C1q e C4 com C1-INH normal (Brai et al, 1988). Estes dois casos relatados com deficiência de FH e lúpus, diferentemente do nosso, apresentavam também deficiência de componentes iniciais da Via Clássica, o que por si só, já justificaria uma possível associação a lúpus.

A avaliação da função renal foi feita pelo conjunto de exames: creatinina sérica, ureia sérica, relação proteína/creatinina e relação microalbuminúria/creatinina de amostra urinária isolada, urina I (sedimento urinário), beta-2 microglobulina urinária e concentração de NGAL em urina. Destes parâmetros, tanto a perda urinária de proteína como a microalbuminúria são marcadores de dano renal, sendo a microalbuminúria mais sensível e relacionada à lesão glomerular. A beta-2 microglobulina urinária é um marcador de proteinúria de origem tubular. A NGAL é um biomarcador de lesão renal, com sua expressão aumentada em células tubulares renais em decorrência de injúria renal aguda (Kuwabara et al., 2009). Apenas dois destes parâmetros se alteraram, ambos em apenas uma ocasião ao longo de todo o protocolo: a Urina I com hematúria e a beta-2 microglobulina urinária, ambos no D72, ocasião em que o paciente apresentava sinusite. A avaliação da NGAL, embora mantida dentro do valor de normalidade oferecido pelo *kit* ELISA, comparativamente obteve o maior valor durante todo o estudo também na mesma

ocasião D72. Os exames referentes ao D72 foram coletados previamente à administração da dose de 4 g de Theracurmin® para realização das coletas da curva de curcumina plasmática, sendo que os mesmos parâmetros foram repetidos após 12 h da dose da medicação, e caprichosamente, mostraram melhora da hematúria, normalização da beta-2 microglobulina urinária e diminuição da NGAL para um valor cerca de dez vezes menor (**Tabela 15**). Em estudo recente Khajehdehi et al. (2012) demonstrou que o uso de curcumina em pacientes com nefrite lúpica resultou em redução da proteinúria, da hematúria e da pressão arterial sistólica. Em modelo murino de lesão renal induzida por gentamicina, a curcumina foi capaz de reduzir a lesão renal através da melhora do estresse oxidativo e da redução de apoptose das células tubulares renais (He et al., 2015). Em outro modelo murino de doença renal crônica (nephrectomia 5/6), o tratamento com curcumina foi comparável ao enalapril na redução da ureia, creatinina plasmática e proteinúria, e da esclerose segmentar e dilatação tubular, diferindo significativamente apenas quanto ao controle da pressão arterial, melhor com enalapril (Ghosh et al., 2009)

5.1.2 Biópsia de pele pré- e pós-tratamento:

As biópsias de foram feitas em duas etapas. Foi biopsiada a lesão crônica de pele em região de tórax não submetida à exposição solar no início do protocolo e após término do tratamento experimental, para avaliação de resposta ao Theracurmin® (**Tabela 16**).

No lúpus eritematoso cutâneo crônico (LECC), a positividade da imunofluorescência na zona de membrana basal (ZMB) varia entre 60% e 90%, com IgG e IgM sendo os marcadores mais frequentes, tanto no padrão homogêneo, granuloso, como no reticulado. No lúpus eritematoso cutâneo subagudo, os achados são semelhantes aos do LECC, com positividade entre 54% e 100% dos casos, com fluorescência da ZMB geralmente granulosa. Também pode ocorrer a fluorescência dos núcleos dos queratinócitos, fenômeno que também é conhecida por FAN *in vivo* (Aoki et al, 2010). Embora a biópsia de pele característica não seja pontuada como um dos critérios diagnóstico para lúpus, a imunofluorescência realizada na biópsia de pele do paciente reforça o diagnóstico.

A amostra inicial para microscopia óptica teve pouca representatividade (apenas extrato córneo, sem epiderme, derme e hipoderme), comprometendo o laudo

diagnóstico e, da mesma maneira, prejudicando a atribuição de efeito positivo ou negativo ao tratamento experimental.

A avaliação por imunofluorescência, mostrou em biópsia inicial fluorescência reticulada intensa para IgM, contínua na ZMB, que pós-tratamento se apresentou como fluorescência granulosa moderada. A avaliação da imunofluorescência inicial para IgG mostrava fluorescência em núcleos de queratinócitos da epiderme, e fluorescência granulosa discreta e focal da ZMB, que no pós-tratamento apresentou-se como presença de fluorescência dos núcleos dos queratinócitos da epiderme, sem a descrição feita anteriormente relacionada com a fluorescência granulosa e da ZMB. Pode-se especular que tenha ocorrido uma melhora, ainda que discreta, na deposição de IgM e IgG na ZMB (**Tabela 16**).

Tabela 6 - Eletrólitos e gasometria.

Data	07/abr	17/jun	28/jul	20/ago	31/ago	24/out
Dia de protocolo	D1	D72	D113	D136	D147	D201
Sódio (136-145mEq/L)	143	140	137	139	141	141
Potássio (3,5-5,1mEq/L)	4,1	4,0	4,2	4,0	4,1	4,1
Cloro (98-107mEq/dL)	104	101	96	101	102	103
Cálcio (8,6-10mg/dL)	9,2	9,2	8,8	9,2	9,1	9,3
Fósforo (2,7-4,5mg/dL)	3,7	3,6	3,9	3,9	3,9	4,2
Magnésio (1,7-2,3mg/dL)	2,0	2,0	2,0	1,9	2,0	2,1
Cálcio iônico (1,2-1,38mmol/L)	1,17	1,15	1,10	1,14	NR	1,14
Ácido úrico (3,4-7mg/dL)	5,4	5,6	NR	5,8	5,6	5,7
pH venoso (7,32-7,43)	7,42	7,42	7,39	7,39	NR	7,40
pCO ₂ venoso (38-50mmHg)	39,9	40,1	46,3	42,9	NR	38,7
pO ₂ venoso (36-46mmHg)	49,9	47,1	43,3	46,7	NR	72,1
HCO ₃ venoso (22-29mmol/L)	25,2	25,2	25,9	24,6	NR	23,9
Base excess venoso (-3-3mmol/L)	1,2	1,3	2,8	0,9	NR	-0,6
SATO ₂ venoso (60-85%)	84,9	82,5	76,6	79,8	NR	93,7
Lactato venoso (4,5-14,4mg/dL)	13,0	20,0	20,0	19,0	NR	7,0

Dosagens de eletrólitos e gasometria no paciente ESY durante o tratamento com Theracurmin®. Em parênteses valores de referência e unidades de medida. NR: não realizado.

Tabela 7 - Concentração de proteína C-reativa no soro.

Data	07/abr	17/jun	28/jul	20/ago	31/ago	24/out
Dia de protocolo	D1	D72	D113	D136	D147	D201
Proteína C reativa (<5mg/dL)	2,18	5,11	1,87	0,9	2,77	1,08

Dosagens da concentração de proteína C-reativa no paciente ESY durante o tratamento com Theracurmin®. Em parênteses valores de referência e unidades de medida

Tabela 8 - Hemograma e plaquetas.

Data	07/abr	17/jun	08/jul	28/jul	20/ago	31/ago	24/out
Dia de protocolo	D1	D72	D93	D113	D136	D147	D201
Leucócitos (4,5-11mil/mm3)	6,56	7,03	5,21	7,1	5,64	5,03	5,48
Segmentados (45,5-69,5%)	47	63	48	67	58	50	44
Linfócitos (20,3-47%)	32	27	32	17	25	27	32
Monócitos (1,6-10%)	15	8	12	11	13	15	13
Eosinófilos (0-4,4%)	5	2	7	5	4	7	10
Basófilos (0,2-1,2%)	1	0	1	0	0	1	1
Plasmócitos (0%)	0	0	0	0	0	0	0
Linfócitos atípicos (0%)	0	0	0	0	0	0	0
Hemoglobina (13,5-17,5g/dL)	14,6	14,1	14,6	14,3	13,4	13,2	14,2
Hematócrito (41-53%)	41,8	40,9	41,6	41,5	39,1	38,7	41,1
Plaquetas (150-450mil/μL)	300	314	264	374	286	261	318

Avaliação do hemograma e plaquetas no paciente ESY durante o tratamento com Theracurmin®. Em parênteses valores de referência e unidades de medida.

Tabela 9 - Função hepática e perfil lipídico.

Data	07/abr	17/jun	28/jul	20/ago	31/ago	24/out
Dia de protocolo	D1	D72	D113	D136	D147	D201
TGO - transaminase oxalacética (15-40U/L)	16	21	15	31	29	17
TGP - transaminase pirúvica (10-40U/L)	18	23	21	40	29	15
Bilirrubina total (<1mg/dL)	0,64	0,7	0,36	0,43	0,54	0,62
Bilirrubina direta (<0,2mg/dL)	0,2	0,21	0,15	0,18	0,24	0,23
Bilirrubina indireta (<0,6mg/dL)	0,44	0,49	0,21	0,25	0,3	0,39
Gama glutamil transferase (2-30U/L)	22	27	20	18	18	16
Colesterol total (<150mg/dL)	133	126	127	134	119	131
Colesterol LDL (<100mg/dL)	87	82	79	80	75	82
Colesterol HDL (>45mg/dL)	42	41	47	48	46	52
Triglicérides (<100mg/dL)	91	89	107	103	86	62

Avaliação da função hepática e perfil lipídico no paciente ESY durante o tratamento com Theracurmin®. Em parênteses valores de referência e unidades de medida.

Tabela 10 - Concentrações séricas de proteínas totais, albumina e gamaglobulina.

Data	07/abr	17/jun	28/jul	20/ago	31/ago	24/out
Dia de protocolo	D1	D72	D113	D136	D147	D201
Proteínas totais (6,0 a 8,0 g/dL)	7,6	7,5	7,8	7,4	7,7	8,2
Albumina (3,2 a 5,0 g/dL)	3,9	3,9	3,9	3,8	4,1	4,4
Gamaglobulina (0,7 a 1,5 g/dL)	1,7	1,7	1,9	1,9	1,7	1,8

Dosagens das concentrações séricas de proteínas totais, albumina e gamaglobulina no paciente ESY durante o tratamento com Theracurmin®. Em parênteses valores de referência e unidades de medida.

Tabela 11 - Dosagens das classes de imunoglobulina IgE, IgA, IgM e IgG.

Data	07/abr	17/jun	28/jul	20/ago	31/ago	24/out
Dia de protocolo	D1	D72	D113	D136	D147	D201
Imunoglobulina E (até 100 UI/ml)	2375	1932	1686	1445	1584	1545
Imunoglobulina A (69-382mg/dL)	439,8	417,9	470,5	407,7	419,4	430,5
Imunoglobulina M (73-171mg/dL)	220,2	270,1	233,2	201,5	222,3	214,8
Imunoglobulina G (952-1538mg/dL)	1481	1355	1421	1355	1399	1390

Dosagens das classes de imunoglobulina IgE, IgA, IgM e IgG no paciente ESY durante o tratamento com Theracurmin®. Em parênteses valores de referência e unidades de medida.

Tabela 12 - Avaliação de IgE específica para barata, poeira, *Dermatophagoides farinae* e *Blomia tropicalis*.

Data	07/abr	16/abr	28/jul
Dia de protocolo	D1	D10	D113
Barata (< 0,35kU/L)	< 0,35	< 0,35	< 0,35
Poeira (< 0, 35kU/L)	> 100	> 100	> 100
<i>Dermatophagoides farinae</i> (< 0,35kU/L)	> 100	> 100	> 100
<i>Blomia tropicalis</i> (< 0,35kU/l)	5,4	5,1	4,5

Avaliação de IgE específica para barata, poeira, *Dermatophagoides farinae* e *Blomia tropicalis* no paciente ESY durante o tratamento com Theracurmin®. Em parênteses valores de referência e unidade de medida.

Tabela 13 - Concentrações séricas dos componentes C1q, C2, C3 e C4.

Data	07/abr	16/abr	17/jun	08/jul	28/jul	20/ago	31/ago	24/out
Dia de protocolo	D1	D10	D72	D93	D113	D136	D147	D201
C1q (100-250mg/dL)	389							
C2 (14-25mg/dL)	14,1							
C3 (67-149mg/dL)	<4	<4	<4	<4	5	<4	<4	<4
C4 (10-38mg/dL)	26,7	23,3	26,3	22,9	27,8	18,8	19,8	21,4

Dosagens das concentrações séricas de C1q e C2. Avaliação das concentrações séricas de C3 e C4 no paciente ESY durante o tratamento com Theracurmin®. C1q dosado por imunonefelometria. C2 dosado por imunodifusão radial. C3 e C4 dosados por método imunoturbidimétrico. Em parênteses valores de referência e unidades de medida.

Tabela 14 - Avaliação dos auto-anticorpos.

Data	07/abr	16/abr	28/jul
Dia de protocolo	D1	D10	D113
FAN (não reagente)	1/640 pontilhado grosso núcleo	1/640 pontilhado grosso núcleo	1/640 pontilhado grosso núcleo
Anti-DNA (< 1,0)	NR	NR	NR
Anti-C1q (< 9,0 U/mL)	32	32,5	38,5
Anti-nucleossomo (< 20 U)	NR	NR	NR
Anti-RNP (não reagente)	reagente 1/6400	reagente 1/6400	reagente 1/6400
Anti-SM (não reagente)	NR	NR	NR
Anti-Ro (não reagente)	Reagente	Reagente	reagente
Anti-La (não reagente)	NR	NR	NR
IgG anti-cardiolipina (< 10 U GPL)	NR	NR	NR
IgM anti-cardiolipina (< 10 U MPL)	NR	NR	NR

Avaliação dos auto-anticorpos no paciente ESY durante o tratamento com Theracurmin®. Em parênteses valores de referência e unidades de medida (quando aplicável). Abreviações: U (unidades), NR (não reagente).

Tabela 15 - Avaliação da função renal.

Data	07/abr	17/jun	17/jun	08/jul	28/jul	20/ago	31/ago	24/out
Dia de protocolo	D1	D72	D72	D93	D113	D136	D147	D201
Creatinina sérica (0,70 - 1,20mg/dL)	0,79	0,97	NR	0,85	0,88	0,87	0,85	0,8
Ureia sérica (13 - 43mg/dL)	18	26	NR	21	22	25	27	25
Densidade U (1003 - 1029)	1020	1020	1008	1028	1020	1020	1015	1020
pH U (4,50 - 7,80)	6	6,5	7	6	6	6	6	5
Leucócitos na urina (0 - 7.000)	0	5.000	1.000	5.000	1.000	3.000	1.000	1.000
Eritrócitos na urina (0 - 3.000)	0	160.000	21.000	1.000	1.000	0	0	500
Proteinúria/CrU (0,06 - 0,35 g/g)	0,1	0,11	0,08	0,07	0,06	0,11	NR	0,07
Microalbuminúria/CrU (até 30 mg/g)	9,2	9,61	6,35	12,03	6,58	5,13	NR	5,69
B₂ microglobulina U (<0,3µg/mL)	NR	1,3	0,2	0,3	0,2	0,2	0,09	NR
NGAL U	7,614	20,84	2,364	5,557	6,692	2,725	2,191	NR

Avaliação da função renal e sedimento urinário no paciente ESY durante o tratamento com Theracurmin®. À esquerda coluna com os parâmetros avaliados e em parênteses valores de referência e unidade de medida. Abreviações: U (urinário), Cr (creatinina), B₂ microglobulina (beta₂ microglobulina). NGAL U: valores de referência do *kit* (média 9,4 ng/ml; variação 0,40-72 ng/ml; desvio padrão ± 17,1 ng/ml, colhidos de 19 indivíduos, sem recordatório médico). NR: não realizado.

Tabela 16 - Biópsia de pele analisada por microscopia óptica e imunofluorescência, pré- e pós-tratamento.

Biópsia de pele		Pré tratamento experimental (D1)	Pós tratamento experimental (D136)
Microscopia óptica	camada córnea	paraqueratose	paraqueratose
	epiderme	NR	hiperplasia psoriasiforme e discreta espongiose
	Derme	NR	infiltrado linfomononuclear perivascular e perianexial
Imunofluorescência	anti-IgA	ausente	ausente
	anti-IgM	reticulada intensa contínua na ZMB	granulosa moderada contínua na ZMB
	anti-IgG	granulosa focal discreta na ZMB núcleos de queratinócitos da epiderme	núcleos dos queratinócitos da epiderme
	anti-C3	ausente	Ausente

Biópsia de pele analisada por microscopia óptica e imunofluorescência, pré- e pós-tratamento com Theracurmin® no paciente ESY com Theracurmin®. Abreviações: NR, material não representado na biópsia; ZMB, zona da membrana basal.

5.1.3 Avaliação cardiovascular

Em todas os atendimentos a pressão arterial do paciente foi verificada e manteve-se dentro da normalidade (abaixo do percentil 50) durante todo o protocolo, independente do uso da medicação. Também foi realizada avaliação do paciente com ecocardiograma bidimensional com mapeamento por fluxo em cores, com todos os parâmetros avaliados dentro da normalidade.

5.1.4 Avaliação articular

O paciente apresentou episódio de artralgia em cotovelo direito no D97, antecedendo os sintomas de infecção viral por caxumba. Realizado USG articular do cotovelo na vigência dos sintomas, que documentou sinovite da articulação com pequeno derrame articular, com espessamento sinovial nas fossas olecranianas e com bolsa olecraniana de aspecto normal. Para avaliar a existência de alterações crônicas, foi realizado Raio-X de cotovelos no período, evidenciando textura óssea normal, com espaços articulares preservados, superfícies articulares regulares e congruentes e ausência de lesões focais. Em associação com a história clínica pregressa e os dados de USG, esses achados caracterizam artrite aguda recorrente, sem sequela ou lesão permanente. O uso da curcumina não evitou os episódios de artrite e também não modificou o padrão habitual de evolução do quadro, quando comparado aos episódios reportados pelo paciente antes do início do protocolo. Este resultado do paciente ESY foi diferente do encontrado em população com artrite reumatoide ativa tratada com curcumina, onde houve evidência de melhora da dor e do edema nestes pacientes (Chandran, Goel, 2012; Amalraj et al., 2017).

5.1.5 Avaliação oftalmológica

Considerando que a deficiência de FH afeta a regulação da Via Alternativa, e que esta desregulação oferece risco potencial para doença macular, o paciente foi submetido à avaliação oftalmológica. Foram achados da avaliação: segmento anterior normal, sem retinite. Fundo de olho normal, sem alteração pigmentar da retina, sendo esta a única avaliação oftalmológica do paciente ao longo do protocolo.

5.1.6 Avaliação pelo *Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index* (SLEDAI) e o tratamento experimental

Considerando o paciente portador de lúpus, e com a intenção de avaliar se a curcumina interferiu na atividade da doença, baseado no registro das avaliações durante o protocolo, aplicou-se o instrumento de avaliação SLEDAI (**Anexo C**) (Gladman et al., 2002). Este instrumento gera um escore que pontua os sintomas recentes com finalidade de medir da atividade da doença de forma sistematizada. Seu escore varia de zero a 105 pontos, contemplando os sintomas clínicos e alterações laboratoriais no lúpus. A avaliação do paciente, desde o momento inicial e ao longo de todo o protocolo, oscilou entre quatro e oito pontos, atribuíveis aos níveis baixos de C3 (que de fato se deve à deficiência de FH), ao eritema malar e à hematúria (não sendo pontuada a artrite, uma vez que pelo critério são necessárias duas ou mais articulações acometidas no mesmo momento). A maior pontuação coincidiu com o episódio de sinusite (D72), única ocasião em que o paciente apresentou hematúria. Concluiu-se portanto, que tanto a introdução da curcumina como a suspensão do tratamento experimental não interferiu no escore SLEDAI do paciente.

5.1.7 Avaliação da Qualidade de Vida com o tratamento experimental

A percepção da qualidade de vida determinada pelo instrumento *Pediatric Quality of Life Inventory 4.0* (PedsQL 4.0) (**Anexos D e E**) foi avaliada nas ocasiões pré-tratamento (D1), durante tratamento com Theracurmin® 4 g de 12 em 12 h (D136), e após suspensão de Theracurmin® e já em tratamento com hidroxiclороquina por 54 dias (D201). Os 23 itens do questionário foram registrados e comparados nos três momentos, sendo definido a melhor qualidade de vida relacionada a menor pontuação. Na visão do paciente sobre sua qualidade de vida, a pontuação somou 11, 15 e 4 nos respectivos momentos D1, D136 e D201 (**Figura 10**), em geral, mais otimista que a visão paterna, com soma de 17, 19 e 2 nos mesmos momentos (**Figura 11**). Dos quatro domínios abordados: saúde e disposição física, aspectos emocionais, aspectos sociais, e desempenho escolar, o que apresentou maior impacto na percepção de qualidade de vida foram os itens relacionados à saúde e disposição física. A avaliação pelo instrumento PedsQL 4.0 mostrou melhora significativa da qualidade de vida após introdução da hidroxiclороquina, com escores

melhores do que os encontrados antes mesmo do início do protocolo de tratamento experimental com curcumina.

Figura 10 - Avaliação da qualidade de vida: PedsQL paciente.

Avaliação da qualidade de vida global na perspectiva do paciente pelo instrumento PedsQL: antes (D1) e durante (D136) o tratamento com Theracurmin® e após suspensão do mesmo e já em tratamento com Hidroxicloroquina (D201).

Figura 11 - Avaliação da qualidade de vida: PedsQL genitor.

Avaliação da qualidade de vida global na perspectiva do genitor pelo instrumento PedsQL: antes (D1) e durante (D136) o tratamento com Theracurmin® e após suspensão do mesmo e já em tratamento com Hidroxicloroquina (D201).

5.2 Determinação da concentração plasmática da curcumina, curcumina e tetrahidrocurcumina glicorunidade.

A curva de concentração da curcumina plasmática foi determinada no D1 após ingestão de 2 g de Theracurmin® (**Figura 12**). Os tempos de coleta foram realizados imediatamente antes da dose e com 30 min, 60 min, 90 min, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h e 24 h pós-dose. O mesmo procedimento foi repetido no D72 com dose de 4 g, sem interrupção prévia do uso de Theracurmin®, na ocasião do protocolo com o paciente em uso de 2 g de 12 em 12 h. Os resultados obtidos para a primeira curva com 2 g de Theracurmin® foram consistentemente maiores que os resultados obtidos na segunda curva com dose de 4 g (**Figura 12**). Esse efeito até então inesperado não havia sido estudado na literatura, pois as curvas de farmacocinética e farmacodinâmica reportadas com escalonamento de dose em voluntários saudáveis foram realizadas com período de *washout* entre as curvas, e sem uso crônico e regular de Theracurmin® (Kanai et al., 2012).

Figura 12 - Níveis plasmáticos de curcumina após ingestão de 2 g e 4 g de Theracurmin®.

Determinação dos níveis plasmáticos da curcumina após 2 g de Theracurmin® (curva azul) e 4 g de Theracurmin® (curva vermelha). Os tempos de coleta foram realizados imediatamente antes da dose e com 30 min, 60 min, 90 min, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h e 24 h pós-dose.

Esta aparente incongruência foi analisada em busca de respostas que explicassem porquê o aumento da dose ingerida (no caso o dobro da dose) não levava ao aumento correspondente do nível sérico detectado de curcumina. Considerando o

metabolismo da curcumina reportado na literatura, parte dela é metabolizada pela enzima álcool-desidrogenase (Hoehle et al., 2006; Kurita, Makino, 2013; Sueth-Santiago et al., 2015; Douglass, Cloutre, 2015). Este achado de diminuição da curcumina plasmática apesar do aumento da dose de Theracurmin® poderia corresponder a um efeito de indução enzimática e tolerância, com aceleração do metabolismo da droga ao longo do tempo, a exemplo do que ocorre com bebidas alcoólicas (Tabakoff et al., 1986). Nas suas vias metabólicas, tanto a curcumina quanto a suas principais formas reduzidas (dihidrocurcumina, tetrahydrocurcumina e hexahidrocurcumina), podem sofrer glicorunidação (**Figura 7**). No intuito de esclarecer tal fenômeno, foram avaliadas também a curcumina e a tetrahydrocurcumina tratadas com glicorunidade no D1 após ingestão de 2 g (**Figura 13**) e 4 g de Theracurmin® (**Figura 14**) nas mesmas amostras de coleta realizada imediatamente antes da dose e com 30 min, 60 min, 90 min, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h e 24 h pós-dose.

Figura 13 - Níveis plasmáticos de curcumina, e de curcumina e tetrahydrocurcumina tratadas com glicorunidade, após ingestão de 2 g de Theracurmin®.

Determinação dos níveis plasmáticos de curcumina, e de curcumina (Cur) e tetrahydrocurcumina (THC) tratadas com glicorunidade, após 2 g de Theracurmin®. Os tempos de coleta foram realizados imediatamente antes da dose e com 30 min, 60 min, 90 min, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h e 24 h pós-dose.

O resultado comparativo das Figuras 13 e 14 reforçam a hipótese de que o nível plasmático de curcumina durante o uso crônico poderia estar diminuído por indução metabólica. Ao somar as frações encontradas, conseguiu-se estabelecer uma

correspondência entre dose administrada e o nível plasmático, sendo a fração predominante responsável por este efeito a tetrahydrocurcumina (**Figura 15**).

Figura 14 - Níveis plasmáticos de curcumina, e de curcumina e tetrahydrocurcumina tratadas com glicorunidade, após ingestão de 4 g de Theracurmin®.

Determinação dos níveis plasmáticos de curcumina, e de curcumina (Cur) e tetrahydrocurcumina (THC) tratadas com glicorunidade, após 4 g de Theracurmin®. Os tempos de coleta foram realizados imediatamente antes da dose e com 30 min, 60 min, 90 min, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h e 24 h pós-dose.

Figura 15: Níveis plasmáticos somados de curcumina, e de curcumina e tetrahydrocurcumina tratadas com glicorunidade, após ingestão de 2 g e 4 g de Theracurmin®.

Curva representativa dos níveis plasmáticos somados de: curcumina, e curcumina e tetrahydrocurcumina tratadas com glicorunidade após 2 g de Theracurmin® (curva azul) e 4 g de Theracurmin® (curva vermelha). Os tempos de coleta foram realizados imediatamente antes da dose e com 30 min, 60 min, 90 min, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h e 24 h pós-dose.

A metodologia para avaliação da indução de atividade enzimática induzida pelo uso crônico da curcumina está sendo desenvolvida no Laboratório de Integração de Sistemas Biológicos do ICB por Dr. Júlio Ferreira.

5.3 Determinação das concentrações séricas de FH, FB e C3

A quantificação de FH, FB e C3 no soro do paciente foi realizada de forma pareada nos momentos de avaliação da curva plasmática de curcumina, durante o tratamento em si e após sua interrupção.

5.3.1 FH

Analisando por ELISA, a detecção de FH no soro após a administração de 2 g e 4 g Theracurmin® (**Figura 16**) não aumentou, apesar da presença de curcumina e seus metabólitos no plasma.

Figura 16 - Quantificação de FH após ingestão de 2 g e 4 g de Theracurmin®.

Determinação dos níveis séricos de FH após 2 g de Theracurmin® (curva azul) e 4 g de Theracurmin® (curva vermelha). Os tempos de coleta foram realizados imediatamente antes da dose e com 30 min, 60 min, 90 min, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h e 24 h pós-dose.

Tal fato poderia ser eventualmente justificado, considerando que no experimento *in vitro*, a curcumina foi utilizada “pura” e não metabolizada, sem o efeito de glicorunidação e redução da curcumina que ocorre *in vivo*. No experimento *in vitro*

(Albuquerque et al 2012) fora utilizada a curcumina (Sigma-Aldrich) na concentração de 2 μM na cultura de fibroblastos do paciente, estimulados com Interferon gama. Dessa maneira, *in vitro* as concentrações alcançadas de curcumina são muito maiores, não realizáveis *in vivo*, uma vez que ela é instável em condições fisiológicas e rapidamente metabolizada a outros produtos, possivelmente sem a mesma ação chaperona. Esses resultados obtidos, considerando um possível efeito de indução do metabolismo e tolerância à droga, pela comparação entre a primeira e segunda curvas de curcumina, frustrou o que se esperaria de um efeito dose dependente da curcumina para essa mutação estudada *in vivo*.

5.3.2 FB

A análise da concentração sérica de FB (**Figura 17**), não apresentou aumento significativo de sua concentração no soro ou correlação com a curva sérica de FH nos tempos avaliados. O valor de referência para FB reportado pelo *kit* utilizado é 200 $\mu\text{g/ml}$.

Figura 17 - Quantificação de FB após ingestão de 2 g e 4 g de Theracurmin®.

Determinação dos níveis séricos de FB após 2 g de Theracurmin® (curva azul) e 4 g de Theracurmin® (curva vermelha). Os tempos de coleta foram realizados imediatamente antes da dose e com 30 min, 60 min, 90 min, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h e 24 h pós-dose.

5.3.3 Concentração sérica de C3

As dosagens de C3 obtidas no laboratório clínico (Laboratório Central do HCFMUSP pelo método imunoturbidimétrico) após ingestão de 2 g e 4 g de Theracurmin® e ao longo de todo o experimento se mantiveram baixas, com valores oscilando entre < 4 mg/dl a 5 mg/dl, (valores de referência do método 67-149 mg/dl). Os resultados obtidos por ELISA também estiveram todos abaixo do nível de detecção do método.

5.4 Avaliação da secreção de FH por *Western Blot*

Ao analisar a presença de FH no soro do paciente por *Western Blot* nos mesmos tempos da realização da curva plasmática de curcumina após administração de 2 g ou 4 g de Theracurmin® não observamos aumento da secreção de FH (**Figura 18 e 19**) em função do tratamento.

Considerando as amostras de soro coletadas ao longo do tratamento nos tempos D10 e D93 (uso de 2 g de Theracurmin® de 12 em 12 h), D113, D136 (uso de 4 g de Theracurmin® de 12 em 12 h), e após sua suspensão em D147 (onze dias sem tratamento) e D201 (em uso de hidroxiclороquina), observamos algumas diferenças discretas quanto à intensidade da banda correspondente a FH (~150 kDa). No entanto foram inconclusivas, uma vez que o *Western Blot* é apenas um método qualitativo (**Figuras 18 e 19**). Ao quantificar a concentração de FH por ELISA – um método mais preciso – também não constatamos aumento na concentração deste regulador em função do tratamento com Theracurmin. O mesmo foi observado com os níveis séricos de C3 e FB. Em outras palavras, este tratamento não corrigiu a deficiência anteriormente descrita e nem conseguiu demonstrar o aumento do FH mutante.

Figura 18 - Análise da presença de FH no soro do paciente por *Western Blot*, em coleta seriada realizada após ingestão de 2 g e ao longo do tratamento com Theracurmin®.

Análise realizada em amostras de soros coletado simultaneamente à curva plasmática da curcumina, após ingestão de 2g de Theracurmin®, nos tempos realizados imediatamente antes da dose e com 30 min, 60 min, 90 min, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h e 24 h pós-dose. Amostra comparativa de soro do paciente de 2003. Amostras D10 e D93, correspondentes aos dias do protocolo durante tratamento com 2g de Theracurmin® de 12 em 12 h. Diluição de soro do paciente 1:300. FH: proteína purificada comercial. SHN: soro humano normal em diluição de 1:800.

Figura 19 - Análise da presença de FH no soro do paciente por *Western Blot*, em coleta seriada realizada após ingestão de 4 g e ao longo do tratamento com Theracurmin®.

Análise realizada em amostras de soros coletado simultaneamente à curva plasmática da curcumina, após ingestão de 4 g de Theracurmin®, nos tempos realizados imediatamente antes da dose e com 30 min, 60 min, 90 min, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h e 24 h pós-dose. Amostras D113 e D136, correspondentes aos dias do protocolo durante tratamento com 4 g de Theracurmin® de 12 em 12 h. Amostra D147, onze dias após suspensão de Theracurmin® e D201, amostra em uso regular de hidroxicloroquina. Diluição de soro do paciente 1:300. FH: proteína purificada comercial. SHN: soro humano normal em diluição de 1:800.

5.5 Avaliação do perfil de citocinas durante o tratamento experimental

As concentrações das citocinas IL-1beta, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 e TNF-alfa foram avaliadas pré-tratamento e após 10 dias em uso regular de Theracurmin® (**Tabela 17**). Foi encontrada uma queda notável na concentração sérica de IL-6 e uma redução de cerca de 20% na IL-8. A IL-1beta, pelo contrário, apresentou aumento de mais de 50%, seguida por aumentos mais discretos das concentrações de TNF-alfa, IL-10, IL-12p70. Estes resultados concordam apenas em parte com a literatura onde é descrita a redução das concentrações séricas de citocinas inflamatórias IL-1, IL-2, IL-5, IL-6, IL-8, IL12, IL-18 e TNF-alfa com uso de curcumina (Goel et al., 2008).

Tabela 17 - Dosagens das citocinas no tratamento com Theracurmin®.

Data	07/abr	16/abr
Dia protocolo	D1	D10
IL-1 β	1188,12	1881,83
IL-6	297,34	68,45
IL-8	4008,26	3103,43
IL-10	1002,44	1183,36
IL-12p70	506,43	552,60
TNF-alfa	1090,97	1376,98

Dosagens das citocinas antes do início do tratamento experimental no D1 e após 10 dias de uso regular de 2 g de Theracurmin® de 12 em 12 h no D10.

As concentrações séricas das citocinas IL-1beta, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 e TNF-alfa também foram avaliadas de forma seriada após ingestão de dose de 2 g e 4 g de Theracurmin® (**Figuras 20-25**). A primeira avaliação realizada após ingestão de 2 g de Theracurmin®, não mostrou alteração significativa nas concentrações séricas das citocinas IL-1beta, IL-10 e TNF-alfa dosadas ao longo das 24h (**Figuras 20, 23 e 25**). A avaliação após ingestão de dose de 4 g de Theracurmin®, foi realizada no D72 (ocasião em que o paciente se encontrava com sinusite), sem interrupção do uso prévio de 2 g de Theracurmin® de 12 em 12 h. Nesta ocasião, os níveis mais altos das citocinas inflamatórias no momento imediatamente antes da dose de 4 g de Theracurmin® são compatíveis com a presença de quadro

infeccioso apresentado pelo paciente (**Figuras 20 - 25**). Neste momento (D72), a dose de 4 g provocou redução notável nas concentrações séricas das IL-6 e IL-10 (**Figura 21 e 23**), com redução mais modesta das IL-1beta, IL-12p70 e TNF-alfa (**Figura 20, 24, 25**), sem redução da IL-8 (**Figura 22**). Em meta-análise de nove trabalhos randomizado e controlados, a IL-6 foi reduzida pelo tratamento com curcumina, sendo esse efeito mais evidente quanto maior o estado inflamatório (Derosa et al., 2016), o que pode ser observado na **Figura 21**. O efeito da curcumina também foi avaliado para TNF-alfa, em meta-análise de oito trabalhos randomizados e controlados, mostrando que as concentrações séricas dessa citocina inflamatória foram reduzidas pela suplementação de curcumina (Sahebkar et al., 2016).

Figura 20 - Concentrações séricas de IL-1 β após ingestão de Theracurmin®.

Determinação das concentrações séricas de IL-1 β após 2 g de Theracurmin® (curva azul) no D1 e 4 g de Theracurmin® (curva vermelha) no D 72, ocasião em que o paciente estava com sinusite. Os tempos de coleta foram realizados imediatamente antes da dose e com 30 min, 60 min, 90 min, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h e 24 h pós-dose.

Figura 21 - Concentrações séricas de IL-6 após ingestão de Theracurmin®.

Determinação das concentrações séricas de IL-6 após 2 g de Theracurmin® (curva azul) no D1 e 4 g de Theracurmin® (curva vermelha) no D 72, ocasião em que o paciente estava com sinusite. Os tempos de coleta foram realizados imediatamente antes da dose e com 30 min, 60 min, 90 min, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h e 24 h pós-dose.

Figura 22 - Concentrações séricas de IL-8 após ingestão de Theracurmin®.

Determinação das concentrações séricas de IL-8 após 2 g de Theracurmin® (curva azul) no D1 e 4 g de Theracurmin® (curva vermelha) no D 72, ocasião em que o paciente estava com sinusite. Os tempos de coleta foram realizados imediatamente antes da dose e com 30 min, 60 min, 90 min, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h e 24 h pós-dose.

Figura 23 - Concentrações séricas de IL-10 após ingestão de Theracurmin®.

Determinação das concentrações séricas de IL-10 após 2g de Theracurmin® (curva azul) no D1 e 4g de Theracurmin® (curva vermelha) no D 72, ocasião em que o paciente estava com sinusite. Os tempos de coleta foram realizados imediatamente antes da dose e com 30 min, 60 min, 90 min, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h e 24 h pós-dose.

Figura 24 - Concentrações séricas de IL-12p70 após ingestão de Theracurmin®.

Determinação das concentrações séricas de IL-12p70 após 2 g de Theracurmin® (curva azul) no D1 e 4 g de Theracurmin® (curva vermelha) no D 72, ocasião em que o paciente estava com sinusite. Os tempos de coleta foram realizados imediatamente antes da dose e com 30 min, 60 min, 90 min, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h e 24 h pós-dose.

Figura 25 - Concentrações séricas de TNF-alfa após ingestão de Theracurmin®.

Determinação das concentrações séricas de TNF-alfa após 2 g de Theracurmin® (curva azul) no D1 e 4 g de Theracurmin® (curva vermelha) no D 72, ocasião em que o paciente estava com sinusite. Os tempos de coleta foram realizados imediatamente antes da dose e com 30 min, 60 min, 90 min, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h e 24 h pós-dose.

Este trabalho se propôs a relacionar dose e efeito da curcumina, por meio de método objetivo, correlacionando os resultados encontrados com o nível plasmático da “droga”. Esta correlação foi avaliada diretamente com as concentrações séricas de FH, FB, C3, IL-1beta, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 e TNF-alfa, realizada de forma pareada com os tempos de avaliação da curva plasmática de curcumina, e posteriormente ao longo do tratamento. Também foram avaliados ao longo do protocolo a repercussão do tratamento sobre os índices hematimétricos, proteína C-reativa, função hepática e renal, perfil de proteínas e classe de imunoglobulinas, títulos de auto-anticorpos e biopsia de pele do paciente. Na avaliação inicial, foram percebidos sinais clínicos sugestivos de doença reumatológica, que resultaram em investigação clínica e laboratorial com diagnóstico de lúpus, prévio ao tratamento experimental. Houve o cuidado de avaliar e monitorar o paciente quanto ao grau de atividade da doença, que permaneceu baixo ao longo de todo tratamento, não oferecendo risco ao paciente. Outro cuidado ao longo do protocolo foi acrescentar parâmetro de avaliação subjetivo pelo próprio paciente, através da aplicação de

questionário sobre qualidade de vida. Embora este estudo não possa ser extrapolado para outras condições clínicas, trata-se de estudo translacional, em paciente com mutação rara, motivo de estudo prévio *in vitro* pelo grupo. O estudo atual possibilitou aplicar os conhecimentos pregressos adquiridos do estudo *in vitro*, e aplicá-los *in vivo*, com amplo cuidado e suporte ao paciente. Porém, não foi comprovado *in vivo* o efeito previamente relatado *in vitro* de que a curcumina facilita o transporte do FH mutante para fora da célula, não sendo detectado aumento deste no soro do paciente por *Western Blot* ou por ELISA. Os valores alcançados de FH foram muito baixos e insuficientes para aumentar a concentração de C3 e normalizar a Via Alternativa do paciente, não oferecendo benefício suficiente para que o tratamento fosse mantido. Contudo, este trabalho abre caminho para investigação e estudo em outras doenças de mal dobramento proteico que possam eventualmente responder de forma mais positiva à curcumina e talvez seus metabólitos. Este estudo também abre o questionamento sobre a questão dose e efeito, considerando que não basta simplesmente aumentar a dose de curcumina, sem a consideração sobre biodisponibilidade, indução de metabolismo e metabólito ativo para o alvo terapêutico em questão. A literatura traz nos últimos anos um grande corpo de informação sobre o assunto, mas há que se considerar: *in vitro* temos uma situação artificial onde não há participação de outros sistemas do metabolismo humano; o metabolismo murino pode não se equipar ao metabolismo humano para diversas doenças, os ensaios clínicos usam diferentes apresentações modificadas do que hoje se chama curcumina e não necessariamente comparam o nível sérico da curcumina e/ou seus metabólitos com o resultado analisado, sendo portanto na sua maioria, não comparáveis. O estudo ofereceu grande desafio, pois se trata de paciente único, adolescente, que mesmo sem relato de efeitos colaterais ou intolerância à Theracurmin®, apresentou variáveis não controláveis como períodos de má aderência ao tratamento e infecções agudas, com possível repercussão nos resultados.

6 CONCLUSÕES

- O paciente tem uma associação extremamente rara de doenças: lúpus e deficiência homozigota do FH.
- O tratamento experimental foi bem tolerado pelo paciente, sem relato de efeitos adversos tanto com 2 g, como com 4 g de Theracurmin®, em uso contínuo em um total de 136 dias.
- O paciente não apresentou alteração de seus eletrólitos, índices hematimétricos, função hepática e perfil lipídico ao longo do tratamento.
- Foi identificado aumento na concentração de gamaglobulina no paciente antes mesmo do tratamento experimental, com as classes de imunoglobulinas IgA, IgM e IgE aumentadas, sendo esta última muito acima dos valores de referência, compatível também com o quadro alérgico pregresso descrito pelo paciente. Ao longo do tratamento houve queda significativa da concentração de IgE, porém ainda mantendo valores muito acima da normalidade, e não houve impacto do tratamento sobre as concentrações de IgA e IgM.
- Apesar da queda da concentração sérica de IgE total, não houve alteração da positividade de IgE específica contra poeira, *Dermatophagoides farinae* e *Blomia tropicalis* ao longo do tratamento.
- A função renal do paciente permaneceu preservada, com episódio isolado de hematúria e proteinúria tubular durante quadro clínico de sinusite, sendo revertidas as alterações urinárias, coincidentemente 12 h após ocasião em que recebera 4 g de Theracurmin®.
- Na mesma ocasião, a dose de 4 g provocou redução das interleucinas IL-6, e IL-10, e redução mais modesta das interleucinas IL-1beta, IL-12p70 e TNF-alfa.
- O tratamento experimental não apresentou impacto nos títulos de auto-anticorpos e nem piora do grau de atividade do lúpus ao longo de todo acompanhamento.
- O tratamento com Theracurmin® foi insuficiente para alterar os níveis séricos de FH no paciente ou para normalização de C3 e FB.
- Na percepção do paciente, o tratamento não ofereceu benefício na qualidade de vida em relação ao período pré-tratamento, com maior peso no âmbito da disposição para atividades físicas.

REFERÊNCIAS*

Aggarwal BB, Deb L, Prasad S. Curcumin differs from tetrahydrocurcumin for molecular targets, signaling pathways and cellular responses. *Molecules*. 2014 Dec 24;20(1):185-205.

Albuquerque JA, Lamers ML, Castiblanco-Valencia MM, Dos Santos M, Isaac L. Chemical chaperones curcumin and 4-phenylbutyric acid improve secretion of mutant factor H R127H by fibroblasts from a factor H-deficient patient. *J Immunol*. 2012;15;189(6):3242-8.

Alpers CE. Membranoproliferative glomerulonephritis. In: Kumar V, Abbas AK, Fausto N (eds). *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*, 7th edn. Philadelphia: Elsevier Saunders: 2005. p. 984-6.

Amalraj A, Varma K, Jacob J, Divya C, Kunnumakkara AB, Stohs SJ, Gopi S. A Novel Highly Bioavailable Curcumin Formulation Improves Symptoms and Diagnostic Indicators in Rheumatoid Arthritis Patients: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Two-Dose, Three-Arm, and Parallel-Group Study. *J Med Food*. 2017 Oct;20(10):1022-30

Anfinsen CB. Principles that govern the folding of protein chains. *Science*. 1973;181:223-30.

Aoki V, Sousa Jr JX, Fukumori LMI, Périgo AM, Freitas EL, Oliveira ZNP. Imunofluorescência direta e indireta. *An. Bras. Dermatol*. 2010;85(4):490-500.

Aslam M, Perkins SJ. Folded-back solution structure of monomeric factor H of human complement by synchrotron X-ray and neutron scattering, analytical ultracentrifugation and constrained molecular modelling. *J Mol Biol*. 2001;309:1117–38.

Athanasίου Y1, Voskarides K, Gale DP, Damianou L, Patsias C, Zavros M, Maxwell PH, Cook HT, Demosthenous P, Hadjisavvas A, Kyriacou K, Zouvani I, Pierides A, Deltas C. Familial C3 glomerulopathy associated with CFHR5 mutations: clinical characteristics of 91 patients in 16 pedigrees. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol*. 2011;6:1436-46.

*De acordo com:

International Committee Of medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical Journals. [2011 Jul 15]. Available from: <http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniformrequirements.html>

Barilla-LaBarca ML, Atkinson JP. Rheumatic syndromes associated with complement deficiency. *Curr Opin Rheumatol*. 2003;15:55-60.

Bhattad S, Rawat A, Gupta A, Suri D, Garg R, de Boer M, Kuijpers TW, Singh S. Early Complement Component Deficiency in a Single-Centre Cohort of Pediatric Onset Lupus. *J Clin Immunol*. 2015;35(8):777-85.

Blackmore TK, Sadlon TA, Ward HM, Lublin DM, Gordon DL. Identification of a heparin binding domain in the seventh short consensus repeat of complement factor H. *J Immunol*. 1996;157(12):5422-7.

Blackmore TK, Hellwage J, Sadlon TA, Higgs N, Zipfel PF, Ward HM, Gordon DL. Identification of the second heparin-binding domain in human complement factor H. *J Immunol*. 1998;160(7):3342-8.

Brai M, Misiano G, Maringhini S, Cutaja I, Hauptmann G. Combined homozygous factor H and heterozygous C2 deficiency in a Italian family. *J Clin Immunol*. 1988;8:50–6.

Bussone G, Mouthon L. Autoimmune manifestations in primary immune deficiencies. *Autoimmunity Reviews*. 2009;8:332-36.

Carreno MP, Labarre D, Maillet F, Jozefowicz M, Kazatchkine MD. Regulation of the human alternative complement pathway: formation of a ternary complex between factor surface-bound C3b and chemical groups on nonactivating surfaces. *Eur J Immunol*. 1989;19:2145–50.

Carroll RE, Benya RV, Turgeon DK, Vareed S, Neuman M, Rodriguez L, Kakarala M, Carpenter PM, McLaren C, Meyskens FL Jr, Brenner DE. Phase IIa clinical trial of curcumin for the prevention of colorectal neoplasia. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2011;4(3):354-64.

Chandran B, Goel A. A randomized, pilot study to assess the efficacy and safety of curcumin in patients with active rheumatoid arthritis. *Phytother Res*. 2012;26(11):1719-25.

Chen CB and Wallis R. Two mechanisms for mannose-binding protein modulation of the activity of its associated serine proteases. *J. Biol. Chem*. 2004;279, 26058–65.

Chen Q, Müller D, Rudolph B, Hartmann A, Kuwertz-Bröking E, Wu K, Kirschfink M, Skerka C, Zipfel PF. Combined C3b and factor B autoantibodies and MPGN type II. *N. Engl. J. Med.* 2011;365:2340–42.

Choi JH, Park DJ, Kang JH, Yim YR, Lee KE, Lee JW, Wen L, Kim TJ, Park YW, Lee JK, Lee SS. Comparison of clinical and serological differences among juvenile-, adult-, and late-onset systemic lupus erythematosus in Korean patients. *Lupus.* 2015;24:1342-49.

Clark SJ, Ridge LA, Herbert AP, Hakobyan S, Mulloy B, Lennon R, Würzner R, Morgan BP, Uhrin D, Bishop PN, Day AJ. Tissue-specific host recognition by complement factor H is mediated by differential activities of its glycosaminoglycan-binding regions. *J Immunol.* 2013;190:2049–57.

Constantinescu AR, Bitzan M, Weiss LS, Christen E, Kaplan BS, Cnaan A, Trachtman H. Non-enteropathic hemolytic uremic syndrome: causes and short-term course. *Am J Kidney Dis.* 2004;43:976–82.

Córdoba SR, Jorge EG. Translational mini-review series on complement Factor H: genetics and disease associations of human complement Factor H. *Clin Exp Immunol.* 2008;151(1):1-13.

Coulthard LG, Woodruff TM. Is the Complement activation product C3a a proinflammatory molecule? Re-evaluating the evidence and the myth. *The Journal of Immunol.* 2015;194: 3542-48.

Crabb JW, Miyagi M, Gu X, Shadrach K, West KA, Sakaguchi H, Kamei M, Hasan A, Yan L, Rayborn ME, Salomon RG, Hollyfield JG. Drusen. proteome analysis: an approach to the etiology of age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002;99:14682-87.

da Silva WD, Eisele JW, Lepow IH. Complement as a mediator of inflammation. 3. Purification of the activity with anaphylatoxin properties generated by interaction of the first four components of complement and its identification as a cleavage product of C3. *J Exp Med.* 1967;126(6):1027-48.

Dahl MR, Thiel S, Matsushita M, Fujita T, Willis AC, Christensen T, et al. MASP-3 and its association with distinct complexes of the mannan-binding lectin complement activation pathway. *Immunity.* 2001;15(1):127–35.

de Paula PF, Barbosa JE, Junior PR, Ferriani VP, Latorre MR, Nudelman V, Isaac L. Ontogeny of complement regulatory proteins - concentrations of factor H, factor I, C4b-binding protein, properdin and vitronectin in healthy children of different ages

and in adults. *Scand J Immunol.* 2003;58(5):572-7.

Dempsey PW, Allison ME, Akkaraju S, Goodnow CC, Fearon DT. C3d of complement as a molecular adjuvant: bridging innate and acquired immunity. *Science.* 1996;271(5247):348-50.

Derosa G, Maffioli P, Simental-Mendía LE, Bo S, Sahebkar A. Effect of curcumin on circulating interleukin-6 concentrations: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Pharmacol Res.* 2016;111:394-404.

Díaz-Guillén MA, Rodríguez de Córdoba S, Heine-Suñer D. A radiation hybrid map of complement factor H and factor H-related genes. *Immunogenetics.* 1999;49(6):549-52.

Dobó J. et al. MASP-1, a promiscuous complement protease: structure of its catalytic region reveals the basis of its broad specificity. *J. Immunol.* 2009;183,1207–14.

Dobó J, Szakács D, Oroszlán G et al. MASP-3 is the exclusive pro-factor D activator in resting blood: the lectin and the alternative complement pathways are fundamentally linked. *Sci Rep.* 2016 Aug 18;6:31877.

Dobson CM. Protein folding and misfolding. *Nature.* 2003;426(6968):884–90

Douglass BJ, Clouatre DL. Beyond Yellow Curry: Assessing Commercial Curcumin Absorption Technologies. *Journal of the American College of Nutrition.* 2015;34(4):347-58.

Dragon-Durey MA, Frémeaux-Bacchi V, Loirat C, Blouin J, Niaudet P, Deschenes G, Coppo P, Herman Fridman W, Weiss L. Heterozygous and homozygous factor h deficiencies associated with hemolytic uremic syndrome or membranoproliferative glomerulonephritis: report and genetic analysis of 16 cases. *J Am Soc Nephrol.* 2004;15(3):787-95.

Eberhardt HE, Chen Q, Zipfel P, Skerka C. Human complement factor H-related protein 2 (CFHR2) represents a novel complement regulator, which is reduced in a patient with MPGN I. *Molecular Immunology.* 2011;48:1674.

Esatbeyoglu T, Huebbe P, Ernst IM, Chin D, Wagner AE, Rimbach G. Curcumin: from molecule to biological function. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2012;51(22):5308-32.

Esposito S, Tosco A, Vilella VR, Raia V, Kroemer G, Maiuri L. Manipulating proteostasis to repair the F508del-CFTR defect in cystic fibrosis. *Mol Cell Pediatr*. 2016;3:13.

Fernandez M, Alarcón GS, Calvo-Alen J, Andrade R, McGwin G Jr, Vilá LM, Reveille JD; LUMINA Study Group. A multiethnic, multicenter cohort of patients with systemic lupus erythematosus (SLE) as a model for the study of ethnic disparities in SLE. *Arthritis Rheum*. 2007;57:576–84.

Fakhouri F, Frémeaux-Bacchi V, Noël LH, Cook HT, Pickering, M.C. C3 glomerulopathy: a new classification. *Nat. Rev. Nephrol*. 2010;6:494-99.

Falcão DA, Reis ES, Paixão-Cavalcante D, Amano MT, Delcolli MI, Florido MP, Albuquerque JA, Moraes-Vasconcelos D, Duarte AJ, Grumach AS, Isaac L. Deficiency of the Human Complement Regulatory Protein Factor H Associated with Low Levels of Component C9. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2008;68(4):445–55.

Fang Y, Xu C, Fu YX, Holers VM, Molina H. Expression of complement receptors 1 and 2 on follicular dendritic cells is necessary for the generation of a strong antigen-specific IgG response. *J Immunol*. 1998;160(11):5273-9.

Fearon DT, Austen KF. Properdin: binding to C3b and stabilization of the C3b-dependent C3 convertase. *J Exp Med*. 1975;142:856-63.

Fearon DT. Regulation of the amplification C3 convertase of human complement by an inhibitory protein isolated from human erythrocyte membrane. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1979; 76(11):5867-71.

Ferreira N, Gonçalves NP, Saraiva MJ, Almeida MR. Curcumin: A multi-target disease-modifying agent for late-stage transthyretin amyloidosis. *Sci Rep*. 2016;6:26623.

Ferraz MB, Goldenberg J, Hilario MO, Bastos WA, Oliveira SK, Azevedo EC, di Napoli D. Evaluation of the 1982 ARA lupus criteria data set in pediatric patients. Committees of Pediatric Rheumatology of the Brazilian Society of Pediatrics and the Brazilian Society of Rheumatology. *Clinical and Experimental Rheumatology*. 1994;12(1):83-87.

Fijen CA1, Kuijper EJ, Te Bulte M, van de Heuvel MM, Holdrinet AC, Sim RB, Daha MR, Dankert J. Heterozygous and homozygous Factor H deficiency states in a Dutch family. *Clin Exp Immunol*. 1996;105:511–6.

Filippo CA, Pasquali M, Longo N. Pharmacological rescue of carnitine transport in primary carnitine deficiency. *Hum Mutant*. 2006;27(6):513-23.

Fritsche LG, Lauer N, Hartmann A, Stippa S, Keilhauer CN, Oppermann M, Pandey MK, Köhl J, Zipfel PF, Weber BH, Skerka C. An imbalance of human complement regulatory proteins CFHR1, CFHR3 and factor H influences risk for age-related macular degeneration (AMD). *Hum. Mol. Genet*. 2010;19, 4694–704.

Fritsche LG, Fariss RN, Stambolian D, Abecasis GR, Curcio CA, Swaroop A. Age-Related Macular Degeneration: Genetics and Biology Coming Together. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2014;15:151-71.

Fujita T, Matsushita M, Endo Y. The lectin - complement pathway - its role in innate immunity and evolution. *Immunol Rev*. 2004;198:185-202.

Ghosh SS, Massey HD, Krieg R, Fazelbhoj ZA, Ghosh S, Sica DA, Fakhry I, Gehr TW. Curcumin ameliorates renal failure in 5/6 nephrectomized rats: role of inflammation. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2009 May;296(5):F1146-57

Gidalevitz T, Stevens F, Argon Y. Orchestration of secretory protein folding by ER chaperones. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1833(11):2410–24.

Gladman DD, Ibañez D, Urowitz MB. Systemic lupus erythematosus disease activity index 2000. *J Rheumatol*. 2002;29(2):288-91.

Goel A, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB. Curcumin as “Curecurmin”: From kitchen to clinic. *Biochemical Pharmacology*. 2008;15:787-809.

Goicoechea de Jorge E, Caesar JJ, Malik TH, Patel M, Colledge M, Johnson S, Hakobyan S, Morgan BP, Harris CL, Pickering MC, Lea SM. Dimerization of complement factor H-related proteins modulates complement activation in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 2013;110, 4685–90.

Gordon DL, Kaufman RM, Blackmore TK, Kwong J, Lublin DM. Identification of complement regulatory domains in human factor H. *J Immunol*. 1995;155(1):348-56.

Grammatikos AP, Tsokos GC. Immunodeficiency and autoimmunity: lessons from systemic lupus erythematosus. *Trends Mol Med*. 2012;18:101-8.

Gupta SC, Patchva S, Aggarwal BB. Therapeutic Roles of Curcumin: Lessons Learned from Clinical Trials. *AAPS J*. 2013 Jan; 15(1): 195–218.

Hageman GS, Luthert PJ, Victor Chong NH, Johnson LV, Anderson DH, Mullins RF.

An integrated hypothesis that considers drusen as biomarkers of immune-mediated processes at the RPE-Bruch's membrane interface in aging and age-related macular degeneration. *Prog. Retin. Eye Res.* 2001;20:705-32.

Hageman GS, Anderson DH, Johnson LV, Hancox LS, Taiber AJ, Hardisty LI, Hageman JL, Stockman HA, Borchardt JD, Gehrs M, Smith RJ, Silvestri G, Russell SR, Klaver CC, Barbazetto I, Chang S, Yannuzzi LA, Barile GR, Merriam JC, Smith RT, Olsh AK, Bergeron J, Zernant J, Merriam JE, Gold B, Dean M, Allikmets R. A common haplotype in the complement regulatory gene factor H (HF1/CFH) predisposes individuals to age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005;102:7227-32.

Harris CL, Heurich M, Cordoba SR and Morgan BP. The complotype: dictating risk for inflammation and infection *Trends in Immunology.* 2012;33(10):513-21.

He L, Peng X, Zhu J, Liu G, Chen X, Tang C, Liu H, Liu F, Peng Y. Protective effects of curcumin on acute gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Can J Physiol Pharmacol.* 2015 Apr;93(4):275-82.

Heinen S, Hartmann A, Lauer N, Wiehl U, Dahse HM, Schirmer S, Gropp K, Enghardt T, Wallich R, Hälbig S, Mihlan M, Schlötzer-Schrehardt U, Zipfel PF, Skerka C. Factor H-related protein 1 (CFHR-1) inhibits complement C5 convertase activity and terminal complex formation. *Blood.* 2009;114, 2439–47

Hellwege J, Jokiranta TS, Koistinen V, Vaarala O, Meri S, Zipfel PF. Functional properties of complement factor H-related proteins FHR-3 and FHR-4: binding to the C3d region of C3b and differential regulation by heparin. *FEBS Lett.* 1999;462, 345–52.

Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1997 Sep;40(9):1725.

Hoehle SI, Pfeiffer E, S.lyom AM and Metzler M. Metabolism of curcuminoids in tissue slices and subcellular fractions from rat liver. *J Agric Food Chem.* 2006;54(3):756-64.

Horie-Inoue K, Inoue S. Review: Genomic aspects of age-related macular degeneration. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2014;452:263-75.

Hourcade D, Holers VM, Atkinson JP. The regulators of complement activation (RCA) gene cluster. *Adv Immunol.* 1989; 45:381-416.

Humpath.com - Human Pathology. Molecular Pathology. Complement components, c 1996-2017. Disponível em: <<https://www.humpath.com/spip.php?article1388>>. Acesso em: 23 nov. 2017.

Ippolito A, Wallace DJ, Gladman D, Fortin PR, Urowitz M, Werth V, Costner M, Gordon C, Alarcón GS, Ramsey-Goldman R, Maddison P, Clarke A, Bernatsky S, Manzi S, Bae SC, Merrill JT, Ginzler E, Hanly JG, Nived O, Sturfel G, Sanchez-Guerrero J, Bruce I, Aranow C, Isenberg D, Zoma A, Magder LS, Buyon J, Kalunian K, Dooley MA, Steinsson K, van Vollenhoven RF, Stoll T, Weisman M, Petri M. Auto antibodies in systemic lupus erythematosus: comparison of historical and current assessment of seropositivity. *Lupus*. 2011;20:250-55.

Isenman DE, Kells DI, Cooper NR, Muller-Eberhard HJ, Pangburn MK. Nucleophilic modification of human complement protein C3: correlation of conformational changes with acquisition of C3b-like functional properties. *Biochemistry*. 1981;20(15):4458-67.

Isenman DE, Kells DI. Conformational and functional changes in the fourth component of human complement produced by nucleophilic modification and by proteolysis with C1s-. *Biochemistry*. 1982;21(6):1109-17.

Jäger R, Lowery RP, Calvanese AV, Joy JM, Purpura M, Wilson JM. Comparative absorption of curcumin formulations. *Nutrition Journal* 2014, 13:11.

Jesus AA, Liphaus BL, Silva CA, Bando SY, Andrade LEC, Coutinho A, Carneiro-Sampaio M. Complement and antibody primary immunodeficiency in juvenile systemic lupus erythematosus patients. *Lupus*. 2011;20:1275-84.

Jokiranta TS, Zipfel PF, Hakulinen J, Kühn S, Pangburn MK, Tamerius JD, Meri S. Analysis of the recognition mechanism of the alternative pathway of complement by monoclonal anti-factor H antibodies: Evidence for multiple interactions between H and surface bound C3b. *FEBS Letts*. 1996;393:297-302.

Jokiranta TS, Hellwage J, Koistinen V, Zipfel PF, Meri S. Each of the three binding sites on complement factor H interacts with a distinct site on C3b. *J Biol Chem*. 2000;275(36):27657-62.

Jokiranta TS, Cheng ZZ, Seeberger H, Jòzsi M, Heinen S, Noris M, Remuzzi G, Ormsby R, Gordon DL, Meri S, Hellwage J, Zipfel PF. Binding of complement factor H to endothelial cells is mediated by the carboxy-terminal glycosaminoglycan binding site. *Am J Pathol*. 2005;167(4):1173-81.

Jong PT. Age-related macular degeneration. *N. Engl. J. Med.* 2006; 255(14):1474-85.

Józsi M, Richter H, Loschmann I, Skerka C, Buck F, Beisiegel U, Erdei A, Zipfel PF. FHR-4A: a new factor H-related protein is encoded by the human FHR-4 gene. *Eur. J. Hum. Genet.* 2005;13, 321–29.

Józsi M, Heinen S, Hartmann A, Ostrowicz CW, Hälbig S, Richter H, Kunert A, Licht C, Saunders RE, Perkins SJ, Zipfel PF, Skerka C. Factor H and atypical hemolytic uremic syndrome: mutations in the C-terminus cause structural changes and defective recognition functions. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17(1):170-7.

Józsi M, Oppermann M, Lambris JD, Zipfel PF. The C-terminus of complement factor H is essential for host cell protection. *Mol Immunol.* 2007;44(10):2697-706.

Józsi M, Zipfel PF. Factor H family proteins and human diseases. *Trends Immunol.* 2008;29:380–7.

Józsi M, Reuter S, Nozal P, López-Trascasa M, Sánchez-Corral P, Prohászka Z, Uzonyi B. Autoantibodies to complement components in C3 glomerulopathy and atypical hemolytic uremic syndrome. *Immunology letters.* 2014;160:163-71.

Kallel-Sellami M, Baili-Klila L, Zerzeri Y, Laadhar L, Blouin J, Abdelmalek R, Fremeaux-Bacchi V, Zitouni M, Makni Set al. Hereditary complement deficiency and lupus: report of four Tunisian cases. *Ann N Y Acad Sci.* 2007;1108:197-202.

Kanai M, Imaizumi A, Otsuka Y, Sasaki H, Hashiguchi M, Tsujiko K, Matsumoto S, Ishiguro H, Chiba T. Dose-escalation and pharmacokinetic study of nanoparticle curcumin, a potential anticancer agent with improved bioavailability, in healthy human volunteers. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2012;69:65-70.

Kanai M, Otsuka Y, Otsuka K, Sato M, Nishimura T, Mori Y, Kawaguchi M, Hatano E, Kodama Y, Matsumoto S, Murakami Y, Imaizumi A, Chiba T, Nishihira J, Shibata H. A phase I study investigating the safety and pharmacokinetics of highly bioavailable curcumin (Theracurmin) in cancer patients. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2013;71:1521–30.

Khajehdehi P, Zanjanejad B, Aflaki E, Nazarinia M, Azad F, Malekmakan L, Dehghanzadeh GR. Oral supplementation of turmeric decreases proteinuria, hematuria, and systolic blood pressure in patients suffering from relapsing or refractory lupus nephritis: a randomized and placebo-controlled study. *J Ren Nutr.* 2012;22(1):50-7.

Kim DD, Song WC. Membrane complement regulatory proteins. *Clin Immunol.* 2006;118(2-3):127-36.

Kim DH, Phillips JF, Lockey RF. Oral curcumin supplementation in patients with atopic asthma. *Allergy Rhinol (Providence).* 2011 Apr;2(2):e51-3.

Klatchoian DA, Len CA, Terreri MTRA, Silva M, Itamoto C, Ciconelli RM, Varni JW, Hilário MOE. Qualidade de vida de crianças e adolescentes de São Paulo: confiabilidade e validade da versão brasileira do questionário genérico Pediatric Quality of Life InventoryTM versão 4.0. 2008;84:308-15.

Klein RJ, Zeiss C, Chew EY, Tsai JT, Sackler RS, Haynes C, Henning AK, Sangiovanni JP, Mane SM, Mayne ST, Bracken MB, Ferris FL, Ott J, Barnstable C, Hoh J. Complement Factor H polymorphism in age-related macular degeneration. *Science.* 2005;308:385-9.

Korb LC, Ahearn JM. C1q binds directly and specifically to surface blebs of apoptotic human keratinocytes: complement deficiency and systemic lupus erythematosus revisited. *J Immunol.* 1997;158(10):4525-8.

Kühn S, Skerka C, Zipfel PF. Mapping of the complement regulatory domains in the human factor H-like protein 1 and in factor H1. *J Immunol.* 1995;155(12):5663-70.

Kurita T, Makino Y. Novel Curcumin Oral Deliveri Systems. *Anticancer research.* 2013;33:2807-22.

Kuwabara T, Mori K, Mukoyama M, Kasahara M, Yokoi H, Saito Y, et al. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin levels reflect damage to glomeruli, proximal tubules, and distal nephrons. *Kidney Int.* 2009;75(3):285-94.

Lee H, Kim H, Lee G, Chung HS, Bae H. Curcumin attenuates lupus nephritis upon interaction with regulatory T cells in New Zealand Black/White mice. *Br J Nutr.* 2013 Jul 14;110(1):69-76.

Lee J and Ozcan U. Unfolded Protein Response Signaling and Metabolic Diseases. *J Biol Chem.* 2014;289(3):1203-11.

Lepow IH. Presidential address to american association of immunologists in Anaheim, California, april 16, 1980. Louis Pillemer, properdin, and scientific controversy. *J Immunol.* 1980;125(2):471-5.

Leshner AM, Song WC. Review: Complement and its regulatory proteins in kidney diseases. *Nephrology.* 2010;15:663–75.

Lindquist SL, Kelly JW. Chemical and Biological Approaches for Adapting Proteostasis to Ameliorate Protein Misfolding and Aggregation Diseases—Progress and Prognosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011;1,3(12).

Liu C-C, Ahearn JM. Complement and Systemic Lupus Erythematosus. In: Wallace DJ, Hahn BH, ed. *Dubois' Lupus Erythematosus*. 7th edition Lippincott Williams & Wilkins. 2007;Chap 13, 214-35.

Macedo ACL and Isaac L. Systemic Lupus erythematosus and Deficiencies of early Components of the Complement Classical Pathway *Front. Immunol.* 2016;7:55.

Maiti P, Manna J, Veleri S, Frautschy S. Molecular Chaperone Dysfunction in Neurodegenerative Diseases and Effects of Curcumin. *Biomed Res Int.* 2014;2014:495091.

Malattia C, Martini A. Pediatric-onset systemic lupus erythematosus. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2013;27:351-62.

Male DA, Ormsby RJ, Ranganathan S, Giannakis E, Gordon DL. Complement factor H: sequence analysis of 221 kb of human genomic DNA containing the entire FH, FHR-1 and FHR-3 genes. *Mol Immunol.* 2000;37(1-2):41-52.

Martínez-Barricarte R, Heurich M, Valdes-Cañedo F, Vazquez-Martul E, Torreira E, Montes T, Tortajada A, Pinto S, Lopez-Trascasa M, Morgan BP, Llorca O, Harris CL, Rodríguez de Córdoba S. Human C3 mutation reveals a mechanism of dense deposit disease pathogenesis and provides insights into complement activation and regulation. *J. Clin. Invest.* 2010;120:3702-12.

Matsushita M, Endo Y, Fujita T. Cutting edge: complement-activating complex of ficolin and mannose-binding lectin-associated serine protease. *J Immunol.* 2000;164(5):2281–4.

Matsushita M, Kuraya M, Hamasaki N, Tsujimura M, Shiraki H, Fujita T. Activation of the lectin complement pathway by H-ficolin (Hakata antigen). *J Immunol.* 2002;168(7):3502-6.

Mattoo RU, Goloubinoff P. Molecular chaperones are nanomachines that catalytically unfold misfolded and alternatively folded proteins, *Cell. Mol. Life Sci.* 2014;71:3311-25.

Mayer MM. Mechanism of cytolysis by complement. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1972;69(10):2954-58.

McCarty DJ, Manzi S, Medsger TA Jr, Ramsey-Goldman R, LaPorte RE, Kwoh CK. Incidence of systemic lupus erythematosus. Race and gender differences. *Arthritis Rheum.* 1995;38:1260–70.

McRae JL, Duthy TG, Griggs KM, Ormsby RJ, Cowan PJ, Cromer BA, McKinsty WJ, Parker MW, Murphy BF, Gordon DL. Human factor H-related protein-5 has cofactor activity, inhibits C3-convertase activity, binds heparin and C-reactive protein, and associates with lipoprotein. *J. Immunol.* 2005;174, 6250–56.

Mele C, Remuzzi G, Noris M. Hemolytic uremic syndrome. *Semin Immunopathol.* 2014;36(4):399-420.

Merle NS, Church SE, Fremeaux-Bacchi V and Roumenina LT. Complement system part I: molecular mechanisms of activation and regulation. *Front. Immunol.* 2015;6:262.

Merle NS, Noe R, Halbwachs-Mecarelli L, Fremeaux-Bacchi V and Roumenina LT. Complement system part II: role in immunity. *Front. Immunol.* 2015;6:257.

Miller, JW. Age-related macular degeneration revisited – piecing the puzzle: the LXIX Edward Jackson memorial lecture. *Am. J. Ophthalmol.* 2013;155:1-35,e13.

Morgan BP. Regulation of the complement membrane attack pathway. *Crit Rev Immunol.* 1999;19(3):173-98.

Morgan TA, Watson L, McCann LJ, Beresford MW. Children and adolescents with SLE: not just little adults. *Lupus.* 2013;22:1309-19.

Morimoto RI, Cuervo AM. Protein Homeostasis and Aging: Taking Care of Proteins From the Cradle to the Grave. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2009;64A(2):167-70.

Müller-Eberhard HJ, Schreiber RD. Molecular biology and chemistry of the alternative pathway of complement. *Adv Immunol.* 1980;29:1-53.

Navratil JS, Korb LC, Ahearn JM. Systemic lupus erythematosus and complement deficiency: clues to a novel role for the classical complement pathway in the maintenance of immune tolerance. *Immunopharmacology.* 1999;42:47-52.

Noack J, Brambilla Pisoni G, Molinari M. Proteostasis: Bad news and good news from the endoplasmic reticulum. *Swiss Med Wkly.* 2014;144:w14001

Norez C, Antigny F, Becq F, Vandebrouck C. Maintaining low Ca²⁺ level in the

endoplasmic reticulum restores abnormal endogenous F508del-CFTR trafficking in airway epithelial cells. *Traffic*. 2006;7(5):562-73.

Noris M, Caprioli J, Bresin E, Mossali C, Pianetti G, Gamba S, Daina E, Fenili C, Castelletti F, Sorosina A, Piras R, Donadelli R, Maranta R, van der Meer I, Conway EM, Zipfel PF, Goodship TH, Remuzzi G. Relative role of genetic complement abnormalities in sporadic and familial aHUS and their impact on clinical phenotype. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2010;5:1844-59.

Ohanian M, Cable C, Halka K. Eculizumab safely reverses neurologic impairment and eliminates need for dialysis in severe atypical hemolytic uremic syndrome. *Clin Pharmacol*. 2011;3:5-12.

Osler AG, Randall HG, Hill BM, Ovary Z. Studies on the mechanism of hypersensitivity phenomena. III. The participation of complement in the formation of anaphylatoxin. *J Exp Med*. 1959;110(2):311-39.

Pangburn MK, Schreiber RD, Müller-Eberhard HJ. Formation of the initial C3 convertase of the alternative complement pathway. Acquisition of C3b-like activities by spontaneous hydrolysis of the putative thioester in native C3. *J Exp Med*. 1981;145(3):856-67.

Pangburn MK, Müller-Eberhard HJ. Initiation of the alternative complement pathway due to spontaneous hydrolysis of the thioester of C3. *Ann N Y Acad Sci*. 1983;421:291-8.

Pangburn MK, Müller-Eberhard HJ. The alternative pathway of complement. *Springer Semin Immunopathol*. 1984;7(2-3):163-92.

Papadimitraki ED, Isenberg DA. Childhood- and adult-onset lupus: an update of similarities and differences. *Expert Rev Clin Immunol*. 2009;5:391-403.

Park SW and Ozcan U. Potential for therapeutic manipulation of the UPR in disease. *Semin Immunopathol*. 2013;35:351-73.

Pepys MB and Hirschfield GM. C-reactive protein: a critical update. *J Clin Invest*. 2003 Jun 15; 111(12): 1805–12.

Petri M, Orbai AM, Alarcón GS, Gordon C, Merrill JT, Fortin PR, Bruce IN, Isenberg D, Wallace DJ, Nived O, Sturfelt G, Ramsey-Goldman R, Bae SC, Hanly JG, Sánchez-Guerrero J, Clarke A, Aranow C, Manzi S, Urowitz M, Gladman D, Kalunian K, Costner M, Werth VP, Zoma A, Bernatsky S, Ruiz-Irastorza G, Khamashta MA, Jacobsen S, Buyon JP, Maddison P, Dooley MA, van Vollenhoven RF, Ginzler E, Stoll T, Peschken C, Jorizzo JL, Callen JP, Lim SS, Fessler BJ,

Inanc M, Kamen DL, Rahman A, Steinsson K, Franks AG Jr, Sigler L, Hameed S, Fang H, Pham N, Brey R, Weisman MH, McGwin G Jr, Magder LS. Derivation and Validation of Systemic Lupus International Collaborating Clinics Classification Criteria for Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2012;64(8):2677-86.

Pickering MC, Botto M, Taylor PR, Lachmann PJ, Walport MJ. Systemic lupus erythematosus complement deficiency and apoptosis. *Advances in Immunology*. 2000;76:227-324.

Pickering MC, Cook HT. Translational Mini-Review Series on Complement Factor H: Renal diseases associated with complement factor H: novel insights from humans and animals. *Clinical and Experimental Immunology*. 2008;151:210–30.

Podack ER, Tschopp J. Polymerization of the ninth component of complement (C9): formation of poly(C9) with a tubular ultrastructure resembling the membrane attack complex of complement. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1982;79:574–8.

Pons-Estel GJ, Alarcón GS, Scofield L, Reinlib L, Cooper GS. Understanding the Epidemiology and Progression of Systemic Lupus Erythematosus. *Semin Arthritis Rheum* 2010;39(4):257.

Pouw R B, Vredevoogd DW, Kuijpers TW, Wouters, D. Of mice and men: The factor H protein family and complement regulation. *Molecular Immunology*. 2015; 67,12-20.

Prosser BE, Johnson S, Roversi P, Herbert AP, Blaum BS, Tyrrell J, Jowitt TA, Clark SJ, Tarelli E, Uhrin D, Barlow PN, Sim RB, Day AJ, Lea SM. Structural basis for complement factor H linked age-related macular degeneration. *J Exp Med*. 2007;204(10):2277-83.

Reis ES, Falcão DA, Isaac L. Clinical aspects and molecular basis of primary deficiencies of complement component C3 and its regulatory proteins factor I and factor H. *Scand J Immunol*. 2006;63(3):155-68.

Reynolds R, Hartnett ME, Atkinson JP, Giclas PC, Rosner B, Seddon JM. Plasma complement and activation fragments: associations with age-related macular degeneration genotypes and phenotypes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009;50:5818-27.

Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, Lambris JD. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol*. 2010;11(9):785-97.

Ripoche J, Day AJ, Harris TJ, Sim RB. The complete amino acid sequence of

human complement factor H. *Biochem J.* 1988;249:93–602.

Rodriguez E, Rallapalli PM, Osborne AJ, Perkins SJ. New functional and structural insights from updated mutational databases for complement factor H, Factor I, membrane cofactor protein and C3. *Biosci Rep.* 2014;34(5).

Ross GD, Yount WJ, Walport MJ, Winfield JB, Parker CJ, Fuller CR, Taylor RP, Myones BL, Lachmann PJ. Disease-associated loss of erythrocyte complement receptors (CR1, C3b receptors) in patients with systemic lupus erythematosus and other diseases involving autoantibodies and/or complement activation. *J Immunol.* 1985;135:2005-14.

Roth SD¹, Schüttrumpf J, Milanov P, Abriss D, Ungerer C, Quade-Lyssy P, Simpson JC, Pepperkok R, Seifried E, Tonn T. Chemical chaperones improve protein secretion and rescue mutant factor VIII in mice with hemophilia A. *PloS one.* 2012;7(9):e44505.

Ruggenti P, Noris M, Remuzzi G. Thrombotic microangiopathy, hemolytic uremic syndrome, and thrombotic thrombocytopenic purpura. *Kidney Int.* 2001;60:831–46.

Sahebkar A, Cicero AF, Simental-Mendía LE, Aggarwal BB, Gupta SC. Curcumin downregulates human tumor necrosis factor- α levels: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Pharmacol Res.* 2016;107:234-42.

Saunders RE, Abarrategui-Garrido C, Fremeaux-Bacchi V, Goicoechea de Jorge E, Goodship TH, Lopez Trascasa M, Noris M, Ponce Castro IM, Remuzzi, G, Rodriguez de Cordoba S, Sánchez-Corral P, Skerka C, Zipfel PF, Perkins SJ. The interactive Factor H atypical haemolytic uraemic syndrome mutation database and website: update and integration of membrane cofactor protein and Factor I mutations with structural models. *Hum. Mutat.* 2007;28, 222–34.

Scapagnini G, Vasto S, Abraham NG, Caruso C, Zella D, Fabio G. Modulation of Nrf2/ARE pathway by food polyphenols: a nutritional neuroprotective strategy for cognitive and neurodegenerative disorders. *Mol Neurobiol.* 2011;44(2):192-201.

Schmidt BZ, Fowler NL, Hidvegi T, Perlmutter DH, Colten HR. Disruption of disulfide bonds is responsible for impaired secretion in human complement factor H deficiency. *J Biol Chem.* 1999;274(17):11782-8.

Sellier-Leclerc AL, Fremeaux-Bacchi V, Dragon-Durey MA, Macher MA, Niaudet P, Guest G, Boudailliez B, Bouissou F, Deschenes G, Gie S, Tsimaratos M, Fischbach M, Morin D, Nivet H, Alberti C, Loirat C; French Society of Pediatric Nephrology. Differential impact of complement mutations on clinical characteristics in atypical

hemolytic uremic syndrome. *J Am Soc Nephrol.* 2007;18:2392-400.

Servais A, Noël LH, Roumenina LT, Le Quintrec M, Ngo S, Dragon-Durey MA, Macher MA, Zuber J, Karras A, Provot F, Moulin B, Grünfeld JP, Niaudet P, Lesavre P, Frémeaux-Bacchi V. Acquired and genetic complement abnormalities play a critical role in dense deposit disease and other C3 glomerulopathies. *Kidney Int.* 2012;82:454-64.

Shoba G, Joy D, Joseph T, Majeed M, Rajendran R, Srinivas PS. Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers. *Planta Med.* 1998;64(4):353–56.

Sim RB, DiScipio RG. Purification and structural studies on the complement-system control protein beta 1H (Factor H). *Biochem J.* 1982;205:285–93.

Sivakumaran TA, Igo RP Jr, Kidd JM, Itsara A, Kopplin LJ, Chen W, Hagstrom SA, Peachey NS, Francis PJ, Klein ML, Chew EY, Ramprasad VL, Tay WT, Mitchell P, Seielstad M, Stambolian DE, Edwards AO, Lee KE, Leontiev DV, Jun G, Wang Y, Tian L, Qiu F, Henning AK, LaFramboise T, Sen P, Aarthi M, George R, Raman R, Das MK, Vijaya L, Kumaramanickavel G, Wong TY, Swaroop A, Abecasis GR, Klein R, Klein BE, Nickerson DA, Eichler EE, Iyengar SK. A 32 kb critical region excluding Y402H in CFH mediates risk for age-related macular degeneration. *PLoS ONE.* 2011;6(10):e25598.

Sivaprasad, S and Chong, NV. The complement system and age-related macular degeneration. *Eye.* 2006;20:867-72.

Skerka C, Timmann C, Horstmann RD et al. Two additional human serum proteins structurally related to complement factor H. Evidence for a family of factor H-related genes. *J Immunol.* 1992;148:3313–18.

Skerka C, Lauer N, Hatmann A, Heinan S, Schlötzerschrehardt U, Weinberger AWA, Keilhauer C, Suehnel J, Weber BHF, Zipfel PF. Mutation in factor H (Y402H) associated with age-related macular degeneration (AMD) results in reduced binding activities. *Mol Immunol.* 2007;44(1-3):241-42.

Skerka C, Chen Q, Fremeaux-Bacchi V, Roumenina LT. Complement factor H related proteins (CFHRs). *Mol Immunol.* 2013;56(3):170-80.

Skjodt MO, Hummelshoj T, Palarasah Y, Honore C, Koch C, Skjodt K, Garred P. A novel mannose-binding lectin/ficolin-associated protein is highly expressed in heart and skeletal muscle tissues and inhibits complement activation. *J Biol Chem.* 2010;285(11):8234-43.

Smith RJH, Alexander J, Barlow PN et al. New approaches to treatment of dense deposit disease. *J Am Soc Nephrol*. 2007;18:2447–56.

Spencer KL, Olson LM, Anderson BM, Schnetz-Boutaud N, Scott WK, Gallins P, Agarwal A, Postel EA, Pericak-Vance MA, Haines JL. C3 R102G polymorphism increases risk of age-related macular degeneration. *Hum Mol Genet*. 2008;17:1821-4.

Sueth-Santiago et al. Curcumina, o pó dourado do açafrão-da-terra: introspecções sobre química e atividades biológicas. *Quim Nova*. 2015;38:538-52.

Suzuki Y. Chaperone therapy update: Fabry disease, GM1-gangliosidosis and Gaucher disease. *Brain Dev*. 2013;35(6):515–23.

Swaroop A, Branham KE, Chen W, Abecasis G. Genetic susceptibility to age-related macular degeneration: a paradigm for dissecting complex disease traits. *Hum Mol Genet*. 2007;2:174-82.

Tabakoff B, Cornell N, Hoffman PL. Alcohol tolerance. *Ann Emerg Med*. 1986;15(9):1005-12.

Tack BF, Harrison RA, Janatova J, Thomas ML, Prah J. Evidence for presence of an internal thiolester bond in third component of human complement. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1980;77(10):5764-68.

Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, Schaller JG, Talal N, Winchester RJ. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1982;25(11):1271-77.

Tarr T, Dérfalvi B, Győri N, Szántó A, Siminszky Z, Malik A, Szabó AJ, Szegedi G, Zeher M. Similarities and differences between pediatric and adult patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2015;24:796-803.

Taylor PR, Carugati A, Fadok VA, Cook HT, Andrews M, Carroll MC, Savill JS, Henson PM, Botto M, Walport MJ. A hierarchical role for classical pathway complement proteins in the clearance of apoptotic cells in vivo. *J Exp Med*. 2000;192(3):359-66.

Teixeira AG, Silva AS, Lin FLH, Velletri R, Bavia L, Belfort R Jr, Isaac L. Association of complement factor H Y402H polymorphism and age-related macular degeneration in Brazilian patients. *Acta Ophthalmol*. 2010;88:e165-9.

Thiel S, Vorup-Jensen T, Stover CM, Schwaebble W, Laursen SB, Poulsen K, Willis AC, Eggleton P, Hansen S, Holmskov U, Reid KB, Jensenius JC. A second serine protease associated with mannan-binding lectin that activates complement. *Nature*.1997;386:506-10.

Timmann C, Leippe M, Horstmann RD. Two major serum components antigenically related to complement factor H are different glycosylation forms of a single protein with no factor H-like complement regulatory functions. *J Immunol*. 1991;146:1265–70.

Turley AJ, Gathmann B, Bangs C, Bradbury M, Seneviratne S, Gonzalez-Granado LI, Hackett S, Kutukculer N, Alachkar H, Hambleton S, Ritterbusch H, Kralickova P, Marodi L, Seidel MG, Dueckers G, Roesler J, Huissoon A, Baxendale H, Litzman J, Arkwright PD. Spectrum and management of complement immunodeficiencies (excluding hereditary angioedema) across Europe. *J Clin Immunol*. 2015;35(2):199–205.

Ufret-Vincenty RL et al. Transgenic mice expressing variants of complement factor H develop AMD-like retinal findings. *Inv. Ophthalm. & Vis. Sci*. 2010;51(11):5878-87.

Varni JW¹, Seid M, Kurtin PS. PedsQL 4.0: reliability and validity of the Pediatric Quality of Life Inventory version 4.0 generic core scales in healthy and patient populations. *Med Care*. 2001;39(8):800-12

Wagner E, Frank MM. Therapeutic potential of complement Modulation. *Nature Reviews*. 2010;9:43-56.

Walport MJ, Davies KA, Morley BJ and BottoM. Complement deficiency and autoimmunity. *Ann N Y Acad Sci*. 1997;815:267-81.

Walport MJ, Davies KA, Botto M. C1q and systemic lupus erythematosus. *Immunobiology*. 1998;199:265–85.

Walport MJ. First of two parts. *N Engl J M*. 2001;344(14):1058-66.

Warwicker P, Goodship TH, Donne RL, Pirson Y, Nicholls A, Ward RM, Turnpenny P, Goodship JA. Genetic studies into inherited and sporadic hemolytic uremic syndrome. *Kidney Int*. 1998;53:836-44.

Whaley K, Lemercier C. The complement system. In: Sim E. (Ed.) *Humoral factors*, Oxford University Press, Oxford (1993) Chap 5, 121-50.

Whitlow MB, Ramm LE, Mayer MM. Penetration of C8 and C9 in the C5b-9 complex

across the erythrocyte membrane into the cytoplasmic space. *J Biol Chem.* 1985;260:998–1005.

Yates JR, Sepp T, Matharu BK, Khan JC, Thurlby DA, Shahid H, Clayton DG, Hayward C, Morgan J, Wright AF, Armbrrecht AM, Dhillon B, Deary LJ, Redmond E, Bird AC, Moore AT. Complement C3 variant and the risk of age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 2007;357:553-61.

Zipfel PF, Skerka C. Complement factor H and related proteins: an expanding family of complement-regulatory proteins? *Immunol Today.* 1994;15(3):121-6.

Zipfel PF, et al. The role of complement in AMD. In: *Inflammation and Retinal Disease: Complement Biology and Pathology.* Lambris JD, Adamis, AP (eds). *Advances in Experimental Medicine and Biology.* 2010; pgs. 9-24.

Zipfel PF, Skerka C, Chen Q, Wiech T, Goodship T, Johnson S, Fremeaux-Bacchi V, Nester C, de Córdoba SR, Noris M, Pickering M, Smith R. The role of complement in C3 glomerulopathy. *Mol Immunol.* 2015;67(1):21-30.

Zundel S, Cseh S, Lacroix M, Dahl MR, Matsushita M, Andrieu JP, Schwaebler WJ, Jensenius JC, Fujita T, Arlaud GJ, Thielens NM. Characterization of recombinant mannan-binding lectin-associated serine protease (MASP)-3 suggests an activation mechanism different from that of MASP-1 and MASP-2. *J Immunol.* 2004;172(7):4342-50.

ANEXOS

A - Critérios “American College of Rheumatology” para a classificação de LES.

Critérios de Classificação

- Eritema malar
- Eritema discoide
- Fotossensibilidade
- Úlceras de mucosa (oral ou nasal)
- Artrite não erosiva
- Serosite (pleurite ou pericardite)
- Doença renal:
 - a) proteinúria persistente ou superior a 0,5g/dia
 - b) cilindúria: cilindros hemáticos, hemoglobínicos, granulares, tubulares ou mistos
- Doença neurológica
 - a) psicose (excluindo-se drogas e distúrbios metabólicos)
 - b) convulsão (excluindo-se drogas e distúrbios metabólicos)
- Doença hematológica
 - a) anemia hemolítica com reticulocitose em duas ou mais ocasiões
 - b) leucopenia (leucócitos menor que 4.000/mm³) em duas ou mais ocasiões
 - c) plaquetopenia (plaquetas menor que 100.000/mm³) em duas ou mais ocasiões
 - d) linfopenia (linfócitos menor que 1.500/mm³) em duas ou mais ocasiões
- Alterações imunológicas: anticorpo anti-DNA e/ou anticorpo anti-Sm e/ou anticorpo antifosfolípide (anticardiolipina e/ou anticoagulante lúpico) IgG e/ou IgM e/ou VDRL falso-positivo
- Fator anti-núcleo (FAN) positivo

Para o diagnóstico é necessária a presença de 4 ou mais dos 11 critérios, simultaneamente ou evolutivamente, durante qualquer intervalo de tempo. Fonte: Hochberg, 1997.

B - Critérios SLICC para diagnóstico de LES.

Critérios clínicos	
1.	Lúpus cutâneo agudo Inclui rash malar (não conta se lúpus discoide malar), lúpus bolhoso, necrose epidérmica tóxica variante de LES, rash maculopapular, fotossensibilidade (na ausência de dermatomiosite), lúpus cutâneo subagudo (lesões psoriasiformes não endurecidas ou lesões anulares policíclicas que resolvem sem deixar cicatriz, apesar de ocasionalmente ocorrer despigmentação pós-inflamatória ou telangiectasias)
2.	Lúpus cutâneo crônico Inclui rash discoide clássico (localizado – acima do pescoço, generalizado – acima e abaixo do pescoço), lúpus hipertrófico (verrucoso), paniculite lúpica (profunda), lúpus mucoso, lúpus tímido, chilblains, lúpus discóide /overlap com líquen plano
3.	Úlceras orais Palato, bucal, língua, úlceras nasais Na ausência de outras causas como vasculite, Behçet, infecções (herpes), doença inflamatória intestinal, artrite reativa e alimentos ácidos
4.	Alopecia Afilamento difuso ou fragilidade capilar com cabelos quebradiços visíveis Na ausência de outras causas como alopecia areata, drogas, deficiência de ferro e alopecia androgênica
5.	Sinovite Envolvendo duas ou mais articulações, com edema ou derrame articular ou artralgia em duas ou mais articulações e rigidez matinal de 30 minutos ou mais
6.	Serosite Dor pleurítica por mais de um dia ou derrame pleural ou atrito pleural, dor pericárdica típica (dor em posição deitada que melhora ao se sentar com o tronco para frente) por mais de um dia ou efusão pericárdica ou atrito pericárdico ou eletrocardiograma com sinais de pericardite Na ausência de outras causas, como infecções uremia ou pericardite de Dressler
7.	Renal Relação entre proteína e creatinina urinárias (ou proteinúria de 24 horas) com mais de 500mg de proteína em 24 horas ou cilindros hemáticos
8.	Neurológico Convulsão, psicose, mielite, mononeurite múltipla (na ausência de outras causas como vasculite primária), neuropatia periférica ou de nervos cranianos (na ausência de outras causas como vasculite primária, infecção e diabetes melitus), estado confusional agudo (na ausência de outras causas como tóxico-metabólicas, uremia e drogas)
9.	Anemia hemolítica
10.	Leucopenia $<4000/\text{mm}^3$ Na ausência de outra causa conhecida como Síndrome de Felty, drogas ou hipertensão portal OU Linfopenia $<1000/\text{mm}^3$ Na ausência de outra causa conhecida como corticoides, drogas e infecções
11.	Trombocitopenia $<100.000/\text{mm}^3$ Na ausência de outra causa conhecida como drogas, hipertensão portal e púrpura trombocitopênica trombótica

Critérios imunológicos	
1.	ANA positivo (FAN)
2.	Anticorpo anti-DNA positivo. Se ELISA: 2x acima o valor de referência
3.	Anti-Sm positivo
4.	Anticorpo anti-fosfolípide Anti-coagulante lúpico VDRL falso positivo Anti-cardiolipina em médios ou altos títulos (IgA, IgG e IgM) Anti-β2 glicoproteína I (IgA, IgG e IgM)
5.	Queda de Complemento: C3 baixo, C4 baixo, CH50 baixo
6.	Coombs direto positivo na ausência de anemia hemolítica

Para o diagnóstico são necessários a presença de 4 em um total de 17 critérios, sendo pelo menos um critério clínico e um critério imunológico, ou a presença de nefrite lúpica classificada por biópsia renal na presença de auto-anticorpos fator anti-núcleo ou anti-DNA. Fonte: Petri M et al., 2012.

C - Índice de atividade da doença LES 2000 (SLEDAI-2K)

MANIFESTAÇÃO	DEFINIÇÃO	PESO
CONVULSÃO	EXCLUIR CAUSAS METABÓLICAS, INFECCIOSAS OU DROGAS.	8
PSICOSE	ALTERAÇÃO DA PERCEPÇÃO DA REALIDADE, INCLUINDO-SE ALUCINAÇÕES, INCOERÊNCIAS, PENSAMENTO DESORGANIZADO, CATATONIA. EXCLUIR DROGAS E UREMIA.	8
SÍNDROME ORGÂNICO-CEREBRAL	ALTERAÇÃO MENTAL COM DÉFICIT DE ORIENTAÇÃO, MEMÓRIA, JULGAMENTO E ATENÇÃO, COM DOIS DE: FALA INCOERENTE, INSÔNIA, SONOLÊNCIA, HIPO/HIPERATIVIDADE MOTORA. EXCLUIR CAUSAS METABÓLICAS, INFECCIOSAS OU DROGAS.	8
ALTERAÇÕES VISUAIS	CORPOS CETÓIDES OU HEMORRAGIAS RETINIANAS, EXSUDATOS OU HEMORRAGIAS DE CORÓIDE, NEURITE ÓPTICA. EXCLUIR CAUSAS INFECCIOSAS, DROGAS OU HIPERTENSÃO.	8
ALTERAÇÕES DE NERVOS CRANIANOS	NEUROPATIA MOTORA OU SENSORIAL.	8
CEFALÉIA	PERSISTENTE, INTENSA, TIPO ENXAQUECA, NÃO RESPONSIVA AOS ANALGÉSICOS NARCÓTICOS.	8
ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL	EXCLUIR ATEROSCLEROSE.	8
VASCULITES	ÚLCERAS, GANGRENA, NÓDULOS DOLOROSOS, INFARTO SUB OU PERIUNGUEAL, BIÓPSIA OU ANGIOGRAFIA COMPATÍVEL.	8
ARTRITES	DUAS OU MAIS ARTICULAÇÕES.	4
MIOSITES	FRAQUEZA OU DOR MUSCULAR PROXIMAL COM: ELEVAÇÃO DE ENZIMAS MUSCULARES, ELETROMIOGRAFIA OU BIÓPSIA COMPATÍVEIS.	4
CILINDROS URINÁRIOS	GRANULOSOS OU HEMÁTICOS.	4
HEMATÚRIA	MAIOR QUE 5 HEMÁCIAS POR CAMPO. EXCLUIR CÁLCULOS OU INFECÇÕES.	4
PROTEINÚRIA	MAIOR QUE 0,5G/DIA DE INÍCIO RECENTE OU AUMENTO MAIOR QUE 0,5G/DIA EM RELAÇÃO AOS VALORES ANTERIORES.	4
LEUCOCITÚRIA	MAIOR QUE 5 LEUCÓCITOS POR CAMPO. EXCLUIR INFECÇÕES.	4
ERITEMA MALAR	ERITEMA SOBRE AS EMINÊNCIAS MALARES POUPANDO OS SULCOS NASOLABIAIS	2
ALOPÉCIA	PERDA ANORMAL DE CABELOS, DE FORMA LOCALIZADA OU DIFUSA.	2
ÚLCERAS DE MUCOSAS	ÚLCERAS ORAIS OU NAAIS.	2
PLEURITE	DOR PLEURÍTICA, COM ATRITO OU DERRAME PLEURAL, OU ESPESSAMENTO PLEURAL.	2
PERICARDITE	DOR PERICÁRDICA COM ATRITO, DERRAME OU ELETROCARDIOGRAMA OU ECOCARDIOGRAMA COMPATÍVEIS.	2
DIMINUIÇÃO DE COMPLEMENTO	DIMINUIÇÃO DE C3, C4 OU CH50.	2
ANTI-DNA	PRESENÇA.	2
FEBRE	TEMPERATURA MAIOR QUE 38°C. EXCLUIR INFECÇÕES.	1
PLAQUETOPENIA	MENOR QUE 100.000 PLAQUETAS POR MM ³ .	1
LEUCOPENIA	MENOR QUE 3.000 LEUCÓCITOS POR MM ³ . EXCLUIR DROGAS.	1
TOTAL		

Obs: válido para manifestações de início recente (até dez dias anteriores à avaliação) (Gladman et al., 2002).

D - PedsQLTM4.0 Relato do adolescente (13-18 anos)

No último mês, quanto você tem tido problemas com...

Sobre a Minha Saúde e Atividades (problemas com...)	Nunca	Quase Nunca	Algumas Vezes	Freqüentemente	Quase Sempre
1. Para mim é difícil andar mais de um quarteirão	0	1	2	3	4
2. Para mim é difícil correr	0	1	2	3	4
3. Para mim é difícil praticar atividades esportivas ou exercícios	0	1	2	3	4
4. Para mim é difícil levantar alguma coisa pesada	0	1	2	3	4
5. Para mim é difícil tomar banho de banheira ou chuveiro sozinho	0	1	2	3	4
6. Para mim é difícil fazer as tarefas do dia-a-dia da casa	0	1	2	3	4
7. Eu tenho dor ou machucado	0	1	2	3	4
8. Eu tenho pouca energia	0	1	2	3	4

Sobre os Meus Sentimentos (problemas com...)	Nunca	Quase Nunca	Algumas Vezes	Freqüentemente	Quase Sempre
1. Eu sinto medo ou fico assustado	0	1	2	3	4
2. Eu fico triste ou deprimido	0	1	2	3	4
3. Eu fico com raiva	0	1	2	3	4
4. Eu tenho dificuldade para dormir	0	1	2	3	4
5. Eu me preocupo com o que vai acontecer comigo	0	1	2	3	4

Como eu Convivo com Outras Pessoas (problemas com...)	Nunca	Quase Nunca	Algumas Vezes	Freqüentemente	Quase Sempre
1. Eu tenho problemas em conviver com outros adolescentes	0	1	2	3	4
2. Outros adolescentes não querem ser meus amigos	0	1	2	3	4
3. Outros adolescentes me provocam.	0	1	2	3	4
4. Não consigo fazer coisas que outros adolescentes da minha idade fazem	0	1	2	3	4
5. Para mim é difícil acompanhar os adolescentes da minha idade	0	1	2	3	4

Sobre a Escola (problemas com...)	Nunca	Quase Nunca	Algumas Vezes	Freqüentemente	Quase Sempre
1. É difícil prestar atenção na aula	0	1	2	3	4
2. Eu esqueço as coisas	0	1	2	3	4
3. Eu tenho problemas em acompanhar os trabalhos da classe	0	1	2	3	4
4. Eu falto na escola por não estar me sentindo bem	0	1	2	3	4
5. Eu falto na escola para ir ao médico ou hospital	0	1	2	3	4

E - PedsQLTM4.0 Relato dos pais sobre o adolescente (13-18 anos)

No último mês, quanto seu filho (a) tem tido problemas com...

Capacidade Física (problemas com...)	Nunca	Quase Nunca	Algumas Vezes	Freqüentemente	Quase Sempre
1.Andar mais de um quarteirão	0	1	2	3	4
2.Correr	0	1	2	3	4
3.Participar de atividades esportivas ou exercícios	0	1	2	3	4
4.Levantar alguma coisa pesada	0	1	2	3	4
5.Tomar banho de banheira ou chuveiro sozinho	0	1	2	3	4
6.Fazer as tarefas do dia-a-dia da casa	0	1	2	3	4
7.Ter dor ou machucado	0	1	2	3	4
8. Pouca energia	0	1	2	3	4

Aspecto Emocional (problemas com...)	Nunca	Quase Nunca	Algumas Vezes	Freqüentemente	Quase Sempre
1.Sentir medo ou ficar assustado	0	1	2	3	4
2. Ficar triste ou deprimido	0	1	2	3	4
3. Ficar com raiva	0	1	2	3	4
4.Dificuldade para dormir	0	1	2	3	4
5. Ficar preocupado	0	1	2	3	4

Aspecto Social (problemas com...)	Nunca	Quase Nunca	Algumas Vezes	Freqüentemente	Quase Sempre
1.Conviver com outros adolescentes	0	1	2	3	4
2. Outros adolescentes não querem ser amigos dele (a)	0	1	2	3	4
3. Outros adolescentes provocam seu filho (a)	0	1	2	3	4
4. Não consegue fazer coisas que outros adolescentes da mesma idade fazem	0	1	2	3	4
5. Acompanhar outros adolescentes	0	1	2	3	4

Atividade Escolar (problemas com...)	Nunca	Quase Nunca	Algumas Vezes	Freqüentemente	Quase Sempre
1.Prestar atenção na aula	0	1	2	3	4
2.Esquecer as coisas	0	1	2	3	4
3.Acompanhar os trabalhos da classe	0	1	2	3	4
4.Faltar na escola por não estar se sentindo bem	0	1	2	3	4
5.Faltar na escola para ir ao médico ou hospital	0	1	2	3	4