Bernadete de Lourdes Liphhaus

**Expressão das proteínas Fas e Bcl-2 em células
mononucleares de crianças e adolescentes com lúpus
eritematoso sistêmico**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Área de concentração: Pediatria

Orientadora: Profa. Dra. Maria Helena Bittencourt Kiss

Co-orientadora: Dra. Claudia Goldenstein-Schainberg

São Paulo

2005

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Liphaus, Bernadete de Lourdes

Expressão das proteínas Fas e Bcl-2 em células mononucleares de crianças e adolescentes com lúpus eritematoso sistêmico / Bernadete de Lourdes Liphaus.

-- São Paulo, 2005.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Departamento de Pediatria.

Área de concentração: Pediatria.

Orientadora: Maria Helena Bittencourt Kiss.

Co-orientadora: Claudia Goldenstein-Schainberg.

Descritores: 1.LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO/fisiopatologia 2.APOPTOSE
3.ANTÍGENOS CD95 4.PROTEÍNAS PROTO-ONCOGÊNICAS C-BCL-2
5.CRIANÇA 6.ADOLESCENTE 7.AUTO-IMUNIDADE 8.CITOMETRIA DE
FLUXO 9.ÍNDICE DE GRAVIDADE DE DOENÇA

USP/FM/SBD-344/05

DEDICATÓRIA

À minha família pela presença e estímulos constantes.

Ao Jorge por seu amor, compreensão e paciência.

À Profa. Dra. Maria Helena Bittencourt Kiss pela paciente orientação, por sua contribuição à minha formação profissional e pessoal e por sua excepcional capacidade científica.

À Dra. Claudia Goldenstein-Schainberg pelo apoio na realização desta tese.

AGRADECIMENTOS

Às crianças e adolescentes e seus pais pela colaboração na realização desta tese.

Aos Prof. Dr. Flávio Adolfo Costa Vaz, Prof. Dr. Yassuhiko Okay e Profa. Dra. Madga M. Sales Carneiro Sampaio pelo apoio na realização desta tese.

À Profa. Dra. Eloísa Silva Dutra de Oliveira Bonfá pela oportunidade de integração entre os Departamentos de Reumatologia e de Pediatria.

Ao Dr. Clovis Artur Almeida Silva, por sua dedicação a Reumatologia Pediátrica. Aos demais colegas da Unidade de Reumatologia do Instituto da Criança: Adriana Maluf Elias Sallum, Lucia Maria M. de Arruda Campos, Ana Paola Navarrete Lotito, aos pós-graduandos e residentes, pelo apoio e colaboração durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Claudio Leone por seu auxílio na realização da análise estatística.

À Dra. Beatriz Beitler e à Dra. Juliana Pereira pela oportunidade e orientação durante meu aprendizado das técnicas laboratoriais empregadas no estudo da apoptose.

Às colegas do Laboratório de Imunopatologia do HCFMUSP, Sueli Satiko Iogery, Maristela Tsujita, Graciella Aparecida Brocardo Lima, Nadia Shigueoka e Lucilla Gonçalves Viana pelo inestimável auxílio durante o aprendizado dos testes laboratoriais deste estudo e por sua dedicação e capacidade técnica na realização das imunofenotipagens.

À bióloga Solange Carrasco por seu auxílio na realização das marcações celulares realizadas neste estudo.

Aos colegas da Vigilância Epidemiológica, Arlete, Mari, Adalgiza, Farida, Dona Odete, Toninho e Sr. Augusto por sua colaboração e compreensão durante a realização desta tese.

Aos amigos Leonardo, José Luiz, Fábio, Paulo, Patrícia e Letícia, pelo apoio e amizade ao longo destes anos.

NORMATIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com:

Referências: Adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*.

Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2004.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com o *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO	0
1.1. Lúpus eritematoso sistêmico	2
1.2. Etiopatogenia do lúpus	5
1.3. Apoptose e LES	21
1.4. Proteínas Fas e Bcl-2 e LES	28
2. OBJETIVOS	35
3. REVISÃO DA LITERATURA	37
3.1. Apoptose	38
3.2. A Proteína Fas	47
3.3. A Proteína Bcl-2	49
4. MÉTODOS	53
4.1. Pacientes e Controles	54
4.2. Informações clínicas e laboratoriais	55
4.3. Pesquisa da expressão do Fas e Bcl-2 em células mononucleares ..	57
4.4. Citometria de fluxo	61
4.5. Análise estatística	67
5. RESULTADOS	68
5.1. Casuística	69
5.2. Estudo da proteína Fas	74
5.3. Estudo da proteína Bcl-2	78
5.4. Correlação entre as proteínas Fas e Bcl-2 e o SLEDAI	82

6. DISCUSSÃO	87
7. CONCLUSÕES	103
8. ANEXOS	105
9. REFERÊNCIAS	119

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACR	Colégio Americano de Reumatologia
AICD	Morte celular induzida
APAF-1	“Apoptotic protease-activating factor-1” ou protease ativadora do fator 1 da apoptose
APC	Célula apresentadora de antígeno
ARJ	Artrite reumatóide juvenil / Artrite idiopática juvenil
ATP	Adenosina trifosfato
Blebs	Vesículas citoplasmáticas envoltas por membrana celular e desprovidas de organelas
Bcl-2	Proteína intra-citoplasmática que inibe a apoptose
CARD	“Caspase recruitment domain” ou domínio de recrutamento das caspases
CD	“Cluster of differentiation” ou agrupamento de diferenciação
CD3+	Linfócitos T
CD4+	Linfócitos T auxiliares
CD8+	Linfócitos T citotóxicos
CD19+	Linfócitos B
Corpúsculos apoptóticos	Vesículas citoplasmáticas envoltas por membrana celular e repleta de organelas
Cy5	Fluorocromo de cor vermelha
DM	Dermatomiosite juvenil
DNA	Ácido desoxiribonucleico

Dot-plot	Gráfico de dispersão de pontos
DP	Desvio padrão
EDTA	Ácido etilenodiamino-tetracético
ELISA	Ensaio imunenzimático
FACS	“Fluorescence-activated cell sorting”
FADD	“Fas-associated death domain” ou domínio de morte associado ao Fas
FAN	Anticorpos antinucleares
Fas ou CD95 ou APO-1	Receptor ou proteína de membrana pró-apoptose
Fas ligante ou CD95L	Proteína de membrana que se liga ao Fas
FITC	Fluorocromo isotiocianato de fluoresceína – cor verde
FSC	Fotodetector frontal do citômetro, corresponde ao tamanho da célula
HLA	“Human leukocyte antigen” ou antígenos leucocitários humanos ou antígenos de histocompatibilidade
IF	Imunofluorescência
IMF	Intensidade média de fluorescência
IL-1	Interleucina 1
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12

LES	Lúpus eritematoso sistêmico
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
PBS	Solução tampão fosfato salino
PE	Fluorocromo de ficoeritrina – cor laranja
SDA	Controles sem doença autoimune
SLEDAI	“Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index” ou Índice de atividade do lúpus eritematoso sistêmico
SLICC	Índice de dano no lúpus eritematoso sistêmico
SSC	Fotodetector lateral do citômetro, corresponde à complexidade ou granularidade da célula
TGF- β 1	Fator de crescimento transformador β 1
Th1	Linfócito T auxiliar 1
Th2	Linfócito T auxiliar 2
TNF	Fator de necrose tumoral
TNFR	Receptor do TNF
TRADD	TNFR-associated death domain” ou domínio de morte associado ao receptor de TNF
TRAIL	“TNF-related apoptosis inducing ligand” ou ligante indutor de apoptose associado ao TNF
TWEAK	“TNF-like weakindicer of apoptosis” ou indutor fraco de apoptose semelhante ao TNF
VCAM-1	Molécula de adesão vascular 1

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Seqüência de mudanças ultra-estruturais durante o processo de apoptose (2-4) e durante a necrose (5-6) de uma célula normal. (Adaptado de Pereira, 2000).41
- Figura 2** - Esquema da partícula passando através do raio laser e a luz que se dispersa sendo captada pelos fotodetectores frontal e lateral (Adaptado de Bacal et al., 2003).65
- Figura 3** - Gráfico de dispersão de pontos (dot-plot) de acordo com o tamanho (FSC) e a granularidade (SSC) das células (Adaptado de Bacal et al., 2003).66
- Figura 4** - Seleção da população linfocitária total, na região R1, de pequeno tamanho (FSC) e baixa granularidade (SSC) (A) e citograma (dot-plot) delimitando pela intersecção de duas retas perpendiculares aos eixos X e Y as subpopulações não marcadas, marcadas com um fluorocromo e duplamente marcadas (A e B) (Adaptado de Bacal et al., 2003).66
- Figura 5** - Exemplo de citograma ou dot-plot dos linfócitos T CD3+, CD4+, CD8+ e dos linfócitos B CD19+ que expressavam a proteína Fas de um paciente com lúpus e de um indivíduo sem doença autoimune.77
- Figura 6** - Exemplo de citograma ou dot-plot dos linfócitos T CD3+, CD4+, CD8+ e dos linfócitos B CD19+ que expressavam a proteína Bcl-2 de um paciente com lúpus e de um indivíduo sem doença autoimune.81
- Figura 7** - Correlação entre as porcentagens de linfócitos B (CD19+) dos pacientes lúpicos que expressavam a proteína Fas e o SLEDAI.84
- Figura 8** - Correlação entre as porcentagens de linfócitos B (CD19+) dos pacientes lúpicos que expressavam a proteína Bcl-2 e o SLEDAI.86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características demográficas dos 38 pacientes lúpicos e dos grupos controles	71
Tabela 2 – Características clínicas dos 38 pacientes lúpicos.....	72
Tabela 3 – Autoanticorpos dos 38 pacientes lúpicos.....	72
Tabela 4 – Terapêutica utilizada pelos pacientes com lúpus eritematoso sistêmico, com artrite reumatóide juvenil e com dermatomiosite à admissão ao estudo	73
Tabela 5 – Porcentagem de linfócitos T e B que expressavam a proteína Fas dos pacientes e controles – Média $\pm$ desvio padrão (DP).....	76
Tabela 6 – Intensidade média de fluorescência (IMF) da proteína Fas nos linfócitos T e B dos pacientes e controles – Média $\pm$ desvio padrão (DP)	76
Tabela 7 – Porcentagem de linfócitos T e B que expressavam a proteína Bcl-2 dos pacientes e controles – Média $\pm$ desvio padrão (DP).....	80
Tabela 8 – Intensidade média de fluorescência (IMF) da proteína Bcl-2 nos linfócitos T e B dos pacientes e controles – Média $\pm$ desvio padrão (DP)	80
Tabela 9 – Porcentagem de linfócitos T e B que expressavam a proteína Fas nos pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES) com doença ativa (SLEDAI $\geq$ 08) e com doença inativa (SLEDAI $<$ 8) e nos controles sem doença autoimune – Média $\pm$ desvio padrão (DP).....	83
Tabela 10 – Intensidade média de fluorescência (IMF) da proteína Fas nos linfócitos T e B dos pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES) com doença ativa (SLEDAI $\geq$ 08) e com doença inativa (SLEDAI $<$ 8) e nos controles sem doença autoimune – Média $\pm$ desvio padrão (DP).....	83

Tabela 11 – Porcentagem de linfócitos T e B que expressavam a proteína Bcl-2 nos pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES) com doença ativa (SLEDAI $\geq$ 08) e com doença inativa (SLEDAI $<$ 8) e nos controles sem doença autoimune – Média $\pm$ desvio padrão (DP).....85

Tabela 12 – Intensidade média de fluorescência (IMF) da proteína Bcl-2 nos linfócitos T e B dos pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES) com doença ativa (SLEDAI $\geq$ 08) e com doença inativa (SLEDAI $<$ 8) e nos controles sem doença autoimune – Média $\pm$ desvio padrão (DP).....85

RESUMO

Liphaus, B. *Expressão das proteínas Fas e Bcl-2 em células mononucleares de crianças e adolescentes com lúpus eritematoso sistêmico* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2005. 149p.

INTRODUÇÃO: Fas e Bcl-2 são as principais proteínas envolvidas no controle do processo de apoptose em células imunocompetentes. Alterações no processo de apoptose podem estar envolvidas na patogênese de doenças autoimunes como o lúpus eritematoso sistêmico (LES). **OBJETIVO:** Verificar a expressão das proteínas Fas e Bcl-2 em linfócitos T e B de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico de início na infância e suas correlações com a atividade da doença. **MÉTODOS:** Trinta e oito pacientes com LES (média de idade de início da doença 10,0 anos; 32 do sexo feminino) e 25 indivíduos sem doença autoimune (grupo controle) pareados por sexo e idade foram incluídos no estudo. Dezenove pacientes com artrite reumatóide juvenil (ARJ) e 10 pacientes com dermatomiosite juvenil (DM) também foram avaliados. Vinte e sete pacientes lúpicos com SLEDAI ≥ 8 foram considerados com doença ativa. Linfócitos isolados de sangue periférico foram identificados com os anticorpos monoclonais anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD19, anti-CD95(Fas) e anti-Bcl-2. A expressão destas moléculas foi medida por citometria de fluxo. A análise estatística utilizou o teste de Kruskal-Wallis e o coeficiente de correlação de Sperman. **RESULTADOS:** As médias das porcentagens de linfócitos que expressavam a proteína Fas foram significativamente maiores ($p < 0,05$) nos pacientes com LES comparadas com o grupo controle nas células T CD3+ ($43,7 \pm 10,3$ vs $31,2 \pm 9,1$), CD8+ ($21,5 \pm 9,6$ vs $12,5 \pm 5,9$) e nas células B CD19+ ($2,1 \pm 1,4$ vs $1,2 \pm 0,5$). A intensidade média de fluorescência (IMF) da proteína Fas nos linfócitos T e B dos pacientes com LES foi semelhante a do grupo controle. As médias das porcentagens de linfócitos que expressavam a proteína Bcl-2 não foram diferentes nos pacientes com LES e nos controles. A IMF da proteína Bcl-2 nos pacientes com LES foi significativamente maior ($p < 0,05$) comparada ao grupo controle nos linfócitos T CD3+ ($28,8 \pm 8,4$ vs $26,0 \pm 7,2$), CD4+ ($28,6 \pm 8,2$ vs $25,9 \pm 7,2$) e CD8+ ($29,4 \pm 9,4$ vs $25,5 \pm 6,7$). Os pacientes com ARJ e DM apresentaram expressões das proteínas Fas e Bcl-2 nos linfócitos T e B semelhantes ao grupo controle. Pacientes lúpicos com doença ativa apresentavam porcentagens de linfócitos B que expressavam a proteína Fas significativamente maiores ($p < 0,05$) ($3,2 \pm 1,7$) que os pacientes com doença inativa ($1,7 \pm 1,0$) e os controles ($1,2 \pm 0,5$) e houve correlação direta entre a porcentagem de linfócitos B que expressavam a proteína Fas e o SLEDAI ($p = 0,02$, $r = 0,38$). Pacientes lúpicos com doença ativa apresentaram porcentagens de linfócitos T CD4+ que expressavam a proteína Fas significativamente maiores ($23,9 \pm 7,8$) em relação ao grupo controle ($17,9 \pm 6,3$). Pacientes lúpicos com doença ativa apresentavam IMF da proteína Bcl-2 significativamente maiores ($p < 0,05$) nos linfócitos T CD3+, CD4+ e CD8+ comparadas ao grupo controle. Fato não observado nos pacientes com doença inativa. Houve correlação direta entre a porcentagem

de linfócitos B CD19+ que expressavam a proteína Bcl-2 e o SLEDAI ($p=0.04$, $r=0.47$). CONCLUSÃO: A presença de linfócitos T e B com aumento da expressão das proteínas Fas e Bcl-2 nos pacientes com LES é evidência de alteração na regulação do processo de apoptose nesta doença autoimune. Este estudo mostra correlação entre a expressão das proteínas Fas e Bcl-2 e a atividade da doença e sugere que os pacientes lúpicos com doença ativa e com doença inativa apresentam perfis diferentes de expressão destas proteínas nos linfócitos T e B.

Descritores: 1.LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO/fisiopatologia
2. APOPTOSE 3.ANTÍGENOS CD95 4.PROTEÍNAS PROTO-ONCOGÊNICAS C-BCL-2 5.CRIANÇA 6.ADOLESCENTE 7.AUTO-IMUNIDADE 8.CITOMETRIA DE FLUXO 9.ÍNDICE DE GRAVIDADE DE DOENÇA

SUMMARY

Liphaus B. *Expression of Fas and Bcl-2 proteins on mononuclear cells from children and adolescents with systemic lupus erythematosus* [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2005. 149p.

INTRODUCTION: Fas and Bcl-2 are the main proteins involved in the control of the apoptosis process in immunocompetent cells. Defective regulation of apoptosis may play a role in the development of autoimmune diseases such as systemic lupus erythematosus (SLE). **OBJECTIVE:** To verify the expression of Fas and Bcl-2 proteins on peripheral blood T and B lymphocytes in patients with juvenile-onset systemic lupus erythematosus and their relationship with disease activity. **METHODS:** Thirty-eight patients with SLE (mean disease onset 10.0 years; 32 female) and 25 sex- and age-matched healthy controls entered the study. Twenty-nine patients with juvenile rheumatoid arthritis (JRA) and 10 with juvenile dermatomyositis (JDM) were also included. Twenty-seven SLE patients with SLEDAI score ≥ 8 were considered with active disease. Freshly isolated peripheral blood lymphocytes were stained for the lymphocyte markers CD3, CD4, CD8, CD19 and for Fas and Bcl-2 molecules. Expression was measured by three-color flow cytometry. Statistical analysis was performed by the use of Kruskal-Wallis test and the Sperman's rank. **RESULTS:** Percentages of freshly isolated lymphocytes positively stained for Fas antigen from SLE patients were significantly increased ($p < 0,05$) compared to healthy controls on CD3+ T cells ($43,7 \pm 10,3$ vs $31,2 \pm 9,1$), on CD8+ T cells ($21,5 \pm 9,6$ vs $12,5 \pm 5,9$) and on CD19+ B cells ($2,1 \pm 1,4$ vs $1,2 \pm 0,5$). Mean fluorescence intensity (MFI) of Fas-positive cells were similar on SLE patients and healthy controls. The percentages of lymphocytes positively stained for Bcl-2 protein did not differ between SLE patients and healthy controls. MFI of Bcl-2 positive cells from SLE patients were significantly increased ($p < 0,05$) compared to healthy controls on CD3+ T cells ($28,8 \pm 8,4$ vs $26,0 \pm 7,2$); on CD4+ T cells ($28,6 \pm 8,2$ vs $25,9 \pm 7,2$) and on CD8+ T cells ($29,4 \pm 9,4$ vs $25,5 \pm 6,7$). Patients with JRA and JDM presented Fas and Bcl-2 expressions on T and B lymphocytes similar to healthy controls. Active SLE patients presented percentages of CD19+ B cells positive for Fas antigen significantly higher ($p < 0,05$) ($3,2 \pm 1,7$) than did inactive SLE patients ($1,7 \pm 1,0$) and healthy controls ($1,2 \pm 0,5$) and there was a statistically significant direct correlation between CD19+ B cells positive for Fas and SLEDAI score ($p = 0.02$, $r = 0.38$). Furthermore, active SLE patients presented percentages of CD4+ T cells positive for Fas significantly increased ($p < 0.05$) ($23,9 \pm 7,8$) than did healthy controls ($17,9 \pm 6,3$). Only SLE patients with active disease presented MFI of Bcl-2 positive cells significantly increased ($p < 0,05$) compared to healthy controls on CD3+, CD4+ and CD8+ T cells. There was also a statistically significant direct correlation between CD19+ B cells positive for Bcl-2 and SLEDAI score ($p = 0.04$, $r = 0.47$). **CONCLUSION:** The occurrence of circulating T and B lymphocytes with abnormally high Fas and Bcl-2 expression in SLE is evidence of dysregulation of apoptosis in this

autoimmune disease. These data also show a correlation between Fas and Bcl-2 expression on mononuclear cells and disease activity and suggest that SLE patients with active and inactive disease present different profile of expression of these proteins on T and B lymphocytes.

Decriptors: 1.SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS/physiopathology
2.APOPTOSIS 3.CD95 ANTIGENS 4.PROTO-ONCOGENE PROTEINS
C-BCL-2 5.CHILD 6.ADOLESCENT 7.AUTOIMMUNITY 8.FLOW
CYTOMETRY 9.SEVERITY OF ILLNESS INDEX

1. INTRODUÇÃO

1.1. LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO

O Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é uma doença autoimune que compromete vários órgãos e sistemas, caracterizada por exacerbações e remissões e que apresenta várias alterações imunológicas (Cassidy et al., 1995).

Os primeiros relatos de LES na infância datam de 1892 e, desde então, o número de casos descritos vem aumentando. Sua incidência é de 0,6 caso por 100.000 habitantes por ano em indivíduos abaixo de 15 anos nos Estados Unidos e sua prevalência é de um caso por 2.000 habitantes por ano (Bastos et al., 1991; Sacchetti, 1991; Cassidy et al., 1995; Cassidy, 1997; Lehman, 1997; Cassidy et al., 2001; Silva et al., 2003). Apesar de poder ocorrer em qualquer idade, o LES é raro na criança abaixo de cinco anos e apresenta um pico de incidência entre 15 e 25 anos. Vinte e cinco por cento dos casos ocorrem dentro das duas primeiras décadas de vida e há predomínio do sexo feminino em todas as faixas etárias. Nos adolescentes, a relação masculino:feminino varia de 1:8 a 1:13 (Cassidy et al., 1995; Lehman, 1997; Cassidy et al., 2001).

O quadro clínico do LES é bastante polimorfo, podendo acometer qualquer órgão ou sistema e apresenta variadas evoluções e prognósticos. Por exemplo, alguns pacientes apresentam eritema malar, febre, artrite, remissão espontânea e utilizam poucos medicamentos. Outros pacientes, no

entanto, apresentam doença grave e progressiva, com envolvimento renal e de sistema nervoso central, necessitam de altas doses de corticosteróides e de imunossupressores. Qualquer sinal ou sintoma pode ser a primeira e única manifestação da doença e esta pode persistir ou recorrer por meses ou anos até o diagnóstico de LES ser confirmado pela presença de outros acometimentos (Bastos et al.,1991; Silva,1991; Mills,1994; Antolin et al.,1995; Cassidy et al.,1995; Kotzin,1996; Cassidy,1997; Lehman,1997; Silva et al., 2003).

Uma grande variedade de autoanticorpos é detectada nos pacientes com LES, os mais importantes são: os anticorpos antinucleares (FAN); os anticorpos contra o ácido desoxiribonucleico (anti-DNA) que estão associados à atividade da doença; os anticorpos contra antígenos nucleares extraíveis (anti-ENA) que compreendem os anticorpos anti-Sm, anti-RNP, anti-SSA/Ro e anti-SSB/La; os anticorpos anti-P que estão associados às manifestações psiquiátricas e a psicose lúpica e os anticorpos antifosfolípidos (anticardiolipina IgM e IgG e o anticoagulante lúpico) que se associam aos fenômenos trombóticos (Bastos et al.,1991; Antolin et al.,1995; Cassidy et al.,1995; Cabral et al.,1997; Hahm,1997b; Lehman,1997; Silva et al., 2003).

O complemento sérico é o principal exame na determinação da formação de imunocomplexos no LES. Aproximadamente 90% dos pacientes com doença ativa apresentam níveis séricos de complemento baixo (Bastos et al.,1991; Antolin et al.,1995; Cassidy et al.,1995; Cabral et al.,1997; Hahm,1997b; Lehman,1997; Silva et al., 2003).

O diagnóstico do LES baseia-se em suas manifestações clínicas e alterações laboratoriais. O critério para a classificação da doença consiste de 11 itens, revisados pelo Colégio Americano de Reumatologia (ACR) em 1982 (Tan et al., 1982) (Anexo A). Esta classificação, proposta para adultos, também é utilizada para o diagnóstico de LES em crianças e adolescentes. A presença de quatro ou mais critérios, simultâneos ou seriados em qualquer intervalo de tempo faz o diagnóstico de LES e têm sensibilidade e especificidade de pelo menos 96% em adultos e crianças (Tan et al., 1982; Cassidy et al., 1995; Cassidy et al., 2001). Em 1997, o ACR propôs mudanças nos critérios de 1982, no entanto, estas modificações ainda não foram validadas em adultos ou crianças (Hochberg, 1997; Cassidy et al., 2001).

A atividade da doença representa um fator importante de morbimortalidade associada ao LES. Atualmente, existem vários índices na literatura médica para a quantificação da atividade da doença, entretanto, destaca-se o SLEDAI (Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index), um índice de cálculo rápido, sensível e reprodutível. Proposto inicialmente para adultos, o SLEDAI tem aplicabilidade reconhecida em crianças (Bombardier et al., 1992; Okuda, 1995) (Anexo B).

O tratamento do LES é um desafio relevante, pois nenhuma intervenção terapêutica leva à cura. O tratamento medicamentoso inclui o uso de antiinflamatórios não hormonais, de antimaláricos, de corticosteróides, de drogas imunossupressoras e recentemente de agentes biológicos (Cassidy et al., 1995; Cassidy et al., 2001).

O prognóstico do LES, considerado sombrio no passado, vem melhorando sensivelmente nos últimos 30 anos. A maior sobrevida desses pacientes deve-se, ao diagnóstico precoce, ao melhor reconhecimento das manifestações clínicas, ao aperfeiçoamento dos testes laboratoriais e ao surgimento de modalidades terapêuticas mais efetivas, em especial, os corticosteróides. A taxa de sobrevida após 10 anos pode chegar a 90%. (Cassidy et al., 1995; Lehman, 1997; Cassidy et al., 2001). A presença de comprometimento renal e/ou de sistema nervoso central são fatores de impacto negativo na evolução desta patologia, representando variável importante no óbito dos pacientes. Contudo, as infecções vêm superando a insuficiência renal como principal causa de óbito no LES, provavelmente devido à imunossupressão a que estes pacientes são submetidos (Mills, 1994; Cassidy et al., 1995; Lehman, 1997).

1.2. ETIOPATOGENIA DO LÚPUS

O LES é uma doença autoimune complexa e heterogênea e apesar dos inúmeros esforços realizados, até o momento, sua etiologia e patogenia permanecem desconhecidas, permitindo uma série de especulações sobre seus possíveis fatores desencadeantes e perpetuadores. É possível que fatores infecciosos (vírus), endócrinos (estrógenos), ambientais (luz ultravioleta), imunológicos e genéticos, contribuam, de forma conjunta, para o desenvolvimento da doença (Bastos et al., 1991; Cassidy et al., 1995;

Hahm,1997a; Cassidy,1997; Silva et al., 2003). Há duas questões fundamentais nos estudos da etiopatogenia do LES. Primeiro, que alterações genéticas predispõe o indivíduo a desenvolver lúpus e segundo, como fatores externos podem influir nas alterações da tolerância imunológica. O lúpus é um exemplo de doença autoimune que acomete predominantemente mulheres. Provavelmente, o gênero feminino seja o mais importante fator de risco para o desenvolvimento desta doença. Apesar de todos os estudos já realizados há pouca informação concreta de como as diferenças hormonais contribuiriam para a autoimunidade. Os estrógenos aumentam a secreção de prolactina e de hormônio de crescimento, substâncias que contribuem para a proliferação de linfócitos, que por sua vez possuem receptores sensíveis aos estrógenos. Por meio destes receptores, os estrógenos poderiam modular as respostas imunológicas e regular a maturação dos linfócitos, e talvez comprometer a tolerância (Sullivan, 2000). Corrobora este fato, a observação que, em animais e pacientes lúpicos, os estrógenos exacerbam a doença e os andrógenos a abrandam (Sullivan, 2000).

O LES é o protótipo da doença autoimune sistêmica caracterizada por perda da tolerância imunológica a vários autoantígenos. A disfunção imune do LES envolve os linfócitos B e os linfócitos T do sistema imune adaptativo e elementos do sistema imune inato como as deficiências de proteínas do sistema complemento e o polimorfismo genético dos receptores Fc das imunoglobulinas (Andrade et al., 2000; Sullivan, 2000; Gaffney et al., 2002). Dados epidemiológicos do risco de desenvolvimento do LES em irmãos, sua

agregação familiar e sua concordância em gêmeos monozigóticos suportam o componente genético desta doença (Tsao, 2004).

O lúpus é considerado o modelo de estudo para doenças autoimunes de herança poligênica, que envolvem genes individualmente polimórficos que interagem com o ambiente levando a expressão fenotípica da doença (Passos, 2000; Sullivan, 2000). Estima-se que aproximadamente 100 genes contribuam para o desenvolvimento do LES, mas que apenas 10 a 20 destes genes estejam operantes em um paciente (Harley et al., 1998; Guo et al., 2000).

O estudo de genes candidatos revelou alguns locos, inquestionavelmente, associados ao lúpus, como os genes do sistema complemento, dos antígenos de histocompatibilidade (HLA), dos receptores de imunoglobulinas, da interleucina 10 e de outras citocinas. O mapeamento do genoma em famílias lúpicas revelou que alguns segmentos de cromossomos como: 1q 41-42; 1q 44; 1q 23; 1q 25-31; 2q 35-37; 4p 15; 2q 21-23; 6p 11-21; 7q 21; 7p 22; 10p 13; 10q 23-24; 16q 13; 20p 12; 20q 13; 1p 13; 4q 28; 11p 15; 12p 24; 18q 21-22; estão claramente envolvidos na patogênese da doença (Lindqvist et al., 1999; Shai et al., 1999; Gaffney et al., 2000; Sullivan et al., 2000; Gaffney et al., 2002; Tsao, 2004). No cromossomo 1 estão os genes da interleucina 10 (IL-10), do Fas ligante (1q23), da fração C1q do complemento e dos receptores de imunoglobulinas; no braço curto do cromossomo 6 estão os genes do sistema HLA, os genes dos componentes C2, C4a, C4b e fator B do sistema complemento, os genes do fator de necrose tumoral (TNF) α e β e o gene da prolactina; no braço longo do cromossomo 10 está o gene da proteína Fas e

no braço longo do cromossomo 18 o gene da proteína Bcl-2 (18q21-22) (Sullivan et al., 2000; Tsao et al., 1997a; Tsao et al., 1997b; Tsao, 2000; Tsao, 2004).

Embora, um grande número de genes candidatos e de possíveis mecanismos etiopatogênicos tenham sido descritos no LES, ainda não existe um modelo que explique como estes genes e fatores ambientais interagem para construir o fenótipo lúpico. Um modelo com três etapas tem sido sugerido para explicar a etiopatogenia do LES. O primeiro passo é a falha na depuração de autoantígenos, onde as deficiências do complemento estariam implicadas. O segundo passo é a fagocitose destes autoantígenos por células dendríticas imaturas na presença de citocinas inflamatórias e apresentação destes antígenos às células T. O terceiro passo é a ativação das células B pelas células T na presença de autoantígenos. As células B se transformariam, então, em plasmócitos que secretariam autoanticorpos. Provavelmente, a maioria dos pacientes desenvolve a doença se ocorrer mais de um destes passos (Walport et al., 2001).

1.2.1 Falha na depuração de autoantígenos

O sistema complemento pode ter função inflamatória e antiinflamatória, esta última comprovada por seu papel na depuração de imunocomplexos da circulação e de tecidos. As proteínas do sistema complemento ligam-se também às células apoptóticas facilitando sua depuração dos tecidos. Quando o sistema complemento falha nesta tarefa, restos de material celular, particularmente componentes do citoplasma e do

núcleo, podem acumular e suscitar resposta autoimune (Arnett,1992; Korb et al.,1997; Mevorach et al.,1998; Gershov et al,2000; Walport,2001).

O componente C1q é responsável pela depuração de células apoptóticas, ligando-se aos corpúsculos apoptóticos e favorecendo a sua fagocitose. Os componentes C3 e C4 do complemento são críticos no desenvolvimento e ativação das células B e o componente C4 está especialmente envolvido no estabelecimento da tolerância das células B (Korb et al.,1997; Prodeus et al., 1998).

O fato de indivíduos com deficiências hereditárias homozigotas das frações C1q, C1s, C1r e C4 do complemento desenvolverem LES com as respectivas prevalências de: 93%; 57% (deficiências de C1s e C1r são herdadas conjuntamente) e 75%, em contraste com a prevalência desta doença em deficientes de C2 (aproximadamente 10 a 30%), comprova sua importância na etiopatogenia do LES, no entanto, outros mecanismos devem ocorrer, pois uma pequena porcentagem de pacientes lúpicos apresenta deficiência de C1 (Gewruz et al.,1978; Browness et al.,1994; Araujo et al.,1997; Pickering et al.,2000). Observa-se ainda que indivíduos homozigotos para C1q, C4 e C2 são mais predispostos a desenvolver lúpus que os heterozigotos e que os genes dos alelos nulos de C4A e C4B estão associados ao LES em diversas populações. (Fielder et al,1983; Reveille et al.,1991a; Arnett,1992; Hartung et al.,1992 Batchelor,1993;Schur, 1995). É interessante notar que a deficiência de C3 está associada a glomerulonefrite primária e não ao LES. Isto ocorre provavelmente porque a fração C3 é necessária para a co-estimulação de células B para produzir anticorpos. Portanto, na ausência de C3 os

imunocomplexos se depositam no rim, mas não há ligação de novos anticorpos (Sullivan, 2000). Deste modo, a forte associação entre deficiências do sistema complemento e o lúpus é, provavelmente, o resultado da combinação da menor depuração de imunocomplexos e de células apoptóticas e alterações na tolerância das células B.

Botto e colaboradores (1998) observaram que ratos “knockout” para C1q apresentavam inadequada depuração de células apoptóticas e desenvolviam grave glomerulonefrite e múltiplos autoanticorpos. Recentemente, Taylor e colaboradores (2000) notaram que ratos deficientes de C4 também apresentam diminuição na depuração de células apoptóticas. Ainda, o uso do anticorpo monoclonal anti-C5 no rato NZB/NZW após o aparecimento de anticorpos anti-DNA prolongou sua sobrevivência e melhorou a função renal (Wang et al., 1996). Já, Herrmann e colaboradores (1998) observaram acúmulo importante de linfócitos apoptóticos e de corpúsculos apoptóticos ao redor de macrófagos de pacientes com LES e sugeriram que a depuração destes corpúsculos não ocorria devido a possíveis alterações nas frações iniciais do complemento.

Estudos observaram também que a proteína ligada a manose é capaz de ativar a cascata do complemento por meio da via das lecitinas, da via alternativa e da via clássica. Esta proteína reconhece IgG hipoglicosilada que é produzida durante a inflamação. Todos os polimorfismos conhecidos da proteína ligada a manose estão associados ao LES (Davies et al, 1995 a e b). Os receptores Fc para as imunoglobulinas participam na depuração de imunocomplexos e na regulação das células B. Vários polimorfismos foram

identificados nos genes dos receptores Fc e os alelos Fcy RIIA R131 e Fcy RIIIA F176 têm sido associados ao LES em alguns estudos (Rascu et al., 1997; Sullivan, 2000). A proteína amilóide sérica liga-se às células apoptóticas, aos *blebs* e a cromatina, podendo contribuir para a depuração das células apoptóticas. Ratos deficientes de proteína amilóide desenvolvem anticorpos anti-cromatina e glomerulonefrite (Bickerstaff, 1999).

1.2.2 Fagocitose de autoantígenos por células dendríticas

Os macrófagos e as células dendríticas são os principais responsáveis pela fagocitose de microorganismos, como bactérias (ou seja, do não próprio) e pelo processamento de antígenos para apresentação ao sistema imune adaptativo com conseqüente produção de citocinas inflamatórias, como o $\text{TNF}\alpha$ e a interleucina 1 (IL-1). Estas células são responsáveis também pela fagocitose e depuração das células apoptóticas (ou seja, do próprio) e produção de citocinas antiinflamatórias, como o fator de crescimento transformador $\beta 1$ ($\text{TGF}\beta 1$) e a IL-10 e inibição de citocinas inflamatórias como a IL-1 e a interleucina 12 (IL-12) (Cline, 1994; Voll et al., 1997; Albert et al., 1998; Ren et al., 1998; Schmitz et al., 1998; Abbas et al., 2000b; Santiago-Schwarz, 2004; Liu et al., 2004). Os macrófagos e células dendríticas podem fagocitar corpúsculos apoptóticos, mas apenas nestas últimas os antígenos processados são apresentados pelas moléculas HLA de classe I ou II às células T (Liu et al., 2004). Portanto, se ocorrer aumento do processo de apoptose e excesso de produção de corpúsculos apoptóticos ou ocorrer defeitos no sistema de depuração, alguns corpúsculos poderão

sofrer necrose secundária com conseqüente liberação e súbito aumento da concentração dos nucleossomos no meio extracelular o que pode ter consequências inflamatórias e imunogênicas e suscitar resposta imune contra os antígenos ou autoantígenos neles contidos (Liu et al., 2004).

Como macrófagos e células dendríticas distinguem o próprio do não próprio? Provavelmente, devido a dois mecanismos distintos, o primeiro relacionado à concentração do antígeno e o segundo a ligação de receptores específicos. Antígenos próprios encontram-se em constante e alta concentração no organismo. Já antígenos não próprios estão em baixa concentração. Quando o organismo é, por exemplo, infectado por bactérias ocorre súbito aumento da concentração dos antígenos bacterianos (Janeway et al., 2005a). No segundo mecanismo, a ligação do receptor da fosfatidilserina na célula fagocítica a fosfatidilserina da célula apoptótica é provavelmente, o sinal de “próprio” resultando em resposta antiinflamatória (Verhoven et al., 1995). Além da fosfatidilserina, proteínas do sistema complemento, C1q, C3b e C4, ligadas às células apoptóticas facilitam seu reconhecimento e fagocitose (Prodeus et al., 1998). Na ausência das proteínas do complemento a fagocitose ou depuração das células apoptóticas pode ser demorada ou menos eficiente. Conseqüentemente outras proteínas podem se ligar às células apoptóticas e torná-las imunogênicas ou ainda a demora na depuração destas células pode permitir sua progressão para necrose pós-apoptose ou secundária com conseqüente liberação do conteúdo celular e resposta inflamatória (Savill, 1993; Savill, 1997). Ainda, se ocorrer produção de autoanticorpos, estes podem opsonizar as células apoptóticas e

modificá-las. As células dendríticas as reconhecem agora como “não próprio” e ativam os linfócitos T, ou seja, perpetuam a autoimunidade (Wyllie, 1997; Manfredi et al., 1998 a e b). Deste modo, alterações ou defeitos nos receptores dos macrófagos ou células dendríticas também poderiam comprometer a depuração dos corpúsculos apoptóticos. Portanto, existem várias maneiras das células dendríticas reconhecerem e depurarem as células apoptóticas e provavelmente a autoimunidade não é causada por um único defeito neste sistema, mas são necessárias repetidas depurações inadequadas para gerar células autoreativas.

O balanço entre citocinas antiinflamatórias e inflamatórias parece ser fundamental para manter um ambiente não inflamatório durante a fagocitose de células apoptóticas. Deste modo, alterações na produção de citocinas poderiam contribuir para depuração inadequada destas células e conseqüente desenvolvimento de autoimunidade. Não está definido até o momento, se a ativação de macrófagos ou células dendríticas leva a produção de citocinas inflamatórias e antiinflamatórias, respectivamente, ou se é a presença destas citocinas que influencia a ativação de macrófagos ou células dendríticas com conseqüente apresentação ou não de antígenos aos linfócitos T (Santiago-Schwarz, 2004).

Várias alterações imunológicas relacionadas as citocinas tem sido observadas no LES e são, classicamente, consideradas importantes na sua etiopatogenia, não sabemos, no entanto, quais são geneticamente determinadas, ou seja, primárias e quais são decorrentes da interação com outros fatores, como por exemplo, o infeccioso, e, portanto secundárias a

auto-agressão sobre o sistema imune (Fauci et al., 1978; Smolen et al., 1982; Plana et al., 1994; Adans, 1996; Kotzin, 1996; Arnett, 1997).

O $\text{TNF}\alpha$ é necessário para o desenvolvimento dos órgãos linfóides secundários e é um potente ativador de macrófagos e fator de crescimento para células T e B, além de estimular o recrutamento de células apresentadoras de antígeno (APC) e poder induzir apoptose por meio da ativação das caspases. Estudos têm demonstrado que pacientes lúpicos apresentam níveis séricos de $\text{TNF}\alpha$ reduzidos ou normais e altos níveis séricos dos receptores solúveis de $\text{TNF}\alpha$ (Sullivan et al., 2000). Wilson e colaboradores (1993 e 1994) e Sullivan e colaboradores (1997) mostraram que o gene do $\text{TNF}\alpha$ apresenta polimorfismo e que o $\text{TNF}\alpha$ -308A está associado ao LES e está em desequilíbrio de ligação com o haplótipo HLA-B8/DR3. No entanto, esta associação não foi confirmada em populações africanas e chinesas (Fong et al., 1996).

Estudos também têm demonstrado níveis séricos aumentados de IL-1 em pacientes lúpicos (Blakemore et al., 1994). A produção de IL-1 e do antagonista do receptor da IL-1 estão aumentadas principalmente nos pacientes com doença grave, com lesão cutânea discóide e fotossensibilidade (Blakemore et al., 1994; Illei et al., 2004).

A IL-10 é produzida pelos linfócitos T auxiliares 2 (Th2) e inibe a apresentação de antígenos, a depuração de imunocomplexos e a produção de citocinas inflamatórias. A IL-10 ganhou destaque desde a observação que ratos deficientes em IL-10 apresentavam infiltrados inflamatórios em múltiplos órgãos (Liu et al., 2004). Nos pacientes lúpicos e em suas famílias

observou-se níveis aumentados de IL-10 sugerindo que este aumento é geneticamente determinado e não secundário à doença (Llorente et al., 1997). Sua importância no LES pode estar relacionada aos efeitos na proliferação de células B e na apoptose. O aumento da apoptose observada no LES pode estar relacionado, em parte, ao aumento da IL-10 (Georgescu et al., 1997). Uma consequência secundária ao aumento de IL-10 é a diminuição da IL-12 e do TGF- β 1 o que pode levar a outras alterações na regulação das células T (Sullivan et al., 2000). Ainda, Llorente e colaboradores (1998) trataram seis pacientes lúpicos com anti-IL-10 e obtiveram importante melhora das lesões cutâneas e efeitos discretos na lesão renal e na artrite.

A interleucina 2 (IL-2) é produzida, embora não exclusivamente, por linfócitos T auxiliares 1 (Th1) e age em linfócitos T citotóxicos e linfócitos B ativados. A IL-2 está diminuída nos pacientes com LES, sobretudo nos com doença ativa e também parece haver um menor número de receptores para IL-2 e aumento nos níveis do receptor de IL-2 solúvel (Bermas et al., 1994; Blasini et al., 1994; Illei et al., 2004).

A produção de interleucina 4 (IL-4) está aumentada nos pacientes lúpicos, mas não se correlaciona com a atividade da doença (Illei et al., 2004). A produção diminuída de IL-2 e aumentada de IL-4 nos pacientes lúpicos sugere diminuição na função dos linfócitos T auxiliares 1 e desbalanço entre os linfócitos Th1 e Th2 (Bermas et al., 1994; Blasini et al., 1994).

A interleucina 6 (IL-6) está envolvida na proliferação dos linfócitos B e sua produção está aumentada nos pacientes lúpicos, fato que corrobora com a hipótese de aumento da função Th2 nestes pacientes (Bermas et al., 1994; Linker-Israeli et al., 1998). A produção de IL-6 também é vital na troca de neutrófilos por macrófagos no tecido inflamado, ou seja, na transição da inflamação aguda para a crônica (Iiu et al., 2004).

Ainda, ratos transgênicos que apresentam expressão cutânea de interferon γ desenvolvem autoanticorpos e nefrite semelhante ao LES (Seery et al., 1997). No entanto, não foi estabelecida, até o momento, associação entre níveis elevados de interferon γ e o lúpus em humanos (Sullivan, 2000).

1.2.3 Ativação de células B pelas células T na presença de autoantígenos

A principal tarefa do sistema imune é discriminar o próprio, portanto, inofensivo, do não próprio ou patogênico. A especificidade imunológica dos receptores antigênicos dos linfócitos T e B é o resultado da combinação randômica de genes que codificam o sítio de ligação do antígeno destes receptores. Teoricamente, este processo geraria 10^9 diferentes receptores de células T, incluindo aqueles que poderiam se ligar a autoantígenos. Já está bem estabelecido que no desenvolvimento do sistema imune o surgimento de células autoreativas é inerente ao processo e desta forma o organismo lança mão dos mecanismos de tolerância central e periférica para eliminar estes clones celulares. Portanto, a tolerância é o processo que

elimina ou neutraliza células autoreativas e alterações deste sistema poderiam causar autoimunidade (Abbas, 2000a e b; Janeway, 2005a).

O processo de tolerância central e periférico dos linfócitos T e B é semelhante e depende da interação do receptor do linfócito com o antígeno apresentado associado à molécula HLA pelas células dendríticas (Janeway, 2005a). A associação entre os antígenos HLA e o lúpus pode, portanto, ser explicada pelo fato de diferentes variações alélicas das moléculas HLA possuírem diferentes habilidades para apresentar peptídeos autoantigênicos aos receptores de células T (Arnett, 1997). Linfócitos de baixa afinidade, ou que não reconhecem antígenos (seleção negativa) ou de alta afinidade ou autoreativos (seleção positiva) morrem por apoptose (deleção clonal) (Abbas, 2000 a e b; Janeway, 2005a). Os linfócitos restantes migram para os linfonodos periféricos onde eventuais linfócitos autoreativos são eliminados por meio da apoptose durante a tolerância periférica (Kamradt et al., 2001). Então, faz sentido pensarmos, que se os linfócitos não foram expostos a certos antígenos ou se por alguma alteração da tolerância central e periférica determinados linfócitos não morreram, estas células não são consideradas autoreativas e continuam circulando, deste modo se um antígeno intracelular entra em contato com estes linfócitos pode desencadear uma doença autoimune.

A maioria dos estudos demonstra que a imunidade celular está deficiente em pacientes com LES. A contagem de linfócitos T mostra uma diminuição preferencial de certas subpopulações, com um aumento da relação CD4/CD8 (Fauci et al.,1978; Smolen et al.,1982; Bermas et

al.,1994; Blasini et al,1994; Plana et al.,1994; Adans,1996; Kotzin, 1996; Arnett,1997).

A associação do LES aos antígenos de histocompatibilidade de classe II e a grande produção de autoanticorpos sugerem uma importante participação dos linfócitos T auxiliares (CD4+) na sua patogênese. Esta afirmação é corroborada pelo fato de que o tratamento de ratos modelos para o LES com anti-CD4 leva a melhora da doença e também pela observação de que linfócitos B apresentam produção de anticorpos anti-DNA aumentada quando estimulados por um clone de células T HLA-DR4 (Fauci et al.,1978; Smolen et al.,1982; Murakami et al.,1992; Bermas et al.,1994; Blasini et al,1994; Plana et al.,1994; Adans,1996; Kotzin, 1996; Arnett,1997).

Diversos trabalhos demonstram forte associação entre os haplótipos HLA-B8/DR3/DQ2/C4A0 e B7/DR2/DQ1 e o LES (Arnett, 1992; Doherty et al., 1992; Hartung et al., 1992; Batchelor, 1993; Davies et al., 1993; Goldstein et al., 1993; Davies et al., 1994; Hashimoto et al., 1994; Hong et al, 1994; Davies et al., 1995; Arnett, 1997; Hahmn, 1997b). Os antígenos HLA-DR2 e HLA-DR3 individualmente também estão associados ao LES, mas o risco relativo conferido por estes genes é baixo, de dois a três (Hahm,1997b). Estas associações, no entanto, variam com o grupo étnico estudado. O antígeno HLA-DR3 está associado ao LES nos caucasianos e o HLA-DR2 nos negros, chineses e japoneses, porém, em populações miscigenadas estas associações não foram confirmadas (Reveille et al., 1991a; Reveille et al., 1991b; Arnett, 1992; Barron et al., 1993; Fernandes et

al., 1995; Rudwaleit et al., 1995a; Rudwaleit et al., 1995b; Schur, 1995; Liphaus, 1998; Liphaus, 2002). Em um estudo com 55 crianças e adolescentes lúpicos brasileiros, com alto grau de miscigenação, o antígeno HLA-DR15 foi o mais freqüente, mas associação entre o HLA e o LES não pode ser demonstrada (Liphaus, 1998; Liphaus, 2002).

Estudos mostram que apesar da freqüência dos linfócitos B autoreativos declinar consideravelmente na transição entre as células B imaturas e as células B periféricas maduras, aproximadamente 20% dos linfócitos B periféricos ainda são reativos contra antígenos nucleares e sua eliminação depende, portanto, da tolerância periférica (Anolik et al., 2004). A tolerância das células B está claramente alterada no LES, no entanto, o mecanismo responsável por esta alteração é desconhecido. A apoptose das células B é influenciada pelas interações do Fas e do Fas ligante, pelo $TNF\alpha$, pela IL-6 e pela IL-10. Há razões para se acreditar que diferenças nas expressões destas moléculas possam contribuir para a alteração da tolerância das células B (Sullivan et al., 2000).

Alguns autores sugerem que linfócitos B que naturalmente sintetizam anticorpos antinucleares não patogênicos da classe IgM e que apresentam baixa ativação clonal e produção de anticorpos, por mecanismos ainda não estabelecidos passariam a produzir anticorpos antinucleares patogênicos, da classe IgG e apresentariam alta ativação clonal e produção de anticorpos (Shoenfield et al., 1999; Youinou et al., 1999).

A deficiência de IgA é freqüente no curso do LES e pode ser um defeito adquirido, passível de correção com a melhora das alterações

imunológicas, ou ser um defeito hereditário que favorece o seu aparecimento (Cleland et al., 1978). Existem esparsas descrições de deficiência de subclasses de IgG, particularmente da IgG2, associadas a quadros clínicos semelhantes ao LES. É descrita também a associação dos genes da cadeia pesada (Gm) e da cadeia leve (Km) das imunoglobulinas ao lúpus (Arnett et al., 1992). Recentemente, observou-se que ratos deficientes de IgM apresentavam rápido desenvolvimento de autoanticorpos IgG e glomerulonefrite (Boes et al., 2000). Kim e colaboradores (2002) mostraram que a IgM liga-se a células apoptóticas e recruta C1q e C3b contribuindo para a depuração destas células. Já Bijl e colaboradores (2002) observaram predomínio de anticorpos anti-histona e anti-DNA dupla hélice das subclasses IgG1 e IgG2 em pacientes lúpicos com doença renal quando comparados a pacientes sem nefrite.

No LES existe aumento incontestável da produção de anticorpos dirigidos não só contra autoantígenos, mas também contra a maioria dos antígenos estranhos ao organismo (ativação policlonal) e o número de linfócitos B é considerado aumentado pela maioria dos autores. Os autoanticorpos podem determinar lesão direta quando dirigidos contra a membrana de hemácias, plaquetas, leucócitos e linfócitos ou indireta pela formação de imunocomplexos que se depositam nos tecidos e fixam complemento. Em contraste, autoanticorpos contra antígenos intracelulares não são habitualmente patogênicos, e têm sido considerados como consequência do processo de autoimunidade. No entanto, este conceito tem mudado e, recentemente, no modelo murino de artrite autoimune, a

transferência de IgG de um animal doente mostrou-se capaz de induzir artrite no receptor saudável (Korganow et al., 1999).

O mecanismo de formação dos autoanticorpos é ainda desconhecido, estes poderiam se formar por reação cruzada aos antígenos estranhos com características semelhantes aos autoantígenos e podem estar associados ou não à presença de linfócitos autoreativos (Fauci et al.,1978; Smolen et al.,1982; Bermas et al.,1994; Blasini et al,1994; Plana et al.,1994; Adans,1996; Kotzin,1996; Arnett,1997).

A presença de autoanticorpos que reconhecem a superfície das células apoptóticas pode ter um importante papel na propagação e amplificação da resposta autoimune devido aos seguintes fatores: 1 - Os autoanticorpos ligam-se a moléculas expressas nos *blebs* de superfície das células apoptóticas e favorecem a ativação dos linfócitos B; 2 - Os autoanticorpos mudam a fagocitose de não inflamatória para inflamatória; 3 - Os autoanticorpos podem induzir dano e morte das células endoteliais em apoptose e 4 - Os autoanticorpos ampliam o estado procoagulante das células endoteliais em apoptose (Andrade et al.,2000).

1.3. APOPTOSE E LES

O LES caracteriza-se pela produção de anticorpos contra múltiplos antígenos nucleares, inclusive o DNA (Cassidy et al., 2001). Essa observação sugere que antígenos nucleares (autoantígenos) tornam-se

acessíveis ao meio extracelular e entram em contato com o sistema immune para que ocorra a formação de anticorpos antinucleares. Neste sentido, diversos autores têm estudado quais circunstâncias levariam a apresentação de antígenos nucleares ou autoantígenos ao sistema imune. Estes estudos têm demonstrado que, o principal mecanismo pelo qual, antígenos nucleares intactos ou não digeridos são gerados e podem ser liberados no meio extracelular é o processo de morte celular programada ou apoptose (Casciola-Rosen et al., 1994; Andrade et al., 2000; White et al., 2003). De modo análogo, alterações do processo de apoptose durante o estágio de maturação ou diferenciação dos linfócitos poderia relacionar-se ao surgimento de doenças autoimunes, uma vez que linfócitos autoreativos não seriam eliminados (Kamradt et al., 2001).

O elemento central do processo de apoptose é a clivagem do DNA, que resulta na formação do nucleossomo (complexo DNA/histona) que é imunogênico (Wyllie, 1997). Assim, durante o processo de apoptose antígenos intracelulares podem ser apresentados às células do sistema imune e, portanto desencadear autoimunidade (Casciola-Rosen et al., 1994; Ren et al., 1998; Andrade et al., 2000; White et al., 2003). Ainda, durante o processo de apoptose proteínas intracitoplasmáticas sofrem clivagem, fosforilação e redistribuição (Grren, 2003). Estas proteínas estruturalmente modificadas poderiam ser então consideradas como antígenos pelo sistema imune (Andrade et al., 2000). Em células saudáveis, algumas seqüências curtas de DNA carregam grupos metil que funcionam como controladores da ativação de determinados genes. O DNA dos imunocomplexos circulantes

em pacientes com lúpus é submetilado. In vitro, o DNA com metilação anormal pode estimular células imunes, inclusive linfócitos B (Huck et al., 1999). Estes segmentos de DNA submetilados podem ser interpretados como sinal de presença de agente causador de doença. De fato, o DNA submetilado é muito mais freqüente nas bactérias que nas células humanas (Janeway et al., 2005a). Ainda, algumas drogas, como a procainamida e a hidralazina e a luz ultravioleta (que podem causar sintomas de lúpus) são inibidores da metilação do DNA, produzindo DNA submetilado em células T, o que resultou em auto-reatividade em ratos (Huck et al., 1999).

Golan e colaboradores (1992) demonstraram que a radiação ultravioleta é capaz de promover a exposição de autoantígenos em queratinócitos. Casciola-Rosen e colaboradores (1994) demonstraram que queratinócitos expostos à radiação ultravioleta apresentam condensação nuclear e formação de *blebs* na superfície celular que são marcas clássicas de apoptose. A luz ultravioleta B libera citocromo c da mitocôndria e ativa a via intrínseca da apoptose e, deste modo, aumenta a exposição do sistema imune aos autoantígenos (Krueger et al., 2003). Casciola-Rosen e colaboradores (1994) observaram também que autoantígenos lúpicos, que em células controle não estão restritos a um compartimento celular, nos queratinócitos apoptóticos aparecem em grande concentração nos *blebs* da superfície. Altas concentrações do Ro-52kd, do DNA dupla hélice e de autoantígenos ribossomais foram observadas nos *blebs* dos queratinócitos apoptóticos. Estudos recentes têm demonstrado que outros autoantígenos também se concentram nos *blebs* da superfície da célula apoptótica, como a

fosfatidilserina (Casciola-Rosen et al., 1996; Savill, 1997). A exposição da fosfatidilserina gera um estado procoagulante o qual tem capacidade de agregar outros autoantígenos como a β 2-glicoproteína-1 (Casciola-Rosen et al., 1996). Korb e colaboradores (1997) observaram que os *blebs* da superfície dos queratinócitos ligam C1q. Esta ligação tem função crítica na depuração de células apoptóticas e a deficiência de C1q está fortemente associada ao LES, reforçando a idéia de que a depuração inadequada de células apoptóticas é importante no desenvolvimento da autoimunidade (Botto et al., 2001). Adicionalmente, Botto e colaboradores (1998) notaram que ratos deficientes de C1q desenvolviam nefrite semelhante à observada no lúpus. No entanto, Pickering e colaboradores (2001) não observaram diferença na depuração de células apoptóticas em ratos deficientes de C1q após exposição à luz ultravioleta.

Embora a depuração das células apoptóticas seja, em geral, rápida e não inflamatória, a presença de autoanticorpos muda completamente este fato. Por exemplo, os anticorpos antifosfolípidos opsonizam as células apoptóticas para a fagocitose mediada pelos macrófagos causando secreção de citocinas próinflamatórias e não de citocinas antiinflamatórias como no processo normal de fagocitose de células apoptóticas (Manfredi et al., 1998a; Manfredi et al., 1998b). Alguns estudos têm demonstrado que autoanticorpos, como os anti-DNA e os antifosfolípides também poderiam induzir apoptose (Madaio et al., 1996; Nakamura et al., 1998). Recentes estudos têm demonstrado que os anticorpos anti-DNA além de formar imunocomplexos circulantes que podem se depositar em vários tecidos e

fixar complemento, podem também ligar-se as células mesangiais do rim; penetrar células vivas e desencadear crescimento e proliferação celular; inibir ou induzir apoptose e influir na produção de citocinas inflamatórias em diferentes células (Tang et al., 2005). Os autoanticorpos podem ser ainda os responsáveis por perpetuar a autoimunidade devido a sua influência no processo de tolerância central. Antígenos como a cromatina e o DNA estão presentes em pequenas quantidades no soro. Os autoanticorpos podem se ligar a eles e depurá-los da circulação, reduzindo a quantidade de autoantígenos disponíveis para a tolerância de novas células T e B em maturação. Assim, o novo repertório de linfócitos poderia conter células autoreativas que seriam ativadas quando encontrassem estes antígenos nos tecidos periféricos (Janeway et al., 2005a).

No LES, Emlen e colaboradores (1994), Chan e colaboradores (1997) e Courtney e colaboradores (1999 a e b) observaram proporção aumentada de linfócitos periféricos apoptóticos. Emlen e colaboradores (1994) também observaram, *in vitro*, que a apoptose espontânea estava aumentada. No entanto, este aumento parece relacionar-se à fagocitose diminuída dos corpos apoptóticos (Herrmann, 1998) e não parece ser atribuído ao uso de corticosteróides (Courtney et al., 1999 a e b; Emlen et al., 1994), mas é possível que se correlacione à proporção diminuída de linfócitos periféricos Bcl-2 positivos (Chan et al., 1997) ou ao nível sérico aumentado de Fas solúvel (Courtney et al., 1999 a e b). Por outro lado, Bijl e colaboradores (2001b) não observaram diferença no número de células apoptóticas circulantes nos pacientes lúpicos e nos controles normais, sendo que após

sua indução o número de células apoptóticas foi maior nos pacientes com LES. Os fatores que influenciam o aumento da apoptose espontânea no LES são desconhecidos, embora se suspeite que as citocinas possam estar envolvidas, em especial a IL-10. (Emlen et al.,1994; Georgescu et al.,1997; Rose et al.,1997).

No LES observa-se aumento da apoptose não só dos linfócitos, mas também de outras células. Na nefrite lúpica observa-se aumento do número de células glomerulares apoptóticas e de corpúsculos apoptóticos (Hughes et al., 2005; Tinaztepe et al., 2001). Observa-se ainda aumento do número de células intraglomerulares positivas para o receptor Fas e para a proteína Bcl-2 (Takemura et al., 1995). Inclusive, nas glomerulonefrites proliferativas mesangiais, o número de células intraglomerulares positivas para Bcl-2 correlaciona-se positivamente ao grau de proliferação mesangial e de proteinúria, sugerindo que o aumento da proteína Bcl-2 pode prolongar a proliferação mesangial e contribuir para a hiper celularidade glomerular (Takemura et al., 1995). Aumento da apoptose das células hepáticas também foi observado em pacientes com LES (Mukai et al., 2000). Pacientes com hepatite lúpica apresentaram níveis séricos elevados de Fas ligante solúvel quando comparados aos indivíduos saudáveis e aos pacientes com esteatose hepática (Mukai et al., 2000).

Alterações do processo de apoptose podem ser responsáveis não só pelo desencadeamento do LES, mas podem contribuir para as reativações da doença. Os linfócitos B apresentam receptores denominados “Toll-like”, que reconhecem microorganismos e corpúsculos apoptóticos e têm a função

de co-estimular a célula B. Esta co-estimulação, ou segundo sinal, faz com que não ocorra apoptose do linfócito B e sim ativação e proliferação celular e conseqüente aumento da produção de anticorpos ou autoanticorpos (Weinstein et al., 2004). Ainda, os linfócitos T citotóxicos (CD8+) são responsáveis pela eliminação de células infectadas por vírus por meio de proteínas/enzimas citotóxicas (perfurinas e granzimas) e pela expressão de proteínas indutoras de apoptose (Fas ligante e granzima B) e sua ligação ao receptor Fas. Nestas células apoptóticas os antígenos virais localizam-se nos *blebs*, assim como os antígenos intracelulares, desta forma complexos vírus-autoantígenos podem suscitar resposta imune e autoreatividade (Navratil et al., 2004). Ainda, alguns patógenos podem prevenir a apoptose induzida por linfócitos T citotóxicos e podem secretar citocinas, alterando seu equilíbrio durante o processo de apoptose, e deste modo, comprometer a tolerância (Janeway et al., 2005a).

A importância da apoptose não se restringe à genese das doenças autoimunes, mas pode influenciar também a terapêutica e os mecanismos de sensibilidade e resistência às drogas. A maioria dos agentes quimioterápicos, independente de seus mecanismos primários de ação, e os corticosteróides induzem a morte da célula neoplásica via apoptose. Os antiinflamatórios não hormonais também são capazes de induzir apoptose em células neoplásicas (Schuler, 1994; Pereira, 2000). O aumento da expressão de algumas proteínas anti-apoptóticas como a Bcl-2 e/ou a inibição de proteínas pró-apoptóticas como o Fas associam-se à resistência às drogas citotóxicas em diversas neoplasias e talvez o mesmo possa

ocorrer nas doenças autoimunes, especialmente no LES onde vários imunossupressores têm sido usados para o controle da doença (Miyashita, 1992; Miyashita, 1993; Landowshi, 1997; Reed, 1997).

Um dos achados mais interessantes dos estudos de apoptose no LES é que se pode prever se um paciente responde ou não a corticoterapia testando *in vitro*. Seki e colaboradores (1998) observaram que um grupo de pacientes lúpicos cortico-resistentes apresentou, *in vitro*, expressão aumentada da proteína Bcl-2 nos linfócitos T CD8+ após o tratamento com corticosteróides.

Espera-se que novas estratégias terapêuticas possam ser mais efetivas e específicas quando comparadas à imunossupressão global produzida pelos corticosteróides no tratamento do LES. Para tanto é fundamental que se estabeleça quais são os 10 a 20 genes operantes em cada paciente lúpico, quais as proteínas expressas por estes genes, quais mecanismos imunológicos estão alterados e qual a melhor estratégia terapêutica para este paciente.

1.4. PROTEÍNAS FAS E BCL-2 E LES

Os estudos realizados até o momento sugerem que o aumento da apoptose no LES pode levar a autoimunidade ou seja à perda da tolerância. Por outro lado, estudos recentes demonstraram que se pode induzir tolerância ao enxerto pelo uso combinado de inibidores de CD40 e B7

associados a rapamicina. Esta tolerância requer a apoptose de células T, pois se a apoptose é inibida pelo aumento da expressão de Bcl-xl nas células T, a tolerância não é estabelecida (Ferguson et al., 2003; Li et al., 2000). Deste modo, fica claro que o processo de apoptose pode ser ou não benéfico ao organismo e que o equilíbrio entre as proteínas que induzem e inibem este processo é fundamental para garantir que células indesejáveis morram e células benéficas permaneçam. O processo de apoptose envolve a ação coordenada dos genes pró-apoptóticos, antiapoptóticos e a ativação da cadeia de enzimas (caspases) que degradam o DNA (Garicochea et al., 2001). O principal gene/proteína pró-apoptótica é o Fas e o primeiro gene/proteína anti-apoptótico descrito é o Bcl-2.

Observou-se em ratos que mutações nos genes Fas e Fas ligante, principalmente quando em homozigose podem levar a autoimunidade (Kotzin, 1996). De fato, alterações do gene Fas que previnem sua expressão, estão associadas ao fenótipo lúpico no rato MRL/lpr e no homem à síndrome linfoproliferativa autoimune (ALPS ou síndrome de Canale-Smith) (Drappa et al., 1996). Mutações do gene Fas já foram observadas em crianças com doença linfoproliferativa e evidência de autoimunidade (Rieux-Laucat et al., 1995; Kotzin, 1996; Mehmet et al., 1996). Por outro lado, Suda e colaboradores (1993) observaram que o defeito genético do rato Gld era a mutação pontual do domínio extracelular do Fas ligante. Esta proteína alterada não induz apoptose das células que expressam Fas e o rato Gld desenvolve uma doença fenotipicamente similar à observada no rato MRL/lpr (Suda et al., 1993).

Ohsako e colaboradores (1994) encontraram aumento da porcentagem de linfócitos T e B que expressavam a proteína Fas nos pacientes lúpicos com doença ativa, mas não naqueles com doença inativa. Amasaki e colaboradores (1995) observaram que linfócitos T CD4+ e CD8+ de pacientes lúpicos apresentavam maior intensidade média de fluorescência (IMF) da proteína Fas quando comparados a indivíduos normais e a pacientes com artrite reumatóide, no entanto, o mesmo não foi evidenciado por Courtney e colaboradores (1999 a e b). Adicionalmente, Bijl e colaboradores (2001a) viram aumento da porcentagem de linfócitos B que expressavam Fas em 33 pacientes com LES, tanto em relação aos controles normais quanto aos linfócitos T CD4+ e CD8+. Estes autores também observaram correlação positiva entre o aumento da porcentagem de linfócitos B que expressavam Fas e atividade da doença. Já, Amasaki e colaboradores (1995) observaram correlação inversa entre a maior IMF da proteína Fas e o menor número de linfócitos T CD4+ circulantes nos pacientes lúpicos.

Em relação ao Fas ligante, Suzuki e colaboradores (1996) e Kovacs e colaboradores (1997) observaram aumento de sua expressão em linfócitos de pacientes lúpicos. No entanto, o mesmo não foi observado por Kojima e colaboradores (2000) ao estudarem 143 indivíduos com a doença. Suzuki e colaboradores (1998) demonstraram a presença de anticorpos anti-Fas ligante em pacientes lúpicos. Estes anticorpos inibiam a apoptose de linfócitos mediada pela interação Fas e Fas ligante, o que poderia inibir a eliminação de linfócitos autoreativos. Wu e colaboradores (1996) demonstraram mutação do gene Fas ligante em um único paciente com LES.

O Fas solúvel é uma variante do receptor Fas que é capaz de inibir o processo de apoptose induzido por esta proteína. Cheng e colaboradores (1994) notaram que ratos que receberam Fas solúvel endovenoso apresentavam características autoimunes, sugerindo participação desta proteína no desenvolvimento de doenças autoimunes. A partir daí, vários estudos em humanos apontaram dados adicionais. Papo e colaboradores (1998) demonstraram aumento da relação mRNA de Fas solúvel e mRNA de Fas de membrana em pacientes com LES quando comparados aos controles normais e pacientes com artrite reumatóide e esta relação foi maior nos pacientes lúpicos com nefrite e com doença ativa. Jodo e colaboradores (1997) evidenciaram níveis séricos aumentados de Fas solúvel em pacientes lúpicos com doença ativa quando comparados aos com doença inativa e aos controles normais. Estes autores observaram também correlação positiva entre o Fas solúvel e o anti-DNA e correlação negativa com a fração C3 do complemento. De modo similar, Courtney e colaboradores (1999) correlacionaram níveis séricos aumentados de Fas solúvel em doentes lúpicos com a presença de anticorpos anti-DNA. Al-Maini e colaboradores (2000) em um estudo com 39 adolescentes e adultos lúpicos observaram que os níveis séricos aumentados de Fas solúvel se correlacionaram com o SLICC (índice de dano no SLE), com o aumento da creatinina sérica, com o “clearance” de creatinina diminuído e com a presença do anticorpo anti-Sm, mas não com o SLEDAI. No entanto, os níveis séricos do Fas solúvel não foram diferentes nos diversos grupos terapêuticos. Recentemente, Miret e colaboradores (2001) também observaram níveis séricos aumentados de

Fas solúvel e TNF- α ao estudarem 51 pacientes com LES e, igualmente, não houve correlação com o SLEDAI. É importante ressaltar que, embora a expressão do Fas e do Fas ligante na membrana dos linfócitos T e B, assim como, os níveis séricos do Fas solúvel estejam, em geral, aumentados no LES, associação entre os genes Fas e Fas ligante e esta patologia não foi consistentemente demonstrada (Lorenz et al., 1997; Rose et al., 1997; Cascino et al., 1998; Courtney et al., 1999 a e b;).

Quanto à proteína Bcl-2, observou-se em ratos que a expressão aumentada desta proteína bloqueava a seleção negativa de linfócitos T induzida por antígenos e a deleção clonal de linfócitos B autoreativos (Ivanovska et al., 2004). Desta forma, a alta expressão da proteína Bcl-2 poderia conferir às células maior sobrevivência, favorecendo seu acúmulo, e assim, o aparecimento de neoplasias e doenças autoimunes. De fato, Rose e colaboradores (1994) viram que ratos transgênicos que expressavam altas quantidades de Bcl-2 apresentavam expansão policlonal dos linfócitos B e estes linfócitos tinham sobrevivência aumentada *in vitro*. Strasser e colaboradores (1991) observaram, em ratos, que o aumento da expressão da proteína Bcl-2 correlacionava-se não só a maior sobrevivência dos linfócitos B, mas também ao fenótipo autoimune caracterizado por glomerulonefrite e altos títulos de anti-DNA e anti-Sm.

Vários autores observaram que em indivíduos com LES de início na idade adulta, a proteína Bcl-2 tem sua expressão aumentada apenas nos linfócitos T, poupando os linfócitos B (Hochembery et al., 1993; Aringer et al., 1994; Mehrian et al., 1998). De modo análogo, Falcini e colaboradores

(1999) obtiveram o mesmo resultado ao estudarem 32 pacientes com LES juvenil. Já, Gatenby e Irvine (1994) notaram alta expressão de Bcl-2 tanto em linfócitos T quanto em linfócitos B de pacientes com LES quando comparados aos controles saudáveis. No entanto, Aringer e colaboradores (1994) demonstraram aumento da IMF de Bcl-2 em linfócitos T periféricos apenas nos pacientes lúpicos com altos índices de atividade da doença. Ohsako e colaboradores (1994) evidenciaram maior porcentagem de células que expressavam Bcl-2 e, novamente, este achado restringiu-se aos linfócitos T. Por outro lado, Rose e colaboradores (1995) estudando 73 pacientes lúpicos, 20 indivíduos saudáveis e 47 pacientes com outras doenças autoimunes não viram diferença nos níveis de Bcl-2 expressos nas células mononucleares destes três grupos e não houve correlação com a atividade da doença. Contudo, Chan e colaboradores (1997) observaram proporção diminuída de linfócitos periféricos Bcl-2 positivos em pacientes com LES.

Mehrian e colaboradores (1998) em um estudo com micro-satélites demonstraram associação entre polimorfismos do gene Bcl-2 e o LES. Este estudo revelou também que a combinação dos alelos da IL-10 e do Bcl-2 conferia um risco relativo, maior que 40, para o LES. No entanto, Huang e colaboradores (1996) não observaram associação estatisticamente significativa em um estudo de ligação do gene Bcl-2 em 17 famílias caucasianas com LES. Graninger (1992) estudando 24 pacientes lúpicos observou concentração aumentada de mRNA de Bcl-2 em células mononucleares periféricas que se correlacionou a atividade da doença medida por meio do SLEDAI.

Quanto aos níveis séricos de Bcl-2, Miret e colaboradores (1999 e 2001) não observaram diferença nos níveis séricos de Bcl-2 em pacientes lúpicos e controles normais, no entanto estes autores notaram altos níveis séricos de Bcl-2 em indivíduos com doença ativa quando comparados com aqueles com doença inativa. Então, não está definida, até o momento, a exata correlação entre a expressão do Bcl-2 em células mononucleares periféricas e a atividade do LES, sua duração, suas manifestações clínicas, os achados laboratoriais ou a terapêutica utilizada (Graninger, 1992; Aringer et al., 1994; Gatenby e Irvine 1994).

Assim, fica evidente que as expressões das proteínas indutoras (Fas) e das inibidoras (Bcl-2) de apoptose podem ser diferentes nos diversos tipos celulares bem como nos diferentes estágios da doença. Deste modo, o comportamento destas proteínas precisa ser elucidado e entendido nos pacientes com LES. Além disso, a maioria dos estudos existentes avalia um número pequeno de pacientes e envolvem conjuntamente pacientes cujo início do LES ocorreu tanto na infância quanto na idade adulta, tornando estes grupos muito heterogêneos. Ademais, são escassos os estudos sobre a expressão das proteínas Fas e Bcl-2 em pacientes com LES juvenil. Este grupo de pacientes é peculiar, pois manifesta a doença antes que fatores classicamente associados ao LES, tais como os hormônios sexuais, estejam atuando e apresenta quadro clínico e evolução clínica diferente dos pacientes adultos, especialmente em relação à nefrite. Desta forma, este estudo visa contribuir para o esclarecimento das dúvidas ainda existentes na literatura mundial em relação ao perfil de expressão celular das proteínas Fas e Bcl-2 no LES, particularmente na faixa etária pediátrica.

2. OBJETIVOS

1. Determinar a expressão das proteínas Fas e Bcl-2 em células mononucleares periféricas (linfócitos T auxiliares, linfócitos T citotóxicos e linfócitos B) de pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico de início na infância.
2. Correlacionar a expressão das proteínas Fas e Bcl-2 à presença ou não de atividade da doença medida por meio do índice de atividade do LES - SLEDAI.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. APOPTOSE

O primeiro relato de que as células poderiam morrer durante o desenvolvimento do indivíduo foi emitido por Vogt (1842) citado por Clarke (1995) ao estudar células de cartilagem e notocorda. No entanto, a primeira descrição morfológica semelhante às atualmente relacionadas ao fenômeno de apoptose foi proposta por Flemming (1885) citado por Clarke (1995). Em 1951, Glücksman sugeriu que algumas células poderiam ativar mecanismos intrínsecos de morte celular sob determinados estímulos fisiológicos. Em 1965, Lockshin e Williams citados por Clarke (1995) criaram o termo "morte celular programada". Pouco depois, utilizando inibidores de síntese de proteínas, conseguiu-se bloquear este tipo de morte celular. Estudos posteriores revelaram que hepatócitos expostos a toxinas e linfócitos tratados com hormônios apresentavam aspectos morfológicos semelhantes aos descritos por Glücksman (1951). Estas alterações morfológicas desencadeadas por estímulos fisiológicos e/ou patológicos foram então denominadas de apoptose (Kerr et al., 1972).

A apoptose ou morte celular programada é um mecanismo ativo, controlado por genes que a induzem ou inibem e é fundamental para as funções biológicas normais e para manutenção da homeostase dos organismos multicelulares (Green, 2003). O processo de apoptose é responsável pela morfogênese embriológica, pela regulação do número de

células em tecidos adultos, pela eliminação de clones de linfócitos autoreativos e pela eliminação de linfócitos ativados. Além disso, a apoptose representa a via final comum pela qual a maioria dos agentes quimioterápicos induz morte celular (Reed, 1997; Pereira, 2000; Kamradt et al., 2001; Green, 2003; Krueger et al., 2003).

A apoptose é imprescindível à manutenção da homeostase do organismo, de tal forma que, alterações do equilíbrio entre proliferação e morte celular podem gerar indivíduos com malformações congênitas e predispor ao desenvolvimento de câncer, doenças autoimunes e/ou degenerativas. Quando uma célula apresenta um crescimento anormal, esta deixa de receber fatores de crescimento e entra em apoptose, e assim o organismo é protegido, por exemplo, de uma célula tumoral. No entanto, se um fator externo causa mutação que resulta na ativação de genes anti-apoptose, a célula pode proliferar desordenadamente (Kotzin, 1996; Mehmet, 1996; Staunton et al., 1998). Ainda, muitos dos eventos moleculares e celulares que são específicos da apoptose podem gerar um reservatório de autoantígenos com o potencial de iniciar doenças autoimunes. De fato, vários autoantígenos relacionados às doenças autoimunes sofrem alterações específicas como, clivagem, fosforilação e redistribuição durante o processo de apoptose (Green, 2003). Deste modo, proteínas nucleares e citoplasmáticas que normalmente estão dentro da célula são redistribuídas em pacotes, ou seja, *blebs* e corpúsculos apoptóticos durante o processo de apoptose (Wyllie, 1997). Ainda, proteínas estruturalmente modificadas quando associadas às moléculas HLA de classe II poderiam causar

respostas imunológicas diferentes daquelas normalmente observadas quando da exposição de autoantígenos não modificados (Rosen et al.,1999; Andrade et al.,2000).

No processo de apoptose as proteínas estruturais do citoesqueleto são degradadas, provocando a redução de sua resistência. Quando a membrana citoplasmática perde a resistência, o citoplasma prolunga-se irregularmente sob a forma de espículas envoltas por membrana e desprovidas de organelas, denominadas *blebs* que, gradativamente sofrem reabsorção. Simultaneamente, ocorre perda de microvilos e desmossomos, deixando a membrana citoplasmática sem contato com as células viáveis adjacentes. Paralelamente, citoplasma e núcleo se condensam e as organelas tornam-se compactas, provocando aumento da densidade celular. As pequenas fibras proteicas do centro nucleolar se separam causando fragmentação do DNA em nucleossomos (complexo DNA e histonas), seguido pelo aparecimento de fragmentos menores denominados oligossomos. Ato contínuo, o retículo endoplasmático alonga-se em direção à superfície celular, a mitocôndria torna-se disfuncional e a célula fragmenta-se em corpos apoptóticos envoltos por membrana citoplasmática e repletos de organelas (Wyllie, 1997). Estes corpos apoptóticos, gradativamente, se desprendem das células, ganham os espaços intercelulares, onde são rapidamente fagocitados por macrófagos e/ou células viáveis adjacentes sem provocar qualquer reação inflamatória local, pois a membrana citoplasmática mantém-se íntegra, enquanto os corpos apoptóticos são fagocitados (Savill et al., 1993).

Este tipo de morte celular contrasta com a necrose, na qual há quebra da integridade da membrana celular e os conteúdos celulares são enzimaticamente degradados e liberados, resultando em reação inflamatória local (Abbas et al., 2000). A morte celular por necrose é essencialmente patológica, enquanto a apoptótica pode ser desencadeada por estímulos fisiológicos e/ou patológicos (Abbas et al., 2000) (Figura 1).

Célula normal

Figura 1 - Sequência de mudanças ultra-estruturais durante o processo de apoptose (2-4) e durante a necrose (5-6) de uma célula normal. (Adaptado de Pereira, 2000).

Ao contrário da necrose, a apoptose é um mecanismo ativo e envolve a ação coordenada de genes pró-apoptóticos, antiapoptóticos e ativação da cadeia de enzimas (caspases) que degradam o DNA. Este grupo de genes codifica uma vasta família de proteínas que funcionam sob a forma de dímeros, umas inibindo e outras promovendo a apoptose (Garicochea et al., 2001).

A morte celular por apoptose é essencialmente iniciada por duas vias distintas: a via extrínseca que inicia-se com a agregação de receptores de morte e a via intrínseca que inicia-se com a liberação de fatores mitocondriais. Na primeira via, proteínas pertencentes a família do TNF como: o TNF- α , o TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand), o TWEAK (TNF-like weakinducer of apoptosis) e o Fas ligante, ligam-se aos seus respectivos receptores de morte (TNFR e o Fas), com subsequente formação do complexo de indução e sinalização de morte, o FADD (Fas-associated death domain) ou o TRADD (TNFR-associated death domain) que recruta a pró-caspase 8. Quando a quantidade de caspase 8 recrutada é suficiente, esta cliva e ativa diretamente as caspases efetoras (células tipo I), no entanto, quando a quantidade recrutada de caspase 8 é insuficiente esta indiretamente cliva a proteína Bid que subsequentemente induz caspases efetoras mediadas pela mitocôndria (células tipo II). Portanto, existem dois tipos de células quanto ao desencadeamento da apoptose via receptores de morte. As células tipo I, como os timócitos, onde a apoptose é desencadeada por uma via independente da mitocôndria e não pode ser bloqueada pela proteína Bcl-2; e as células tipo II, como os hepatócitos,

onde a apoptose é desencadeada por uma via alternativa, dependente da mitocôndria, podendo ser bloqueada pelas proteínas Bcl-2 e Bcl-xl (Scaffidi et al., 1998; Krueger et al., 2003; Festjens et al., 2004). Na segunda via, a CARD (caspase recruitment domain) liga-se a APAF-1 (apoptotic protease-activating factor-1) ativa e a caspase 9, conduzindo a célula a fase de degradação (Ju et al., 1995; Mevorach, 2003; Festjens et al., 2004; Ivanovska et al., 2004). A APAF-1 é ativada pelo citocromo c. Normalmente, a APAF-1 e o citocromo c estão separados no espaço intermembranas da mitocôndria. No entanto, durante a apoptose ocorre a permeabilização da membrana externa da mitocôndria e a APAF-1 liga-se ao citocromo c. A permeabilização da membrana externa da mitocôndria é regulada pelas proteínas da família Bcl-2 (Green, 2003).

O processo de apoptose pode ser dividido em três fases distintas: 1 - fase de indução, dependente de estímulos indutores de morte. 2 - fase efetora, na qual ocorre ativação do centro executor da apoptose fazendo com que as células se tornem comprometidas com a morte. 3 - fase de degradação, onde as células adquirem peculiaridades morfológicas e bioquímicas típicas da apoptose. Nesta sequência de eventos existe um ponto no qual a célula se torna irreversivelmente condicionada a perder suas funções essenciais. Em que momento apoptótico ocorre este condicionamento e quais as alterações bioquímicas definidoras deste ponto são questões ainda sem resposta. Entretanto, quando esclarecidas, terão grande impacto no entendimento da participação da apoptose no desenvolvimento e na homeostasia do indivíduo e em diversas doenças (Green et al., 1998).

Na fase de indução os sinais provenientes do meio extracelular são responsáveis pela manutenção da vida (sinais de sobrevivência) ou desencadeamento da apoptose (estímulos pró-apoptóticos). Estes sinais são captados pelas células por meio de moléculas de integrinas estruturadas na membrana citoplasmática. Os fatores de crescimento e as citocinas são estímulos de sobrevivência capazes de bloquear a apoptose. Estas substâncias podem agir ativando ou desativando genes homólogos de Bcl-2, ou formando multímeros com moléculas envolvidas na regulação da apoptose (Vaux et al., 1999). Diferentes estímulos fisiológicos e/ou patológicos como o fator de necrose tumoral, a ativação dos receptores CD28, as granzimas liberadas por células citotóxicas, a progesterona, os corticosteróides, as irradiações ionizantes, as toxinas bacterianas, os agentes oxidantes, os radicais livres de oxigênio, as infecções virais, a luz ultravioleta, a hipoxia, os anticorpos monoclonais anti-CD95 e anti-CD3 e os agentes quimioterápicos, geram estresse celular e podem desencadear a morte celular programada (Andrade et al., 2004).

Após a ação dos indutores de apoptose, desencadeia-se a cascata de sinalização no interior da célula na qual várias moléculas e proteínas interagem para transmitir os estímulos da membrana em direção ao citoplasma e núcleo. Estes estímulos modificam o estado de ativação de proteínas e a expressão de genes necessários à modulação (facilitadores ou bloqueadores) e à execução da apoptose. As cisteíno-proteases ou caspases são responsáveis pelo processo final de execução da apoptose. São conhecidas, até o momento, 14 caspases atuando na ativação de citocinas inflamatórias ou na modulação da apoptose (Salvesen et al., 1997).

As proteínas inibidoras do processo de apoptose constituem um novo grupo de reguladores negativos da morte celular programada conservados durante a evolução. Embora o mecanismo pelo qual, estas proteínas suprimem a morte celular programada ainda permaneça por ser esclarecido, a única ação dos inibidores da apoptose claramente identificada é o bloqueio das caspases. As proteínas humanas inibidoras da apoptose, ligadas ao cromossomo X, são capazes de bloquear a ativação das caspases -3 e -7 via citocromo-c e, por conseguinte, a fragmentação do DNA. Entretanto, não inibem as caspases -1, -6, -8 e -10 (Deveraux et al., 1997).

O reconhecimento das células apoptóticas por fagócitos é condição essencial para a rápida depuração das mesmas. Este reconhecimento depende da exposição de moléculas na superfície externa da célula apoptótica, secundária à modificação de componentes habituais existentes na membrana citoplasmática e/ou à exteriorização de moléculas intrínsecas de sua camada interna (Savill, 1997). Em contrapartida, as células fagocitárias adjacentes devem possuir receptores capazes de reconhecer as moléculas expostas e efetuarem a fagocitose dos corpos apoptóticos (Savill, 1993). Um dos tipos de reconhecimento ocorre por meio da fosfatidilserina. Habitualmente mantida na camada interna da membrana citoplasmática pela enzima aminofosfolípide-translocase dependente de ATP, a fosfatidilserina é a primeira molécula a ser exteriorizada na superfície da célula apoptótica. Com a inativação precoce desta enzima, a fosfatidilserina é transferida para a superfície externa da membrana por uma proteína transportadora de lipídes (Martin et al., 1995). Por meio de receptores de fosfatidilserina, as

células fagocíticas reconhecem e fagocitam a célula apoptótica (Verhoven et al., 1995). Da mesma forma, em determinados tipos de células apoptóticas, algumas glicoproteínas, o VCAM-1, a vitronectina, entre outros podem ser reconhecidos por receptores específicos de macrófagos (Savill et al., 1993; Savill et al., 1997).

O grande número de receptores em células fagocíticas empenhados no reconhecimento das células apoptóticas reflete a importância da depuração destas células. Concomitantemente ao retardo na depuração dos corpos apoptóticos, observa-se aparecimento de aspectos morfológicos compatíveis com morte celular por necrose. Com o retardo da fagocitose, a densidade da célula apoptótica declina e em pouco tempo a membrana citoplasmática torna-se permeável aos corantes, como azul trypan e iodeto de propídio. À microscopia eletrônica observam-se diversas espículas partindo da membrana citoplasmática, em contraste com a cromatina nuclear bastante proeminente e em forma de bloco. Este fenômeno, conhecido como necrose secundária, ocorre in vitro em decorrência do retardo na depuração da célula apoptótica, promovendo conseqüências catastróficas como inflamação e lesão tecidual (Voll et al., 1997; Wyllie, 1997).

A apoptose tem papel essencial no sistema imune. Durante o desenvolvimento do sistema imunológico o processo de apoptose é responsável pela eliminação de clones de células T e B autoreativas, ou seja, clones que reconheceriam antígenos próprios e iniciariam resposta imune. Portanto, o processo de apoptose inadequado ou inefetivo nesta fase do desenvolvimento do sistema imune resultaria na manutenção de linfócitos

cujos receptores poderiam reconhecer autoantígenos que lhes fossem apresentados e iniciariam resposta imune (Abbas et al., 2000a). A apoptose é fundamental também na eliminação de células T durante a fase final da resposta imune. A resposta imune adaptativa aos antígenos estranhos é caracterizada basicamente pela ativação de células T. Terminada a resposta imune, a maioria dos linfócitos T específicos é eliminado para manter a homeostase da população de células T e apenas uma pequena porcentagem destas células sobrevive formando a população de células T de memória. A eliminação destas células T é chamada de morte celular induzida (AICD) e ocorre por apoptose ou por diminuição local das citocinas (Krueger et al., 2003). No entanto, a apoptose só ocorre nas células T ativadas por longos períodos. Células T em repouso ou ativadas por curtos períodos são resistentes à morte celular mediada pelo Fas, sugerindo uma modulação desta cascata de sinalização mediada provavelmente pela Bcl-xl (Krueger et al., 2003).

3.2. A PROTEÍNA FAS

A principal proteína pró-apoptótica é o Fas. A proteína Fas pertence à superfamília do receptor do TNF. O gene da proteína Fas (APO1 / CD95), localizado no braço longo do cromossomo 10, na região 2.3 (10q2.3), transcreve um receptor transmembrânico composto de 319 aminoácidos e peso molecular de 40KDa a 50KDa o qual, após sua ligação com o Fas

ligante, induz apoptose por meio de seu domínio citoplasmático (Lichter et al., 1992; Ju et al., 1995). O Fas solúvel é uma variante do receptor transmembrânico que não possui o segmento transmembrânico, resultante de um “splicing” de mRNA alternativo e é capaz de inibir a apoptose induzida pelo Fas in vitro (Cheng et al., 1994).

A proteína Fas é detectada normalmente em células do timo, fígado, coração, rins e ovários. Na linhagem hematopoética, células precursoras (CD34+) em repouso não expressam Fas, porém, o fazem ao serem estimuladas. Entretanto, as células mais diferenciadas, a exemplo de monócitos e granulócitos, quase sempre expressam a proteína Fas em maior porcentagem (Digiuseppe et al., 1996). Em condições normais, a porcentagem de linfócitos T CD95+ é maior em relação à população de linfócitos B e na subpopulação T CD4+ em relação a T CD8+ (Digiuseppe et al., 1996; Pereira, 2000). Linfócitos T em repouso expressam pequenas quantidades de Fas, que aumentam rapidamente durante sua ativação (Krueger et al., 2003).

O mais importante ativador do receptor Fas é o Fas ligante (CD95L), também denominado, fator de morte de Fas (Suda et al., 1993; Nagata et al., 1995). O gene do Fas ligante está localizado na região 1q23 do cromossomo 1. Poucos linfócitos B, macrófagos, fibroblastos, células do estroma tímico, da retina, da córnea e endoteliais expressam o Fas ligante. Entretanto, a maioria dos linfócitos T ativados expressa esta proteína (Anel et al., 1994). A interação do Fas ligante nas células efectoras com o seu receptor Fas nas células alvo induz um sinal de morte por apoptose nas últimas (Suda et al., 1993).

A interação Fas e Fas ligante participa ativamente em três processos fisiológicos de apoptose: deleção periférica de linfócitos T maduros ativados após a resposta imune, eliminação de células neoplásicas ou infectadas com vírus e eliminação de células inflamatórias de sítios imunoprivilegiados, a exemplo do olho (Ju et al., 1995; Abbas et al., 2000; Bacon, 2001).

3.3. A PROTEÍNA BCL-2

O primeiro gene antiapoptótico descrito foi o Bcl-2. Este gene foi originalmente identificado em casos de linfoma folicular de células B, onde a translocação t(14;18)(q32;q21) resulta na sua justaposição próximo ao locus da cadeia pesada de imunoglobulina. Esta translocação resulta no aumento da expressão da proteína Bcl-2 (Tsujimoto et al., 1985).

O gene Bcl-2 está localizado no braço longo do cromossomo 18, na banda q21 (18q21) e traduz duas proteínas denominadas Bcl-2 α e Bcl-2 β com peso molecular de 26 KDa (239 aminoácidos) e 22 KDa (205 aminoácidos), respectivamente. A proteína Bcl-2 α é a isoforma predominante nas células. Estas duas proteínas diferem somente no radical carboxil terminal de 17 aminoácidos hidrofóbicos que constitui o domínio transmembrânico sendo idênticas nos seus primeiros 195 aminoácidos (Tsujimoto et al., 1986; Reed et al., 1987; Tanaka et al., 1993; Hockenbery, 1995). A proteína Bcl-2 é citoplasmática e se localiza entre as membranas interna e externa da mitocôndria, na membrana nuclear e no retículo endoplasmático (Hockenbery et al., 1990; Hockenbery, 1995; Brown, 1997).

A proteína Bcl-2 exerce papel anti-oxidativo, regulando a quantidade de radicais livres de oxigênio e prolongando a sobrevivência de determinadas células, mesmo quando privadas de fatores de crescimento, além de conferir proteção contra a apoptose e contribuir para manutenção de células T e B de memória (Nuñez et al., 1990; Hockenbery et al., 1990; Nuñez et al., 1991; Krueger et al., 2003). A indução da apoptose por diversos estímulos tais como: radiação, hipertermia, diminuição de fatores de crescimento, corticosteróides e vários quimioterápicos; é inibida pela proteína Bcl-2 em modelos in vitro (Nuñez et al., 1990; Hockenbery et al., 1990). O mecanismo pelo qual esta proteína bloqueia a apoptose permanece desconhecido, no entanto, a proteína Bcl-2 parece restabelecer o equilíbrio iônico da mitocôndria, evitando a apoptose. (Hockenbery et al., 1993; Pereira, 2000; Geske et al., 2001). Esta proteína parece bloquear a permeabilização da membrana externa da mitocôndria impedindo a liberação do citocromo c e sua união ao fator da apoptose-1 (APAF-1) inibindo a ativação da caspase 9, que é a enzima responsável pelo início do processo de apoptose (Abbas et al., 2000; Green, 2003). Desta forma as proteínas Bcl-2 e Fas são funcionalmente antagônicas.

A família da proteína Bcl-2 engloba uma série de proteínas que atuam regulando de forma positiva ou negativa o processo de apoptose e compreende pelo menos vinte proteínas homólogas que atuam dimerizando-se entre si e podem ser classificadas em três subgrupos: fatores de sobrevivência semelhantes a Bcl-2, fatores de morte semelhantes a Bax e fatores de morte BH3 (Nuñez et al., 1994; Reed, 1994; Yang et al., 1995;

Festjens et al., 2004). O melhor regulador negativo conhecido é a proteína Bcl-2, atuando como parte de um complexo de alto peso molecular. A proteína Bcl-xl, assim como as proteínas Bcl-w e Mcl1, inibem a apoptose, enquanto as proteínas Bcl-xs, Bad, Bax, Bak, Bid e Bim favorecem a apoptose (Reed, 1994; Yang et al., 1995).

A proteína Bax forma heterodímeros com Bcl-2 e homodímeros com si própria. Quando a ligação proteica é interrompida, o efeito protetor da apoptose é eliminado, sugerindo que para a proteína Bcl-2 inibir a apoptose, há necessidade de sua associação com Bax (Yang et al., 1995). Quando a Bax predomina, a morte celular programada é acelerada. Quando a Bcl-2 predomina, há heterodimerização com Bax e a apoptose é suprimida. Portanto, a relação Bcl-2/Bax determina a suscetibilidade celular a apoptose (Hockenbery et al., 1993; Nuñez et al., 1994; Reed, 1994).

A proteína Bcl-2 é detectada em vários tecidos fetais e do adulto, porém é restrita às células progenitoras de longa duração providas de função regenerativa e a algumas células pós-mitóticas selecionadas (Hockenbery et al., 1991). Nos tecidos linfóides a proteína Bcl-2 é detectada na região do manto folicular, onde residem linfócitos B recirculantes e de memória. Em contraste, os linfócitos, do centro germinativo, destinados à extinção não expressam a proteína Bcl-2 (Hockenbery et al., 1991). No córtex do timo, onde predominam linfócitos precursores com fenótipo CD4+/CD8+, a expressão de Bcl-2 é mínima. A maioria destes linfócitos sofre seleção negativa, pois reage fortemente com autoantígenos e é eliminada por ativação do programa de morte celular. Em contraste, na

medula do timo, composta por linfócitos T selecionados positivamente e já definidos como T auxiliar (CD4+/CD8-) ou T citotóxico (CD4-/CD8+), a proteína Bcl-2 é expressa em grande quantidade e sua expressão permanece elevada nos linfócitos T periféricos em repouso (Hockenbery et al., 1991; Ivanovska et al., 2004). Na medula óssea de indivíduos adultos, a proteína Bcl-2 é detectada na maioria das células hematopoéticas, porém, preferencialmente nas precursoras (Hockenbery, 1991). Na linhagem de células B, a proteína Bcl-2 é expressa no linfócito pró-B, subsequente diminui nos linfócitos pré-B e é reexpressa nos linfócitos B imaturos IgM+ IgD- (Ivanovska et al., 2004). Entre os subtipos de linfócitos T e os linfócitos B, não se observou diferença na porcentagem de positividade da proteína Bcl-2 (Ivanovska et al., 2004).

4. MÉTODOS

4.1. Pacientes e Controles

No período de abril 2004 a junho de 2005 foram incluídos consecutivamente 38 pacientes que preencheram pelo menos quatro critérios diagnósticos de Lúpus Eritematoso Sistêmico do Colégio Americano de Reumatologia (Tan et al., 1982; Hochberg, 1997) (Anexo A).

No início da doença todos os pacientes apresentavam idade igual ou inferior a 16 anos. Pacientes que estavam grávidas ou aqueles com sinais e ou sintomas sugestivos de infecção no momento da coleta da amostra de sangue foram excluídos do estudo.

Para determinar se possíveis alterações na expressão das proteínas Fas e Bcl-2 eram exclusivas do LES ou um achado inespecífico associado à inflamação crônica, foram incluídos 19 pacientes com artrite reumatóide juvenil ou artrite idiopática juvenil (ARJ) (Brewer et al., 1972; Brewer et al., 1977; Petty et al., 2004) e 10 pacientes com dermatopolimiosite Juvenil (DM) (Bohan e Peter, 1975; Bohan et al., 1977).

O grupo controle sem doença autoimune (SDA) foi constituído por 25 crianças e adolescentes que não estavam em uso de medicamentos e que apresentavam dores em membros, fibromialgia ou alterações ortopédicas.

A admissão ao estudo ocorreu após a obtenção do consentimento informado das crianças e adolescentes e/ou responsáveis (Anexo C).

Todas as crianças e adolescentes eram acompanhados na Unidade de Reumatologia do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

A pesquisa foi aprovada pela Comissão de Pesquisa e Ética do Departamento de Pediatria da FMUSP e pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HC-FMUSP em 11 de dezembro de 2002 (Protocolo 601/02) e contou com o financiamento da Fundação de Amparo a Pesquisa de São Paulo – FAPESP, para aquisição dos reagentes e anticorpos monoclonais (FAPESP#2003/00803-4 - aprovado em 11 de novembro de 2003).

4.2. Informações clínicas e laboratoriais

Após exame físico completo foi preenchido o protocolo, no qual foram anotados a idade do paciente na admissão ao estudo, a idade de início da doença, sexo, raça, o tempo de doença, os acometimentos de órgãos e sistemas (cutâneo, músculo-esquelético, reticuloendotelial, pulmonar, cardíaco, neuropsiquiátrico, renal e hematológico), a presença ou não dos autoanticorpos (FAN, anti-DNA, anti-Sm, anti-RNP, anti-Ro/SSA, anti-La/SSB, anti-P, anticoagulante lúpico e anticardiolipina), o SLEDAI e o tratamento utilizado pelo paciente no momento da avaliação (Anexo D).

A presença de comprometimento dos diversos órgãos e sistemas baseou-se nas definições apresentadas nos critérios de classificação do

ACR de 1982 e no glossário do Comitê da Associação Americana de Reumatologia de 1985 (Tan et al., 1982; ARA Glossary Committee, 1985). A classificação histológica da nefrite lúpica baseou-se na classificação proposta pela Organização Mundial da Saúde (OMS) que estabelece: classe I – glomerulonefrite mesangial mínima; classe II – glomerulonefrite mesangial; classe III – glomerulonefrite proliferativa focal; classe IV – glomerulonefrite proliferativa difusa; classe V – glomerulonefrite membranosa e classe VI – glomerulonefrite esclerótica avançada (Cassidy et al., 1995; Cassidy et al., 2001).

A doença foi considerada ativa nos pacientes lúpicos quando o valor do SLEDAI foi igual ou superior a oito (Bombardier et al., 1992; Okuda, 1995) (Anexo B).

O hemograma, o complemento total e suas frações C3 e C4, os autoanticorpos e a análise de urina foram realizados nos laboratórios de rotina do Instituto da Criança e do Hospital das Clínicas da FMUSP. Os autoanticorpos foram determinados por meio das seguintes técnicas: o anticorpo antinuclear (FAN) foi pesquisado pelo método de imunofluorescência indireta com substrato de fígado de rato e/ou células de epiteloma humano - HEp-2. Os anticorpos anti-dsDNA, anti-Sm, anti-RNP, anti-SSA/Ro, anti-SSB/La, anti-P e anticardiolipina foram pesquisados pelo ensaio imunoenzimático (ELISA). O anticoagulente lúpico foi pesquisado por meio dos testes de TTPA, dRVVT e KCT.

4.3. Pesquisa da expressão do Fas e Bcl-2 em células mononucleares

A pesquisa da expressão das proteínas Fas e Bcl-2 em células mononucleares periféricas dos pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e nos grupos controles foi realizada no Laboratório de Imunologia Celular da Disciplina de Reumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (LIM-17), sob a orientação da Dra. Claudia Goldenstein-Schainberg.

4.3.1 Obtenção das células mononucleares

Amostras de 20 ml de sangue periférico, obtidas por punção de veia periférica, foram coletadas em tubos contendo como anticoagulante o ácido etilenodiamino-tetracético (EDTA) e analisadas até 2 horas após a coleta.

No preparo da amostra utilizou-se a técnica de lise de sangue total, que permite menor perda celular, fundamental nos pacientes lúpicos em razão da linfopenia apresentada pelos mesmos (Marti et al., 2001; Bacal et al., 2003b).

4.3.2 Definição das células mononucleares

Os antígenos de diferenciação leucocitária foram pesquisados em membrana, utilizando-se a técnica de imunofluorescência direta com leitura em citômetro de fluxo. Todas as reações de imunofluorescência direta foram realizadas protegidas da luz e em gelo. Para a identificação dos linfócitos T e B foram empregados os anticorpos monoclonais Beckton Dickison –

Pharmigen (BD). Os linfócitos T foram identificados com anticorpo monoclonal anti-CD3 marcado com Cy5 (BD – Camundongo anti-humano IgG1 – REF. 555334) e os linfócitos B com anti-CD19 marcado com ficoeritrina (PE) (BD – Camundongo anti-humano IgG1 – REF. 555413). Os linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ foram identificados pelos anticorpos monoclonais anti-CD4 e anti-CD8 marcados com ficoeritrina (PE) (BD – Camundongo anti-humano IgG1 – REF. 555347 e BD – Camundongo anti-humano IgG1 – REF. 555635, respectivamente).

4.3.3 Estudo da proteína Fas

A expressão da proteína Fas (CD95/APO-1) nas células mononucleares foi pesquisada utilizando-se a técnica de imunofluorescência direta, com tripla e dupla marcação em membrana com os anticorpos monoclonais anti-CD95 conjugado com fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC) (BD – Camundongo anti-humano IgG1 – REF. 555673), anti-CD3-Cy5, anti-CD4-PE, anti-CD8-PE e anti-CD19-PE.

Em cada tubo Falcon, incluindo o tubo controle da reação, colocamos 100 a 200 µl de sangue total, de acordo com a contagem global de leucócitos para obtermos aproximadamente 1×10^6 células/ml em suspensão. Antes de iniciar a marcação a amostra foi lavada adicionando-se 2 ml de PBS-azida 0,1% com o objetivo de eliminar as reações inespecíficas. Em seguida a amostra foi homogeneizada em vórtex e centrifugada a 2.000 rpm por três minutos à temperatura de 4°C. O sobrenadante foi aspirado, o conteúdo homogeneizado e 50 µl de PBS-Azida com soro fetal bovino 2% acrescido.

Então, 20 µl de anticorpo monoclonal anti-CD95-FITC foi adicionado a cada tubo, em seguida 10 µl dos anticorpos monoclonais anti-CD4-PE, anti-CD8-PE e anti-CD19-PE foram acrescentados aos seus respectivos tubos e finalmente, para concluir a tripla marcação, 10µl do anticorpo anti-CD3-Cy5 foi acrescentado aos tubos contendo anti-CD4 e anti-CD8. Os tubos foram incubados ao abrigo da luz durante 20 minutos à temperatura ambiente paralelamente ao seu tubo controle negativo contendo 10µl de pequenas concentrações de IgG1 marcada com isotiocianato de fluoresceína (BD – REF. 555748) e 5µl de IgG1 marcada com ficoeritrina (BD – REF. 555749). Em seguida foi adicionado a cada tubo 2 ml de solução de lise 10%, diluída em água destilada na concentração de 1:10 (FACS lysing solution, BD), homogeneizado e incubado em ambiente escuro por 15 minutos à temperatura ambiente. Então as células mononucleares marcadas foram lavadas duas vezes com 2 ml de PBS-azida 0,1%, centrifugadas a 2.000 rpm durante três minutos e ressuspensas em 500 µl de paraformaldeído a 1%. Os tubos foram armazenados a 4°C por pelo menos 15 minutos e no máximo 24 horas antes da leitura e quantificação (aquisição) em citômetro de fluxo (Roberti, 1998; Pereira, 2000; Antunes, 2000).

4.3.4 Estudo da proteína Bcl-2

Para verificar a expressão da proteína Bcl-2 em células mononucleares, foram realizadas triplas e duplas marcações concomitantes com anti-Bcl-2-FITC em citoplasma e anti-CD3-Cy5, anti-CD4-PE, anti-CD8-PE e anti-CD19-PE em membrana. Nestas reações efetuou-se

primeiramente a reação de imunofluorescência direta em citoplasma e, a seguir, a reação de imunofluorescência direta em membrana.

Para permeabilização das membranas citoplasmáticas 1×10^6 células/ml (100 a 200 μ l de sangue periférico) foram colocadas em tubo Falcon, acrescidos 1 ml de paraformaldeído 4% e 1 ml de solução de lise 10% diluída 1:10 em água destilada. Os tubos foram incubados por 10 minutos à temperatura ambiente e, então centrifugados por três minutos a 2.000 rpm à temperatura de 4°C. Para retirar o excesso da solução permeabilizante, as células mononucleares foram ressuspensas em 2 ml de PBS-Tween 0,5% e centrifugadas duas vezes nas mesmas condições, desprezando-se o sobrenadante por inversão dos tubos, nos intervalos. Em seguida, às células mononucleares permeabilizadas foi acrescido 50 μ l de PBS-Azida com soro fetal bovino 2%, 150 μ l de PBS-Tween 0,5% e 20 μ l do anticorpo monoclonal, imunoglobulina IgG2a de hamster anti-humano, anti-Bcl-2 marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (BD – REF. 554234) e incubados por 20 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, em paralelo com seu respectivo tubo controle contendo 20 μ l de IgG-FITC (BD – Hamister anti-humano REF. 554234). Após incubação, as células mononucleares marcadas foram lavadas com 2 ml de PBS-Tween 0,5%, centrifugadas e o sobrenadante desprezado por inversão. Finalizadas as reações imunológicas para detecção da proteína Bcl-2, associando-se a técnica de imunofluorescência direta em membrana, a cada tubo teste foi acrescido 50 μ l de PBS-Azida com soro fetal bovino 2% e 10 μ l dos respectivos anticorpos monoclonais, anti-CD4-PE, anti-CD8-PE ou anti-CD19-PE, e para finalizar a tripla marcação, 10 μ l do anticorpo

anti-CD3-Cy5 foi acrescido aos tubos com anti-CD4 e anti-CD8; os tubos foram incubados por 20 minutos à temperatura ambiente e protegidos da luz. Então, 2 ml de solução de lise 10%, diluída em água destilada na concentração de 1:10 (FACS lysing solution - BD) foi acrescentado a cada tubo, homogeneizado e incubado à temperatura ambiente e ao abrigo da luz por 15 minutos. Em seguida, as células mononucleares foram lavadas duas vezes com PBS-Azida 0,1%, centrifugas nas mesmas condições anteriores e ressuspensas em 500µl de paraformaldeído a 1%. Os tubos foram armazenados a 4°C por pelo menos 15 minutos e no máximo 24 horas antes da leitura e quantificação em citômetro de fluxo (Roberti, 1998; Pereira, 2000; Antunes, 2000).

Todas as marcações das células mononucleares dos pacientes e dos grupos controles foram realizadas sempre em paralelo. As composições dos reagentes utilizados nesta pesquisa estão descritas no anexo E.

4.4. Citometria de fluxo

A citometria de fluxo é um método moderno de estudo das múltiplas propriedades físicas e biológicas de uma célula (Marti et al., 2001; Bacal et al., 2003a). O citômetro de fluxo moderno resultou da aplicação do conhecimento e técnicas, as quais foram independentemente desenvolvidas como a ciência da computação, tecnologia laser, engenharia elétrica, matemática, medicina, biologia, biotecnologia, biologia molecular, produção de anticorpos monoclonais, química orgânica (fluorocrômica) e física (Bacal et al., 2003a). A aplicação da citometria de fluxo é ampla devido à

possibilidade do estudo das populações e subpopulações celulares, dos antígenos em membrana e de componentes intracitoplasmáticos e nucleares (Bacal et al., 2003a). Para que a análise no citômetro de fluxo seja possível é necessário que o material esteja em suspensão de células. Sangue periférico, medula óssea, líquido, líquido pleural, peritoneal ou pericárdico são suspensões celulares naturais. Entretanto, tecidos sólidos (baço, gânglios ou massas tumorais) podem ser utilizados para obtenção de suspensão de células por meio de preparos especiais (Bacal et al., 2003b).

Neste estudo a análise em citometria de fluxo foi realizada no aparelho FACScalibur Analyser Becton e Dickinson. Para aquisição das células mononucleares a sensibilidade óptica, a calibração dos instrumentos e a compensação das fluorescências foram ajustadas automaticamente utilizando-se microesferas de poliestireno no programa FacsComp. Na calibração foram utilizadas microesferas puras (não-conjugadas), marcadas com isotiocianato de fluoresceína (FITC) e marcadas com ficoeritrina (PE) (Marti et al., 2001). Com as microesferas puras (não-conjugadas), foram feitos os ajustes iniciais nas voltagens dos fotomultiplicadores dos detectores de dispersão da luz frontal (FSC) e lateral (SSC). Em seguida, com as microesferas marcadas foi realizada a compensação dos fotodetectores de fluorescência-1 (FL-1), fluorescência-2 (FL-2) e fluorescência-3 (FL-3), capazes de detectar comprimentos de onda de 494 nm e 517 nm emitidos pelo fluorocromo FITC (verde), de 565 nm e 660 nm emitidos pelo fluorocromo PE (laranja) e de 670 nm emitidos pelo Cy5 (vermelho), respectivamente. Estes ajustes foram necessários para corrigir a superposição dos espectros de fluorescência emitidos por FITC, PE e Cy5 e captados pelos fotodetectores FL1, FL2 e FL3, respectivamente.

Com o citômetro calibrado, o tubo-controle foi colocado na câmara do aparelho. As células mononucleares contidas neste tubo foram aspiradas pelo sistema fluído e individualmente excitadas pelo feixe de raios laser (fonte excitatória). À medida que foram excitadas pelo laser, as células mononucleares absorviam sua energia e a emitiam em forma de ondas de maior comprimento (fluorescências). As ondas de energia ou sinais de luz passavam pelo sistema óptico constituído de espelhos e filtros de luz e eram conduzidos para os fotodetectores FL-1, FL-2 ou FL-3. Concomitantemente, o detector FSC, situado em frente à fonte excitatória, captava a luz dispersa na direção frontal do laser, que corresponde ao tamanho da célula. O detector SSC, situado em ângulo reto com o laser, captava a luz dispersa lateralmente, reflexo da complexidade interna das células e de sua granularidade. Todos os sinais ópticos foram amplificados e transformados em sinais eletrônicos, convertidos em valores digitais, quantificados e enviados para análise digital no computador do citômetro de fluxo (Pereira, 2000; Marti et al., 2001) (Figura 2).

No computador, utilizando o programa de aquisição CellQuest (BD), estes sinais assumiram a forma de um gráfico de dispersão de pontos chamado de *dot-plot*. No citograma ou *dot-plot* formado por FSC na abscissa e SSC na ordenada as células concentravam-se em locais de acordo com o seu tamanho e complexidade interna (Figura 3). Com o recurso da morfometria a população de células com baixa granularidade e pequeno tamanho, que corresponde às células mononucleares foi delimitada com a região R1 e em seguida monitorada em outro citograma bidimensional logarítmico, em escala de 10^0 a 10^4 , formado pelos parâmetros de FL1 na

abscissa e FL2 ou FL3 na ordenada, para a compensação final das fluorescências (Figura 4).

No tubo controle havia apenas imunoglobulinas e as células deste tubo emitiam sinais fluorescentes fracos considerados sinais de autofluorescência. Deste modo, nos *dot-plot* as células do tubo controle (não coradas) ficavam delimitadas no quadrante inferior esquerdo formado pela intersecção de duas retas perpendiculares aos eixos X e Y, traçadas ao nível do $\log 10^1$ e as duplamente marcadas com FITC e PE ou com FITC e Cy5 no quadrante superior direito (Marti et al., 2001) (Figura 4). Este citograma foi traçado de forma que menos de 3% das células negativas ficassem posicionadas fora dos limites do quadrante inferior esquerdo, evitando-se resultados falso-positivos.

Em seguida, os demais tubos contendo células coradas (ligadas ao anticorpo monoclonal conjugado a fluorocromo) foram seqüencialmente colocados na câmara do citômetro para que as células fossem adquiridas. A aquisição das amostras dos pacientes e dos controles foi realizada sobre o total de leucócitos da amostra, utilizando-se citograma com parâmetros FSC no eixo X e SSC no Y. Cerca de 20.000 a 100.000 células ou eventos do total celular, de cada tubo, foram adquiridas para que se obtivesse pelo menos 2.500 linfócitos na região R1. Durante a aquisição padronizamos a identificação dos reagentes, colocando-se sempre no eixo das abscissas os reagentes conjugados com FITC e no eixo das ordenadas os reagentes conjugados com PE ou Cy5.

Os resultados foram expressos pelas porcentagens de células positivas para o antígeno testado e pela intensidade média de fluorescência (IMF) de expressão do antígeno pesquisado na membrana celular. Para isto,

os dois eixos (abscissa e ordenada) foram divididos em unidades de magnitude crescentes, historicamente denominadas de canais (Benz et al., 1986). Assim, quanto maior o canal ocupado por determinada população de células, maior sua intensidade de fluorescência, que é proporcional à quantidade (densidade) de antígenos expressos por estas células. A porcentagem de células positivas e a intensidade média de fluorescência foram automaticamente fornecidas pelo programa de estatística do aparelho (Poncelet, 1985; Gratama, 1998; Marti et al., 2001). Na análise da expressão das proteínas Fas e Bcl-2 foram consideradas as porcentagens de células duplamente marcadas do total de linfócitos delimitados na região R1 (Figura 4). Durante todo o estudo a calibração, a compensação das fluorescências e os parâmetros do aparelho foram mantidos constantes. O alinhamento dos fotodetectores foi conferido antes de cada análise.

Figura 2 - Esquema da partícula passando através do raio laser e a luz que se dispersa sendo captada pelos fotodetectores frontal e lateral (Adaptado de Bacal et al., 2003).

Figura 3 - Gráfico de dispersão de pontos (dot-plot) de acordo com o tamanho (FSC) e a granularidade (SSC) das células (Adaptado de Bacal et al., 2003).

Figura 4 - Seleção da população linfocitária total, na região R1, de pequeno tamanho (FSC) e baixa granularidade (SSC) (A) e citograma (dot-plot) delimitando pela intersecção de duas retas perpendiculares aos eixos X e Y as subpopulações não marcadas, marcadas com um fluorocromo e duplamente marcadas (A e B) (Adaptado de Bacal et al., 2003).

4.5. Análise estatística

Para testar diferenças entre a porcentagem de células que expressavam as proteínas Fas e Bcl-2 e a quantidade de antígenos expressos pelas mesmas (IMF), entre os pacientes com LES e os grupos controles, utilizou-se o teste estatístico de Kruskal-Wallis; esta técnica não-paramétrica examina a hipótese nula de que todos os grupos estudados possam ser considerados iguais em relação a uma dada medida (Rosner, 2000). Este teste estatístico também foi utilizado para testar diferenças entre o grupo de pacientes com doença ativa e o grupo com doença inativa.

As relações entre as expressões das proteínas Fas e Bcl-2 e o SLEDAI foram examinadas pelo coeficiente de correlação de Sperman (Rosner, 2000). Este teste mede correlações por análise de postos hierárquicos das medidas e por isto não depende de padrões de distribuição das variáveis.

Nestes testes o nível de significância para rejeição da hipótese nula foi fixado em 5% e os resultados foram expressos pela média $\pm$ desvio padrão (DP).

5. RESULTADOS

5.1. Casuística

5.1.1 Pacientes

Trinta e oito crianças e adolescentes com diagnóstico de lúpus eritematoso sistêmico (LES) foram estudados. A idade de início da doença variou de 2,9 a 15,6 anos, com média de 10,0 anos. O tempo médio de doença foi de 3,2 anos (variou de 1,0 mês a 11,6 anos). A média de idade dos pacientes à admissão ao estudo foi de 14,0 anos (variou de 8,2 a 20,9 anos). Trinta e dois (84,2%) pacientes eram do sexo feminino, com relação feminino:masculino de 5,3:1 (Tabela 1).

Quanto à atividade da doença, à admissão ao estudo, 27 (71,1%) pacientes apresentavam doença inativa (SLEDAI < 08) e 11 (28,9%) doença ativa (SLEDAI ≥ 08).

As freqüências dos comprometimentos clínicos e dos autoanticorpos observados nos pacientes com LES estão descritas nas tabelas 2 e 3.

Quanto à terapêutica utilizada pelos pacientes lúpicos no momento da avaliação, apenas um estava sem tratamento e outro estava tomando somente azatioprina. Trinta e seis pacientes estavam em uso de prednisona, sendo dois em uso exclusivo de corticosteróides, 30 em associação com hidroxicloroquina ou cloroquina e 16 em associação com imunossupressor (ciclofosfamida, metotrexato, ciclosporina ou azatioprina). Um paciente estava em uso de dapsona, um de talidomida e um de micofenolato mofetil.

Em relação à dose de corticosteróide utilizada, 21 pacientes estavam em uso de dose menor ou igual a 10mg por dia e 17 de dose superior a 10mg por dia (Tabela 4).

5.1.2 Controles

As características demográficas dos grupos controles estão descritas na tabela 1. Quanto à terapêutica utilizada no momento da avaliação, todos os indivíduos SDA estavam sem tratamento. Três pacientes com ARJ não estavam utilizando medicamentos, 10 estavam em uso de corticosteróide e todos em associação com imunossupressor; 15 estavam tomando antiinflamatórios não hormonais e um estava em uso exclusivo de sulfasalazina. Sete pacientes estavam utilizando corticosteróides em dose menor ou igual a 10mg por dia. Quatro pacientes com DM não estavam em uso de medicamentos, cinco estavam em uso de corticosteróides sendo quatro em associação com imunossupressor e um em associação com gamaglobulina. Um paciente estava tomando somente metotrexato. Apenas um paciente estava utilizando dose de corticosteróide inferior a 10 mg por dia (Tabela 4).

Tabela 1 – Características demográficas dos 38 pacientes lúpicos e dos grupos controles

Pacientes e Controles	N° de casos	Sexo			Idades de admissão ao estudo Média ± DP (mediana) Variação
		F	M	F:M	
Lúpus Eritematoso Sistêmico	38	32	06	5,3:1	14,0 ± 3,4 (13,9) 8,2 – 20,9
Controles sem doença autoimune	25	21	04	5,2:1	12,4 ± 5,3 (12,2) 2,1 – 20,3
Artrite Reumatóide Juvenil	19	11	08	1,4:1	10,8 ± 4,0 (10,3) * 4,3 – 18,4
Dermatomiosite	10	04	06	1:1,5	9,3 ± 3,1 (9,7) * 3,4 – 13,2

* p < 0,05, pacientes com LES comparado ao grupo controle específico
Teste de Kruskal-Wallis

Tabela 2 – Características clínicas dos 38 pacientes lúpicos

Comprometimento Clínico	Nº de casos (%)
Cutâneo	35 (92,1)
Hematológico	34 (89,5)
Músculo-esquelético	31 (81,6)
Renal	31 (81,6)
Cardíaco	11 (28,9)
Reticuloendotelial	11 (28,9)
Pulmonar	07 (18,4)
Neuropsiquiátrico	05 (13,2)

Tabela 3 – Autoanticorpos dos 38 pacientes lúpicos

Autoanticorpos	Nº de casos (%)
FAN	38 (100)
Anti-DNA	35 (92,1)
Anti-Sm	19 (50,0)
Anti-RNP	19 (50,0)
Anti-Ro	18 (47,4)
Anti-La	09 (23,7)
Anti-Cardiolipina IgG	10 (26,3)
Anti-Cardiolipina IgM	07 (18,4)
Anticogulante lúpico	08 (21,1)

Tabela 4 – Terapêutica utilizada pelos pacientes com lúpus eritematoso sistêmico, com artrite reumatóide juvenil e com dermatomiosite à admissão ao estudo

Pacientes e Controles	Terapêutica – N° de casos (%)								
	N° de casos	Sem medicação	Prednisona	Hidroxicloroquina ou cloroquina	Metotrexato	Azatioprina	Ciclosporina	Ciclo-fosfamida	Antiinflamatório não hormonal
Lúpus Eritematoso Sistêmico	38	01 (2,6)	36 (94,7)	31 (81,6)	04 (10,5)	06 (15,8)	01 (2,6)	07 (18,4)	00
Artrite Reumatóide Juvenil	19	03 (15,8)	10 (52,6)	00	08 (42,1)	00	05 (26,3)	00	15 (78,9)
Dermatomiosite	10	04 (40,0)	05 (50,0)	02 (20,0)	04 (40,0)	00	03 (30,0)	00	00

5.2. Estudo da proteína Fas

5.2.1 Estudo da proteína Fas nos linfócitos T (CD3+)

A média das porcentagens de linfócitos T (CD3+) que expressavam a proteína Fas nos pacientes com LES foi significativamente maior ($43,7 \pm 10,3$; $p < 0,01$) que nos grupos controles SDA ($31,2 \pm 9,1$), com ARJ ($34,9 \pm 10,6$) e com DM ($24,9 \pm 13,4$) (Tabela 5 e Figura 5).

A intensidade média de fluorescência (IMF) da proteína Fas nos linfócitos T dos pacientes lúpicos foi semelhante a dos controles SDA, com ARJ e DM (Tabela 6).

5.2.2 Estudo da proteína Fas nos linfócitos T auxiliares (CD4+)

A média das porcentagens de linfócitos T auxiliares (CD4+) que expressavam a proteína Fas nos pacientes com LES foi semelhante ($20,3 \pm 6,7$) a dos indivíduos SDA ($17,9 \pm 6,3$) e aos controles com ARJ ($18,2 \pm 3,9$) e significativamente maior que os controles com DM ($13,0 \pm 4,0$) (Tabela 5 e Figura 5).

A IMF da proteína Fas nos linfócitos T CD4+ dos pacientes lúpicos foi semelhante a dos três grupos controles (Tabela 6).

5.2.3 Estudo da proteína Fas nos linfócitos T citotóxicos (CD8+)

A média das porcentagens de linfócitos T citotóxicos (CD8+) que expressavam a proteína Fas nos pacientes lúpicos foi significativamente maior ($21,5 \pm 9,6$; $p < 0,01$) que nos controles SDA ($12,5 \pm 5,9$), ARJ ($17,3 \pm 9,7$) e DM ($12,7 \pm 13,5$) (Tabela 5 e Figura 5).

Quando comparamos as médias da IMF da proteína Fas nos linfócitos T CD8+ dos pacientes lúpicos ao grupo SDA não observamos diferença, no entanto, os pacientes com LES apresentavam IMF significativamente maior ($26,1 \pm 5,5$) que os controles com ARJ ($21,8 \pm 3,4$) e com DM ($23,8 \pm 8,1$) (Tabela 6).

5.2.4 Estudo da proteína Fas nos linfócitos B (CD19+)

A média das porcentagens de linfócitos B (CD19+) que expressavam a proteína Fas nos pacientes lúpicos foi significativamente elevada ($2,1 \pm 1,4$) em relação aos controles SDA ($1,2 \pm 0,5$) e aos controles com ARJ ($1,4 \pm 0,7$) (Tabela 5 e Figura 5).

A média da IMF da proteína Fas nos linfócitos B dos pacientes lúpicos foi semelhante à dos três grupos controles (Tabela 6).

Quando comparamos a porcentagem de células que expressavam a proteína Fas e a IMF desta proteína nos pacientes com ARJ e com DM ao grupo controle SDA, não observamos diferenças.

Tabela 5 – Porcentagem de linfócitos T e B que expressavam a proteína Fas dos pacientes e controles – Média $\pm$ desvio padrão (DP)

Pacientes e controles	Nº de casos	Linfócitos T CD3+	Linfócitos T CD4+	Linfócitos T CD8+	Linfócitos B CD19+
Lúpus Eritematoso Sistêmico	38	43,7 $\pm$ 10,3	20,3 $\pm$ 6,7	21,5 $\pm$ 9,6	2,1 $\pm$ 1,4
Controles sem doença autoimune	25	31,2 $\pm$ 9,1*	17,9 $\pm$ 6,3	12,5 $\pm$ 5,9*	1,2 $\pm$ 0,5 *
Artrite Reumatóide Juvenil	19	34,9 $\pm$ 10,6*	18,2 $\pm$ 3,9	17,3 $\pm$ 9,7*	1,4 $\pm$ 0,7 *
Dermatomiosite	10	24,9 $\pm$ 13,4*	13,0 $\pm$ 4,0 *	12,7 $\pm$ 13,5*	1,6 $\pm$ 0,8

* p < 0,05, pacientes com LES comparado ao grupo controle específico
Teste de Kruskal-Wallis.

Tabela 6 – Intensidade média de fluorescência (IMF) da proteína Fas nos linfócitos T e B dos pacientes e controles – Média $\pm$ desvio padrão (DP)

Pacientes e controles	Nº de casos	Linfócitos T CD3+	Linfócitos T CD4+	Linfócitos T CD8+	Linfócitos B CD19+
Lúpus Eritematoso Sistêmico	38	36,4 $\pm$ 7,6	45,3 $\pm$ 10,7	26,1 $\pm$ 5,5	30,6 $\pm$ 10,2
Controles sem doença autoimune	25	34,3 $\pm$ 4,2	41,7 $\pm$ 5,3	23,8 $\pm$ 2,9	29,8 $\pm$ 5,7
Artrite Reumatóide Juvenil	19	32,4 $\pm$ 4,4	40,5 $\pm$ 6,6	21,8 $\pm$ 3,4 *	30,8 $\pm$ 12,9
Dermatomiosite	10	33,6 $\pm$ 8,3	41,2 $\pm$ 7,7	23,8 $\pm$ 8,1 *	33,6 $\pm$ 12,9

* p < 0,05, pacientes com LES comparado ao grupo controle específico
Teste de Kruskal-Wallis

Paciente com lúpus

Controle sem
doença autoimune

Figura 5 - Exemplo de citograma ou dot-plot dos linfócitos T CD3+, CD4+, CD8+ e dos linfócitos B CD19+ que expressavam a proteína Fas de um paciente com lúpus e de um indivíduo sem doença autoimune.

5.3. Estudo da proteína Bcl-2

5.3.1 Estudo da proteína Bcl-2 nos linfócitos T (CD3+)

A expressão da proteína Bcl-2 foi estudada em 35 pacientes lúpicos e em todos os controles.

A média das porcentagens de células T CD3+ que expressavam a proteína Bcl-2 foi semelhante nos pacientes com LES e nos grupos controles (Tabela 7).

A quantidade de antígenos Bcl-2 expressos nestas células, ou seja, a IMF da proteína Bcl-2 nos linfócitos T CD3+ dos pacientes lúpicos foi significativamente maior ($28,8 \pm 8,4$) que nos controles SDA ($26,0 \pm 7,2$) e nos controles com ARJ ($24,4 \pm 4,4$) (Tabela 8 e Figura 6).

5.3.2 Estudo da proteína Bcl-2 nos linfócitos T auxiliares (CD4+)

Não houve diferença na porcentagem de linfócitos T CD4+ que expressavam a proteína Bcl-2 entre os pacientes com LES, os controles com SDA e com ARJ. No entanto, a porcentagem de linfócitos T CD4+ que expressavam esta proteína nos pacientes lúpicos foi significativamente menor ($28,4 \pm 11,2$) em relação ao grupo controle com DM ($37,1 \pm 8,6$) (Tabela 7).

A média da IMF da proteína Bcl-2 nos linfócitos T CD4+ dos pacientes lúpicos foi maior ($28,6 \pm 8,2$; $p < 0,05$) em relação aos indivíduos SDA ($25,9 \pm 7,2$) e aos controles com ARJ ($23,6 \pm 4,6$) (Tabela 8 e Figura 6).

5.3.3 Estudo da proteína Bcl-2 nos linfócitos T citotóxicos (CD8+)

A média das porcentagens de linfócitos T citotóxicos (CD8+) que expressavam Bcl-2 nos pacientes com LES foi semelhante a dos grupos controles (Tabela 7).

A média de antígenos Bcl-2 expressos (IMF) nos linfócitos T CD8+ dos pacientes lúpicos foi significativamente maior ($29,4 \pm 9,3$) que nos controles SDA ($25,5 \pm 6,7$) e nos controles com ARJ ($23,9 \pm 5,7$) (Tabela 8 e Figura 6).

5.3.4 Estudo da proteína Bcl-2 nos linfócitos B (CD19+)

A média das porcentagens de linfócitos B (CD19+) que expressavam a proteína Bcl-2 nos pacientes lúpicos não mostrou diferença em relação aos grupos controles (Tabela 7).

A IMF da proteína Bcl-2 nos linfócitos B dos pacientes lúpicos ($25,5 \pm 9,6$) foi semelhante a do grupo controle SDA ($23,6 \pm 5,6$) e a dos controles com ARJ ($22,3 \pm 5,3$) e com DM ($22,3 \pm 4,8$) (Tabela 8 e Figura 6).

Quando comparamos a porcentagem de células e a IMF da proteína Bcl-2 dos pacientes com ARJ e DM a do grupo controle SDA não observamos diferença estatística.

Tabela 7 – Porcentagem de linfócitos T e B que expressavam a proteína Bcl-2 dos pacientes e controles – Média $\pm$ desvio padrão (DP)

Pacientes e controles	Nº casos	Linfócitos T CD3+	Linfócitos T CD4+	Linfócitos T CD8+	Linfócitos B CD19+
Lúpus Eritematoso Sistêmico	35	55,9 $\pm$ 15,4	28,4 $\pm$ 11,2	25,8 $\pm$ 8,8	9,7 $\pm$ 6,5
Controles sem doença autoimune	25	54,0 $\pm$ 10,0	30,3 $\pm$ 6,7	23,4 $\pm$ 7,4	11,6 $\pm$ 3,8
Artrite Reumatóide Juvenil	19	59,7 $\pm$ 12,2	31,4 $\pm$ 8,9	25,2 $\pm$ 6,0	10,2 $\pm$ 4,6
Dermatomiosite	10	60,5 $\pm$ 11,3	37,1 $\pm$ 8,6 *	25,7 $\pm$ 5,4	13,7 $\pm$ 11,1

* p < 0,05, pacientes com LES comparado ao grupo controle específico
Teste de Kruskal-Wallis

Tabela 8 – Intensidade média de fluorescência (IMF) da proteína Bcl-2 nos linfócitos T e B dos pacientes e controles – Média $\pm$ desvio padrão (DP)

Pacientes e controles	Nº casos	Linfócitos T CD3+	Linfócitos T CD4+	Linfócitos T CD8+	Linfócitos B CD19+
Lúpus Eritematoso Sistêmico	35	28,8 $\pm$ 8,4	28,6 $\pm$ 8,2	29,4 $\pm$ 9,3	25,5 $\pm$ 9,6
Controles sem doença autoimune	25	26,0 $\pm$ 7,2 *	25,9 $\pm$ 7,2 *	25,5 $\pm$ 6,7 *	23,6 $\pm$ 5,6
Artrite Reumatóide Juvenil	19	24,4 $\pm$ 4,4 *	23,6 $\pm$ 4,6 *	23,9 $\pm$ 5,7 *	22,3 $\pm$ 5,3
Dermatomiosite	10	26,9 $\pm$ 8,4	25,7 $\pm$ 7,5	29,5 $\pm$ 8,9	22,3 $\pm$ 4,8

* p < 0,05, pacientes com LES comparado ao grupo controle específico
Teste de Kruskal-Wallis

Figura 6 - Exemplo de citograma ou dot-plot dos linfócitos T CD3+, CD4+, CD8+ e dos linfócitos B CD19+ que expressavam a proteína Bcl-2 de um paciente com lúpus e de um indivíduo sem doença autoimune.

5.4. Correlação entre as proteínas Fas e Bcl-2 e o SLEDAI

Em relação à atividade da doença medida por meio do SLEDAI, onze (28,9%) pacientes com LES apresentavam doença ativa (SLEDAI $\geq$ 08).

Quando comparamos os pacientes lúpicos com doença ativa e doença inativa observamos diferença estatisticamente significativa apenas na porcentagem de linfócitos B (CD19+) que expressavam a proteína Fas (Tabela 9).

No entanto, quando comparamos os pacientes lúpicos com doença ativa ao grupo controle SDA observamos que a porcentagem de linfócitos T CD4+ que expressavam a proteína Fas foi significativamente maior ($23,9 \pm 7,8$ vs $17,9 \pm 6,3$), diferença não observada anteriormente (Tabela 9).

Não houve diferença na IMF da proteína Fas nos linfócitos T e B dos pacientes lúpicos com doença ativa em relação aos pacientes com doença inativa ou ao grupo controle SDA (Tabela 10).

Observamos correlação positiva entre a porcentagem de linfócitos B que expressavam a proteína Fas e o SLEDAI ($r=0,38$ e $p=0,02$) (Figura 7). As correlações entre as porcentagens de linfócitos T CD3+, CD4+ e CD8+ que expressavam a proteína Fas e o SLEDAI não foram significativas.

Tabela 9 – Porcentagem de linfócitos T e B que expressavam a proteína Fas nos pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES) com doença ativa (SLEDAI $\geq$ 08) e com doença inativa (SLEDAI $<$ 8) e nos controles sem doença autoimune – Média $\pm$ desvio padrão (DP)

Pacientes e controles	Nº casos	Linfócitos T CD3+	Linfócitos T CD4+	Linfócitos T CD8+	Linfócitos B CD19+
LES com doença ativa	11	47,1 $\pm$ 10,1 _{&}	23,9 $\pm$ 7,8 _{&}	23,4 $\pm$ 10,7 _{&}	3,2 $\pm$ 1,7 [*] &
LES com doença inativa	27	42,4 $\pm$ 10,2 _{&}	18,8 $\pm$ 5,7	20,7 $\pm$ 9,3 _{&}	1,7 $\pm$ 1,0 _{&}
Controles sem doença autoimune	25	31,2 $\pm$ 9,1	17,9 $\pm$ 6,3	12,5 $\pm$ 5,9	1,2 $\pm$ 0,5

* p < 0,05, pacientes com LES ativo comparado com LES inativo

& p < 0,05, pacientes com LES ativo ou LES inativo comparado com os controles sem doença autoimune

Teste de Kruskal-Wallis

Tabela 10 – Intensidade média de fluorescência (IMF) da proteína Fas nos linfócitos T e B dos pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES) com doença ativa (SLEDAI $\geq$ 08) e com doença inativa (SLEDAI $<$ 8) e nos controles sem doença autoimune – Média $\pm$ desvio padrão (DP)

Pacientes e controles	Nº casos	Linfócitos T CD3+	Linfócitos T CD4+	Linfócitos T CD8+	Linfócitos B CD19+
LES com doença ativa	11	33,9 $\pm$ 7,4	41,8 $\pm$ 9,2	24,2 $\pm$ 3,8	27,3 $\pm$ 5,2
LES com doença inativa	27	37,4 $\pm$ 7,5	46,6 $\pm$ 11,0	26,8 $\pm$ 5,9	31,9 $\pm$ 11,4
Controles sem doença autoimune	25	34,3 $\pm$ 4,2	41,7 $\pm$ 5,3	23,8 $\pm$ 2,9	29,8 $\pm$ 5,7

Figura 7 - Correlação entre as porcentagens de linfócitos B (CD19+) dos pacientes lúpicos que expressavam a proteína Fas e o SLEDAI.

Em relação à proteína Bcl-2, tanto a porcentagem de células quanto a IMF nos linfócitos T CD3+, CD4+, CD8+ e linfócitos B CD19+ não mostraram diferença estatística quando comparamos os pacientes lúpicos com doença ativa e doença inativa (Tabelas 11 e 12).

Quando comparamos os pacientes lúpicos com doença ativa e o grupo controle SDA observamos aumento significativo da IMF de Bcl-2 nos linfócitos T CD3+, CD4+, e CD8+, fato não observado nos pacientes com doença inativa.

Observamos ainda que os pacientes lúpicos com doença inativa apresentavam porcentagens de linfócitos T CD4+ e linfócitos B CD19+ que expressavam a proteína Bcl-2 significativamente diminuídos em relação aos controles SDA, resultado não observado anteriormente.

Houve correlação positiva apenas entre a porcentagem de linfócitos B (CD19+) que expressavam Bcl-2 e o SLEDAI ($r=0,47$ e $p=0,04$) (Figura 8).

Tabela 11 – Porcentagem de linfócitos T e B que expressavam a proteína Bcl-2 nos pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES) com doença ativa (SLEDAI $\geq$ 08) e com doença inativa (SLEDAI $<$ 8) e nos controles sem doença autoimune – Média $\pm$ desvio padrão (DP)

Pacientes e controles	Nº casos	Linfócitos T CD3+	Linfócitos T CD4+	Linfócitos T CD8+	Linfócitos B CD19+
LES com doença ativa	10	61,0 $\pm$ 10,5	33,8 $\pm$ 11,0	23,9 $\pm$ 5,1	11,9 $\pm$ 6,1
LES com doença inativa	25	53,9 $\pm$ 16,7	26,1 $\pm$ 10,7 ^{&}	26,5 $\pm$ 9,8	8,8 $\pm$ 6,6 ^{&}
Controles sem doença autoimune	25	54,0 $\pm$ 10,0	30,3 $\pm$ 6,7	23,4 $\pm$ 7,4	11,6 $\pm$ 3,8

[&] p<0,05, pacientes com LES ativo ou LES inativo comparado aos controles sem doença autoimune

Teste de Kruskal-Wallis

Tabela 12 – Intensidade média de fluorescência (IMF) da proteína Bcl-2 nos linfócitos T e B dos pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES) com doença ativa (SLEDAI $\geq$ 08) e com doença inativa (SLEDAI $<$ 8) e nos controles sem doença autoimune – Média $\pm$ desvio padrão (DP)

Pacientes e controles	Nº casos	Linfócitos T CD3+	Linfócitos T CD4+	Linfócitos T CD8+	Linfócitos B CD19+
LES com doença ativa	10	31,5 $\pm$ 7,1 ^{&}	31,3 $\pm$ 6,5 ^{&}	32,6 $\pm$ 8,2 ^{&}	25,9 $\pm$ 7,1
LES com doença inativa	25	27,8 $\pm$ 8,7	27,4 $\pm$ 8,6	28,1 $\pm$ 9,5	25,4 $\pm$ 10,5
Controles sem doença autoimune	25	26,0 $\pm$ 7,2	25,9 $\pm$ 7,2	25,5 $\pm$ 6,7	23,6 $\pm$ 5,6

[&] p<0,05, pacientes com LES ativo ou LES inativo comparado aos controles sem doença autoimune

Teste de Kruskal-Wallis

Figura 8 - Correlação entre as porcentagens de linfócitos B (CD19+) dos pacientes lúpicos que expressavam a proteína Bcl-2 e o SLEDAI.

6. DISCUSSÃO

Acredita-se, que os pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES) apresentem resposta autoimune desencadeada por macromoléculas intracelulares que são deslocadas para a superfície da célula durante o processo de apoptose e expostas no meio extracelular (Mevorah, 2003).

No LES quatro observações confirmam maior exposição do organismo às proteínas intracelulares: 1- Presença de anticorpos anti-DNA (Cassidy et al., 2001; White et al., 2003); 2– Risco aumentado para o desenvolvimento do LES em indivíduos que apresentam deficiências de C1q e conseqüente defeito na depuração de células apoptóticas (Browness et al., 1994; Pickering et al., 2000); 3– Proporção aumentada de linfócitos periféricos apoptóticos em pacientes lúpicos e acúmulo destes linfócitos ao redor dos macrófagos, sugerindo dificuldade na depuração das células apoptóticas (Emlen et al., 1994; Chan et al., 1997; Hermann et al., 1998; Courtney et al., 1999a e b) e 4– Proporção aumentada de anticorpos anti-nucleossomo em pacientes lúpicos em relação aos indivíduos saudáveis e aos pacientes com outras doenças autoimunes (Simón et al., 2004; Koutouzov et al., 2004).

No entanto, falha na depuração das células apoptóticas não parece ser o único mecanismo responsável pela maior exposição do organismo a proteínas intracelulares. Alterações dos genes pró-apoptóticos e anti-apoptóticos também parecem ocorrer. Acredita-se que o aumento da expressão da proteína Fas cause aumento da apoptose e maior exposição

do organismo aos antígenos intracelulares e que o aumento da expressão da proteína Bcl-2 possa inibir a apoptose de células autoreativas, podendo iniciar ou perpetuar a resposta autoimune (Andrade et al., 2000).

Vários modelos experimentais têm correlacionado o LES as alterações genéticas ligadas a apoptose. Modelos murinos, geneticamente modificados, que apresentam deficiência (“knockout mice”) ou aumento da expressão (“transgenic mice”) de um gene específico são úteis para a compreensão da função biológica normal deste gene. Nos modelos murinos, onde houve mutação do gene Fas com bloqueio de sua expressão e nos modelos onde ocorreu aumento da expressão de Bcl-2, observaram-se fenótipos semelhantes ao LES (Strasser et al., 1991; Drappa et al., 1996). Em conjunto, os resultados dos estudos realizados em modelos murinos com deficiências ou aumento da expressão de proteínas confirmam a importância das proteínas Fas e Bcl-2 na regulação das células do sistema imune e sugerem que defeitos nestas proteínas possam estar presentes em pacientes com doenças autoimunes. Estes estudos também indicam caminhos para intervenções terapêuticas (Nicholson, 2000; Serry et al., 2001). No entanto, diferente do observado nos estudos com modelos murinos, mutações do gene Fas não puderam ser demonstradas, de forma consistente, em pacientes lúpicos. Por outro lado, deficiência funcional do receptor Fas foi relatada em crianças que apresentavam doenças autoimunes, como anemia hemolítica, mas não desenvolviam LES clássico, diferente dos modelos murinos (Rieax-Laucat et al., 1995). De modo similar, associação entre o gene Bcl-2 e o LES foi observada por Mehriam e

colaboradores (1998), mas não por Huang e colaboradores (1996). O Fas é um receptor de membrana promotor de apoptose e o Bcl-2 é uma proteína intracelular inibidora da apoptose (Krueger et al., 2003). As proteínas Fas e Bcl-2 parecem estar, pelo menos em parte, funcionalmente ligadas, uma vez que, estudos observaram que o Bcl-2 é capaz de inibir o processo de apoptose induzido pela proteína Fas (Itoh et al., 1993).

A expressão das proteínas Fas e Bcl-2 pode ser estudada por diversas técnicas o que pode levar a resultados discordantes e de difícil comparação. Pode-se avaliar a expressão destas proteínas medindo a quantidade de mRNA produzido, como no estudo de Papo e colaboradores (1998), ou pode-se avaliar a quantidade sérica destas proteínas, como nos estudos de Jodo e colaboradores (1997) e de Miret e colaboradores (1999 e 2001), pode-se ainda quantificar a expressão celular destas proteínas por meio da citometria de fluxo, como nos estudos de Ohsako e colaboradores (1994), de Amasaki e colaboradores (1995), de Falcini e colaboradores (1999) e de Aringer e colaboradores (1994). A citometria de fluxo permite observar a expressão das proteínas Fas e Bcl-2 em cada subtipo celular (linfócitos T CD4+, linfócitos T CD8+ e linfócitos B CD19+). Esta técnica permite ainda quantificar a porcentagem de cada subtipo celular que expressa a proteína estudada (porcentagem de células duplamente marcadas) e também quantificar o número ou a densidade de expressão desta proteína por célula, por meio da intensidade média de fluorescência (IMF). Mesmo nos estudos que utilizaram a citometria de fluxo para avaliar a expressão das proteínas Fas e Bcl-2 os resultados são discordantes e de

difícil comparação, pois alguns avaliaram apenas a porcentagem de linfócitos T (CD3+) que expressavam a proteína Fas (Courtney et al., 1999b), outros avaliaram a quantidade de antígenos (IMF) Fas expressos nas células CD4+ e CD8+ (Amasaki et al., 1995) e outros avaliaram apenas a expressão da proteína Bcl-2 (Falcini et al., 1999). No presente estudo avaliamos a expressão das proteínas Fas e Bcl-2 por citometria de fluxo, nas células T e B e nos subtipos de células T e quantificamos suas expressões tanto por meio da porcentagem de células duplamente marcadas quanto pela IMF para podermos determinar o perfil completo de expressão destas proteínas em crianças e adolescentes com LES.

Neste estudo optamos também por estudar linfócitos não estimulados, pois nos linfócitos, as vias intrínseca e extrínseca da apoptose podem ser desencadeadas por diversos estímulos (Ivanovska et al., 2004). Deste modo, evitamos que estímulos externos aumentassem a expressão das proteínas relacionadas a apoptose, permitindo o estudo da alteração primária da morte celular programada.

Nossos resultados evidenciaram aumento da expressão da proteína Fas nos linfócitos T e B e aumento da expressão da proteína Bcl-2 em linfócitos T de pacientes com LES de início na infância. Além disto, observamos que pacientes lúpicos com doença ativa apresentavam o dobro da porcentagem de linfócitos B que expressavam a proteína Fas quando comparados aos pacientes com doença inativa.

Em relação à proteína Fas, nossos resultados foram semelhantes aos de Lorenz e colaboradores (1997) que observaram que $73\pm 17\%$ dos

linfócitos T dos pacientes com LES expressavam Fas comparados a $45\pm 5\%$ dos indivíduos normais ($p < 0,05$). Courtney e colaboradores (1999b) não encontraram aumento das porcentagens de linfócitos T (CD3+) que expressavam a proteína Fas nos pacientes lúpicos em relação aos controles. Já, Ohsako e colaboradores (1994) observaram aumento da porcentagem de linfócitos B que expressavam a proteína Fas nos pacientes lúpicos com doença ativa quando comparados aos controles, mas não observaram diferenças em relação aos linfócitos T. Enquanto, Bijl e colaboradores (2001a) ao estudarem 33 pacientes com lúpus de início na idade adulta observaram aumento apenas da porcentagem de linfócitos B que expressavam Fas nos pacientes com doença ativa.

Quando estudamos os subgrupos de linfócitos T, observamos que os pacientes lúpicos apresentavam porcentagens de linfócitos T CD4+ que expressavam a proteína Fas semelhantes à do grupo controle SDA (Tabela 5). Bijl e colaboradores (2001b) viram que linfócitos T CD4+ de pacientes lúpicos expressam a mesma porcentagem de Fas que os controles normais, resultado semelhante ao nosso. No entanto, os pacientes lúpicos com doença ativa apresentavam porcentagens de linfócitos T CD4+ que expressavam Fas maiores que o grupo controle SDA (Tabela 9). Amasaki e colaboradores (1995) observaram que linfócitos T CD4+ de pacientes lúpicos apresentavam maior IMF quando comparado aos indivíduos normais, mas não observaram diferença na porcentagem de linfócitos T CD4+ que expressavam esta proteína. Em relação aos linfócitos T CD8+, observamos que os pacientes lúpicos apresentavam porcentagens de linfócitos T CD8+

que expressavam a proteína Fas significativamente maiores que o grupo controle SDA (Tabelas 5 e 9). Amasaki e colaboradores (1995) observaram aumento da IMF da proteína Fas nos linfócitos T CD8+, mas não da porcentagem de linfócitos T CD8+ que expressavam esta proteína.

Em relação à proteína Bcl-2 observamos que os pacientes lúpicos apresentavam maior quantidade de antígenos Bcl-2 (IMF) expressos nos linfócitos T, mas não nos linfócitos B. Este resultado foi semelhante ao de Aringer e colaboradores (1994) que viram em linfócitos T de pacientes lúpicos maior IMF de Bcl-2 (210 ± 36) quando comparada aos indivíduos saudáveis (208 ± 22 ; $p=0,0002$). Falcini e colaboradores (1999) ao estudarem pacientes com LES juvenil obtiveram o mesmo resultado. No estudo de Ohsako e colaboradores (1994), os pacientes lúpicos com doença ativa apresentavam aumento das porcentagens de linfócitos T (CD3+) que expressavam Bcl-2 (52 a 100%, $p<0,005$) quando comparados aos pacientes com doença inativa (4 a 85%) ou aos controles saudáveis (8 a 44%). Este resultado foi diferente do obtido no presente estudo, pois não observamos diferença na porcentagem de linfócitos T ou B que expressavam Bcl-2 entre os pacientes lúpicos e os controles SDA (Tabela 7). Já Lorenz e colaboradores (1997) não observaram diferença significativa na expressão da proteína Bcl-2 em linfócitos T, B e monócitos de pacientes lúpicos.

Em relação à atividade da doença, observamos que os pacientes lúpicos com doença ativa apresentam perfil de expressão das proteínas Fas e Bcl-2 nos linfócitos T e B diferente dos pacientes com doença inativa. Os pacientes lúpicos com doença ativa apresentam aumento da expressão da

proteína Fas nos linfócitos T CD3+, CD4+, CD8+ e o dobro da expressão desta proteína nos linfócitos B CD19+ e aumento da expressão da proteína Bcl-2 nos linfócitos T CD3+, CD4+ e CD8+ quando comparado ao grupo controle SDA. Já, os pacientes com doença inativa apresentam aumento da expressão da proteína Fas nos linfócitos T CD3+, CD8+ e nos linfócitos B CD19+ e diminuição da expressão da proteína Bcl-2 nos linfócitos T CD4+ e linfócitos B CD19+ quando comparado ao grupo controle SDA.

Quando comparamos a expressão das proteínas Fas e Bcl-2 nos pacientes com doença ativa e doença inativa observamos diferença significativa apenas na porcentagem de linfócitos B que expressavam Fas. Os pacientes com doença ativa apresentavam o dobro da porcentagem de linfócitos B que expressavam Fas.

Observamos ainda que houve correlação entre a expressão das proteínas Fas e Bcl-2 e o SLEDAI apenas nos linfócitos B. Houve correlação positiva entre a porcentagem de linfócitos B que expressavam Fas ($r=0,38$; $p=0,02$) e entre a porcentagem de linfócitos B que expressavam Bcl-2 ($r=0,47$ e $p=0,04$) e o SLEDAI (Figuras 7 e 8).

A distinção entre doença ativa e inativa em pacientes lúpicos é muito importante e freqüentemente difícil. Atualmente apenas dois indicadores laboratoriais são considerados sensíveis neste aspecto, a presença do anticorpo anti-DNA e os níveis séricos do complemento total e de suas frações C3 e C4. A possibilidade de um novo marcador de atividade da doença, que poderia ser a expressão da proteína Fas nos linfócitos B, e seu eventual comportamento naquelas situações onde os marcadores atuais não

apresentam bom desempenho, como por exemplo, nos comprometimentos neurológicos, abre perspectivas muito interessantes que deverão ser objeto de estudos futuros e que certamente envolverão também novas possibilidades de monitorar a terapêutica.

A expressão aumentada da proteína Fas sugere que os linfócitos T e B dos pacientes lúpicos apresentam aumento da apoptose e conseqüente maior exposição do organismo a autoantígenos. Alguns estudos relatam quantidades aumentadas do Fas solúvel nos pacientes lúpicos (aproximadamente 60% maiores) e observam que o Fas solúvel é capaz de inibir a apoptose induzida, *in vivo*, pela proteína Fas (Jodo et al., 1997; Courtney et al., 1997; Al-Maini et al., 2000). Esta observação sugere que o aumento da expressão da proteína Fas é secundário ao aumento do Fas solúvel. No entanto, a apoptose não ocorre, permitindo maior proliferação celular em resposta a autoantígenos (Ohsako et al., 1994). Outros estudos sugerem que a alteração genética primária não estaria no gene Fas e sim nos seus ligantes, no Fas ligante, no TRAIL ou no TWEAK, como já observado no rato Gld e em pacientes lúpicos e, portanto, novamente, o aumento da expressão da proteína Fas seria secundário no LES (Suda et al., 1993; Wu et al., 1996). Por outro lado, o aumento da expressão da proteína Bcl-2 nos linfócitos T dos pacientes com LES sugere que estes linfócitos podem se manter ativados, ou seja, exercendo suas funções, por períodos de tempo mais prolongados.

Os linfócitos T apresentam papel importante na regulação imune no LES e, portanto, o conhecimento do número de linfócitos T ativados ou

anormais é uma importante ferramenta para monitorar a atividade da doença. Linfócitos T ativados expressam proteínas que não estavam presentes em linfócitos em repouso ou aumentam a expressão de certas proteínas (Abbas et al., 2000b). Por exemplo, linfócitos T ativados expressam HLA-DR na membrana celular. Alguns autores têm demonstrado maior porcentagem de linfócitos T DR+ em pacientes lúpicos com doença ativa, esta expressão está especialmente aumentada nos linfócitos T CD8+ (Illei et al., 2004). Linfócitos T em repouso expressam pequenas quantidades do receptor Fas, as quais aumentam rapidamente durante sua ativação (Krueger et al., 2003). O LES caracteriza-se também pela ativação de células B que resulta em hipergamaglobulinemia policlonal e produção de autoanticorpos. Recentemente foi demonstrado que pacientes lúpicos com doença ativa (SLEDAI>8) apresentam maior porcentagem de linfócitos CD19+ (Illei et al., 2004). Linfócitos T ou linfócitos B ativados, por exemplo, por um patógeno, após sua ação sofrem morte celular por apoptose para manter a homeostase da população de linfócitos. Este processo é mediado pela ligação do receptor Fas ao seu ligante e pela proteína Bcl-2 (Ivanovska et al., 2004). Linfócitos B que produzem anticorpos de alta afinidade tornam-se plasmócitos, enquanto, os de afinidade intermediária tornam-se linfócitos B de memória. Linfócitos B que produzem anticorpos de baixa afinidade entram em apoptose, no entanto, este processo pode ser bloqueado pela proteína Bcl-2, que pode inibir também a deleção de linfócitos B autoreativos (Ivanovska et al., 2004).

Neste estudo observamos que os pacientes lúpicos com doença ativa apresentam porcentagens de células B que expressam a proteína Fas significativamente maiores que os pacientes com doença inativa. Este achado sugere que as células B foram ativadas, exerceram suas funções e estão prontas para morrer ou entrar em apoptose. O aumento da porcentagem de linfócitos B que expressavam Fas correlacionou-se positivamente ao SLEDAI, sugerindo que quanto maior a atividade da doença, maior o número de linfócitos B ativados, o que é coerente. No entanto, a apoptose dos linfócitos B parece não ocorrer, pois os pacientes com doença ativa apresentam vários autoanticorpos. A apoptose destas células pode estar inibida pelo aumento de expressão de Bcl-2 ou devido ao estímulo constante dos linfócitos T CD4⁺ por meio da ligação do co-estimulador CD40L com CD40 que inibe a indução de apoptose das células B pela via de ativação do Fas (Crow, 2004). Esta última hipótese torna-se particularmente interessante quando observamos que os pacientes lúpicos com doença ativa apresentavam aumento da expressão da proteína Fas nos linfócitos T CD4⁺, sugerindo que estes linfócitos estavam ativados e observamos que não houve aumento da expressão de Bcl-2 nos linfócitos B. Devemos lembrar também que o linfócito B é uma célula apresentadora de antígeno (APC) e, portanto sua ativação pode sugerir maior apresentação de antígenos ao linfócito T e conseqüente ativação do mesmo. Esta hipótese é corroborada pelo achado de Bijl e colaboradores (2001c) que observaram aumento da expressão de CD86 na membrana de linfócitos B de pacientes com LES. Outra observação que sugere ativação constante ou prolongada

dos linfócitos T é que, os linfócitos T CD4+ e CD8+ dos pacientes lúpicos com doença ativa apresentavam aumento da expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2, fato este não observado nos pacientes com doença inativa (Tabela 12).

Neste estudo observamos que os pacientes lúpicos apresentavam expressão aumentada das proteínas Fas e Bcl-2 em linfócitos T e B também quando comparados aos pacientes com ARJ e DM e que, nestes últimos, a expressão destas proteínas foi semelhante ao grupo controle SDA. Este resultado sugere que a maior expressão destas proteínas nos pacientes lúpicos não está relacionada à inflamação crônica, e que provavelmente este aumento seja resultado de alteração imune que ocorre particularmente no LES. Alterações do processo de apoptose têm sido observadas em diversas doenças reumatológicas. Szodoray e colaboradores (2003) viram diminuição da apoptose induzida por anti-CD95 em linfócitos T CD4+ e CD8+ de pacientes com artrite reumatóide. Estes autores observaram ainda diminuição da expressão das proteínas Fas e Bax e aumento da expressão de Bcl-2 nas células mononucleares destes pacientes, resultado não observado no presente estudo. De modo similar, Smolewska e colaboradores (2003) observaram aumento dos linfócitos apoptóticos em pacientes com artrite reumatóide juvenil, mas a expressão da proteína Fas e os níveis séricos do Fas solúvel foram semelhantes aos dos controles. Sioud e colaboradores (1998) notaram aumento da expressão de Fas, Fas ligante e Bcl-xl em linfócitos T CD3+ do líquido sinovial de pacientes com artrite reumatóide e artrite reumatóide juvenil forma poliarticular. Em pacientes com

dermatomiosite não há relatos na literatura da expressão das proteínas relacionadas a apoptose em células mononucleares periféricas. Behrens e colaboradores (1997) observaram expressão das proteínas Fas e Bcl-2 em fibras musculares e células do infiltrado inflamatório de pacientes com polimiosite, miosite por corpo de inclusão, dermatomiosite e distrofia muscular de Duchenne. Sugiura e colaboradores (1999) notaram expressão da proteína Fas tanto em fibras musculares quanto em células do infiltrado inflamatório e expressão do Fas ligante em linfócitos T CD4+. Por outro lado, Falcini e colaboradores (2000) viram expressão da proteína Bcl-2 em fibras musculares de pacientes com dermatomiosite juvenil. Em pacientes com febre reumática, Hayata (2004) observou diminuição da apoptose de células mononucleares periféricas, no entanto a apoptose induzida por anti-CD95 estava mantida. Este autor observou também diminuição da expressão de CD25 e CD28 em linfócitos T CD4+ de pacientes com febre reumática comparados a controles saudáveis.

O comportamento único das proteínas Fas e Bcl-2 nos linfócitos T e B dos pacientes lúpicos sugere que estes parâmetros possam vir a ser utilizados como auxiliares no diagnóstico precoce desta doença e como indicador desta patologia nos casos de doenças indiferenciadas ou de superposição.

Os corticosteróides e os imunossupressores podem induzir apoptose de linfócitos (Andrade et al., 2004). Os corticosteróides inibem a produção de fatores de transcrição como o NF κ B, que induz ou suprime a síntese de uma série de proteínas; a ciclofosfamida inibe a síntese de DNA e, portanto, a

proliferação celular, a ciclosporina bloqueia a ativação de linfócitos T mediada por IL-2 e estudos recentes demonstraram que a azatioprina inibe a ativação dependente de CD28 da GTPase Rac1 reduzindo NF κ B e Bcl-xl e induz apoptose de células T (Tiede et al., 2003; Janeway et al., 2005b). Os pacientes lúpicos e também os pacientes com ARJ e DM estavam em uso de corticosteróide e de imunossupressores. Se estas drogas induzem apoptose por meio da proteína Fas, então deveríamos observar aumento da expressão desta proteína tanto nos pacientes lúpicos quanto nos pacientes com ARJ ou DM. Por outro lado, se a indução da apoptose ocorre por via independente do Fas, sua expressão deveria ser igual nos pacientes com LES, ARJ e DM. Portanto, o aumento da expressão da proteína Fas nos pacientes lúpicos não parece estar relacionado ao uso de medicamentos. Ainda, no presente estudo, observamos aumento da expressão da proteína Fas nos linfócitos T e B, tanto dos pacientes com doença ativa e, portanto maior uso de corticosteróides e imunossupressores, quanto dos pacientes com doença inativa e conseqüente menor uso destas drogas. No entanto, Ho e colaboradores (2001) observaram, in vitro, expressão aumentada da proteína Fas em linfócitos de pacientes lúpicos tratados com dexametasona. Já, Liu e colaboradores (2001) observaram, in vitro, diminuição significativa da porcentagem de linfócitos apoptóticos em pacientes com LES quando hidroxiclороquina foi acrescida ao meio de cultura.

O aumento da expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2 tem sido associado à resistência as drogas citotóxicas em diversas neoplasias (Miyashita, 1992; Miyashita, 1994; Reed, 1997). Observamos aumento da

expressão da proteína Bcl-2 apenas nos pacientes com doença ativa, o que pode sugerir que a terapêutica utilizada não está sendo efetiva. Este resultado é semelhante ao de Graninger (1992) que observou que pacientes lúpicos com doença ativa apresentavam aumento da expressão de Bcl-2, mas após o tratamento com ciclofosfamida não foi mais observada transcrição de Bcl-2 nestes pacientes. Portanto, a expressão das proteínas Fas e Bcl-2 em linfócitos T e B pode ter valor preditivo de resposta à terapêutica. Ainda, intervenções no processo de apoptose podem constituir terapias mais efetivas no LES. De fato, o uso de Bcl-2 antisense em estudo clínico fase III para melanoma maligno mostrou-se promissor e outros estudos estão em andamento para linfoma não Hodgkin, leucemia aguda, entre outros (Nicholson, 2000). Em um estudo pré-clínico, a administração de inibidor de caspase ao modelo transgênico de rato lúpico resultou na melhora da lesão renal (Nicholson, 2000; Seery et al., 2001). Outro estudo transferiu Fas ligante para linfócitos MRL/gld, e estas células foram administradas ao rato MRL/gld. O acúmulo de linfócitos T e B que estes ratos apresentavam reduziu e a hipergamaglobulinemia remitiu (Hong et al., 1998).

Os resultados obtidos no presente estudo demonstram que alterações do processo de apoptose ocorrem em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico juvenil de modo similar ao observado nos pacientes adultos. O aumento da expressão das proteínas Fas e Bcl-2 nos linfócitos T e B dos pacientes lúpicos sugere alteração no equilíbrio das proteínas indutoras e inibidoras da apoptose e conseqüente alteração na exposição do organismo aos autoantígenos. Nossos resultados sugerem ainda que pacientes lúpicos

mantêm estado pró-apoptótico independente da atividade da doença, pois os pacientes com doença inativa apresentavam aumento da expressão da proteína Fas nos linfócitos T e B, mas não da proteína Bcl-2 (Tabelas 9 e 12). Portanto, as alterações do processo de apoptose parecem ser primárias no LES e não apenas relacionadas à atividade da doença. No entanto, os pacientes lúpicos com doença ativa apresentaram perfil de expressão das proteínas Fas e Bcl-2 diferente dos pacientes com doença inativa, particularmente em relação à expressão da proteína Fas nos linfócitos B, o que poderia ser utilizado como parâmetro para diferenciar estes dois grupos de pacientes e buscar opções terapêuticas mais efetivas e específicas para o controle da atividade da doença.

7. CONCLUSÕES

- 7.1 – Os pacientes com lúpus eritematoso sistêmico de início na infância apresentam aumento da expressão das proteínas Fas e Bcl-2 em células mononucleares periféricas: linfócitos T auxiliares (CD4+), linfócitos T citotóxicos (CD8+) e linfócitos B (CD19+), quando comparado ao grupo controle e aos pacientes com artrite reumatóide juvenil e dermatomiosite, confirmando a presença de alterações no processo de apoptose específicas desta doença autoimune.
- 7.2 – Os pacientes lúpicos mantêm estado pró-apoptótico independente da atividade da doença, pois os pacientes com doença inativa apresentam aumento da expressão da proteína Fas em linfócitos T e B, mas não da proteína Bcl-2.
- 7.3 – Existe correlação positiva entre a expressão das proteínas Fas e Bcl-2 em linfócitos B e a atividade da doença medida pelo SLEDAI.
- 7.4 – A porcentagem de linfócitos B que expressam a proteína Fas nos pacientes lúpicos com doença ativa é duas vezes maior do que a observada nos pacientes com doença inativa. Estes resultados sugerem que este parâmetro deverá ser estudado como um provável indicador de atividade da doença e também poderá ser utilizado para monitorar a eficácia terapêutica em pacientes com LES.

8. ANEXOS

ANEXO A - Critérios de classificação do Lúpus Eritematoso Sistêmico (Tan et al., 1982; Hochberg, 1997).

1. Eritema malar fixo plano ou elevado, sobre as eminências malares, poupando as dobras nasolabiais (asa de borboleta)
2. Lupus discóide - placas eritematosas com descamação e cicatrização atrófica
3. Fotossensibilidade - eritema cutâneo persistente desencadeado pela exposição à luz solar
4. Úlcera de mucosa oral ou nasal, geralmente indolor, observada pelo médico
5. Artrite não erosiva envolvendo duas ou mais articulações periféricas
6. Serosites - pleurite (atrato pleural ou derrame pleural) e/ou pericardite (atrato pericárdico ou derrame pericárdio)
7. Alterações renais - proteinúria superior a 500 mg/dia e/ou presença de cilindrúria
8. Alterações neurológicas - convulsão e/ou psicose na ausência de distúrbios metabólicos, hipertensão arterial ou infecções
9. Alterações hematológicas - anemia hemolítica e/ou leucopenia (menos que 4.000/mm³) e/ou linfopenia (menos que 1.500/mm³) e/ou plaquetopenia (menos que 100.000/mm³) em duas ou mais ocasiões distintas
10. Alterações imunológicas - presença de célula LE e/ou anticorpo anti-DNA e/ou anticorpo anti-Sm e/ou VDRL falso positivo
11. Fator antinúcleo (FAN) positivo

Obs: No critério de classificação do LES proposto por Hochberg em 1997 a presença das células LE e do VDRL falso positivo do item 10 foram substituídos pela presença dos anticorpos anti-cardiolipina IgG e/ou IgM e/ou do anticoagulante lúpico.

ANEXO B - Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index (SLEDAI) (Bombardier et al., 1992; Okuda, 1995). Coloca-se a pontuação na coluna de “score” se a descrição estiver presente no momento ou ocorreu nos 10 dias que precederam a visita. A pontuação varia de zero a 105.

Pontuação	SLEDAI “score”	Manifestação	Definição
8	_____	Convulsão	Início recente. Excluir causas metabólicas, infecciosas ou drogas.
8	_____	Psicose	Dificuldade de exercer suas atividades normais por distúrbio na percepção da realidade: alucinação, incoerência, perda da capacidade associativa, da organização do pensamento, pensamento ilógico, bizarro, desorganizado, catatonia. Excluir causas metabólicas e drogas.
8	_____	Síndrome orgânica cerebral	Alteração da função mental, com dificuldade de orientação, memória, ou outras funções intelectuais, com início rápido e características flutuantes. Inclui alteração da consciência com redução da capacidade de manter atenção ao ambiente, e mais duas das seguintes alterações: distúrbio da percepção, fala incoerente, insônia ou sonolência durante o dia, ou aumento ou diminuição da atividade psicomotora. Excluir causas metabólicas ou drogas.
8	_____	Distúrbio visual	Alterações da retina devido ao LES. Inclui corpos citóides, hemorragia retiniana, exudato seroso ou hemorrágico em coróide ou neurite óptica. Excluir hipertensão, infecção e drogas.
8	_____	Alteração de pares cranianos	Alteração recente sensória ou motora envolvendo pares cranianos.
8	_____	Cefaléia lúpica	Cefaléia intensa, persistente, tipo enxaqueca e que não responde a analgésicos e narcóticos.
8	_____	AVC	AVC recente. Excluir arteriosclerose.
8	_____	Vasculite	Úlceras, gangrena, nódulos, infarto periungueal, hemorragias, ou biópsia ou arteriografia com vasculite.
4	_____	Artrite	Dois ou mais articulações com dor ou sinais inflamatórios.
4	_____	Miosite	Dor ou fraqueza muscular proximal, associados a elevação das enzimas musculares ou eletromiografia alterada ou biópsia com miosite.
4	_____	Cilindrúria	Presença de cilindros hialinos ou hemáticos.
4	_____	Hematúria	> 5 hemáceas por campo. Excluir cálculos, infecção ou outras causas.
4	_____	Proteinúria	> 0,5g/24h. Recente.
4	_____	Leucocitúria	> 5 leucócitos por campo. Excluir infecção.
2	_____	Rash malar	Recente ou recorrente.
2	_____	Alopecia	Recente ou recorrente.
2	_____	Úlceras de mucosa	Recientes ou recorrentes nasais ou orais.
2	_____	Pleurite	Dor pleural com atrito, espessamento ou derrame pleural.
2	_____	Pericardite	Dor torácica com atrito ou derrame pericárdico ou confirmação por ECG ou Ecocardiograma.
2	_____	Complemento baixo	Diminuição de CH50 ou C3 ou C4
2	_____	Aumento do anti-DNA	Aumento recente
1	_____	Febre	> 38°C. Excluir infecção.
1	_____	Plaquetopenia	< 100.000 plaquetas/mm ³
1	_____	Leucopenia	< 3.000 leucócitos/mm ³ . Excluir drogas.
Total			

ANEXO C – Termo de consentimento pós - informação

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS - INFORMAÇÃO**I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL**

1. NOME DO PACIENTE:.....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO Nº APTO:
BAIRRO:.....CIDADE.....
CEP:.....TELEFONE: DDD (.....)
2. RESPONSÁVEL LEGAL
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
DOCUMENTO DE IDENTIDADE :SEXO: M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO:.....Nº.....APTO:.....
BAIRRO:.....CIDADE:.....
CEP:.....TELEFONE:DDD(.....).....

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: "EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS FAS E BCL-2 EM CÉLULAS MONONUCLEARES DE CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO".

.....
PESQUISADOR: Dra. BERNADETE DE LOURDES LIPHAUS

.....
CARGO/FUNÇÃO: MÉDICO ASSISTENTE

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 72.321

UNIDADE DO HCFMUSP: DEPARTAMENTO DE PEDIATRIA – INSTITUTO DA CRIANÇA.

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO ☒ RISCO MÍNIMO ☐ RISCO MÉDIO ☐
RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

4. DURAÇÃO DA PESQUISA :3 ANOS

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA, CONSIGNANDO:

1. justificativa e os objetivos da pesquisa; 2. procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais; 3. desconfortos e riscos esperados; 4. benefícios que poderão ser obtidos; 5. procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo.

OBSERVAÇÃO: SEGUE ABAIXO EXPLICAÇÃO DETALHADA DOS QUESITOS ACIMA SOLICITADOS.

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA:

1. acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.
2. liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.
3. salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.
4. disponibilidade de assistência no HCFMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa.
5. viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa.

VIDE EXPLICAÇÃO DETALHADA ABAIXO

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

É necessário que você leia e entenda o estudo antes de assinar este documento. Por isso, se você não entender qualquer palavra ou informação, por favor, peça ao médico que explique.

O seu filho ou a criança ou adolescente sob sua responsabilidade está sendo convidado a participar de um estudo para avaliar a expressão das proteínas Fas e Bcl-2 em células mononucleares de crianças e adolescentes com Lúpus Eritematoso Sistêmico.

Doença do estudo:

O Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é uma doença autoimune sistêmica que compromete vários órgãos e sistemas e que se caracteriza por exacerbações e remissões.

Apesar dos inúmeros esforços já realizados, a causa ou causas do LES permanecem desconhecidas.

Recentemente, estudos têm apontado para a possibilidade de que uma expressão aumentada e/ou diminuída das proteínas Fas e Bcl-2 possam estar envolvidas no desenvolvimento do LES.

Objetivos do estudo:

O estudo tem como objetivo avaliar a expressão das proteínas Fas e Bcl-2 em células mononucleares de crianças e adolescentes com Lúpus Eritematoso Sistêmico e comparar com um grupo de crianças e adolescentes sem doença autoimune e verificar se a expressão destas proteínas esta alterada nos pacientes com LES. Este estudo também tem por objetivo correlacionar a expressão das proteínas Fas e Bcl-2 com a presença ou não de atividade da doença através do índice de atividade do LES (SLEDAI).

Como será feito o estudo:

Se você decidir que a criança ou adolescente pode fazer parte do estudo, ele passará por uma avaliação médica completa. O médico pedirá que você forneça várias informações sobre a criança ou adolescente e também informe se ela está usando algum medicamento e se já está participando de algum outro estudo. Caso prefira que a criança ou adolescente não participe do estudo, o atendimento será feito da mesma forma que os demais pacientes e todos os seus direitos serão mantidos.

Após os exames feitos pelo médico ele dirá se a criança pode participar ou não do estudo.

Será então coletado 20 ml de sangue através de punção de veia periférica, como a realizada rotineiramente para a realização dos exames de controle do LES.

O sangue coletado será encaminhado ao laboratório específico para análise da expressão das proteínas Fas e Bcl-2.

Riscos que a criança ou adolescente corre em participar do estudo:

Pode ocorrer, eventualmente, alguma mancha roxa no braço da criança ou adolescente devido à retirada de sangue, portanto o risco para a criança ou adolescente devido aos procedimentos do estudo é muito pequeno.

Benefícios para a criança ou adolescente:

O benefício direto da análise da expressão das proteínas Fas e Bcl-2 no LES é uma melhor compreensão de suas possíveis causas e, portanto o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, mais específicas e eficazes, para o tratamento dos pacientes lúpicos.

Segurança do paciente:

O médico que está atendendo a criança no hospital poderá responder qualquer dúvida que você tenha a respeito do estudo.

A Comissão de Ética deste hospital aprovou a realização do estudo, considerando-o ético e seguro, sendo que o mesmo será conduzido de acordo com as exigências da lei brasileira para realização de estudos clínicos.

Se você tiver dúvidas sobre o estudo entre em contato com o médico:

Dra. Bernadete de Lourdes Liphau

Unidade de Reumatologia do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

**Rua Enéas de Carvalho Aguiar, 647. Crequeira Cesar, São Paulo - SP
CEP: 05403-900 Telefone: (011) 3069-8510 ou 3069-8675**

Se você tiver dúvida sobre os direitos da criança durante a participação no estudo, você pode entrar em contato com um dos membros do Comitê de Ética que aprovou a realização deste estudo no hospital:

Confidencialidade:

Todas as informações obtidas sobre a doença e o tratamento da criança ou adolescente durante o estudo são confidenciais e os registros médicos da criança ou adolescente feitos no hospital estarão disponíveis para serem verificados apenas pelos médicos do hospital e por algum órgão do governo relacionado como o Ministério da Saúde.

Os dados que serão coletados do estudo serão publicados, mas o nome da criança não será revelado.

Se você concordar que a criança ou adolescente participe do estudo será necessário um consentimento por escrito de sua parte.

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO DE UM DOS PAIS OU TUTOR LEGAL

Eu, abaixo assinado, declaro pela presente que:

1. li, ou foi lido para mim, na íntegra, o formulário de informações ao paciente, isto é, o conteúdo do estudo no idioma nacional que eu entendo e recebi explicações suficientes a respeito.
2. tive a oportunidade de fazer perguntas ao médico do estudo e recebi respostas satisfatórias.
3. recebi uma cópia do formulário de informações ao paciente para arquivo.
4. entendo que foi solicitado que meu filho participe de um estudo. A criança ou adolescente não está participando de nenhum outro estudo neste momento. Compreendo os riscos e benefícios e consinto livremente que meu filho participe do estudo descrito neste formulário.
5. estou ciente que tenho o direito de recusar que meu filho participe deste estudo ou de retirar meu consentimento a qualquer momento sem que isso resulte em qualquer desvantagem para meu filho.
6. concordo que os representantes do Órgão Nacional de Medicamentos e Autoridades Regulatórias possam inspecionar os registros médicos do meu filho com o investigador e verificar a exatidão da documentação. Os princípios de proteção de dados serão observados nesse caso. Dispensio meu médico de seu dever de confidencialidade em relação a esses representantes.

Data Assinatura de um dos pais do paciente ou tutor legal

Data Assinatura do médico que forneceu as informações

Nº de registro do paciente no ICR _____ Iniciais do paciente: _____

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

VIDE ITEM ANTERIOR.

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa

São Paulo, de de 20

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

assinatura do pesquisador

Dra. BERNADETE DE LOUDES LIPHAUS

ANEXO D – Protocolo de características clínicas e laboratoriais dos pacientes lúpicos.

A - IDENTIFICAÇÃO

Nome: _____ Registro: _____
 Pai: _____ Mãe: _____
 Data de nascimento: _____ Data de início do LES: _____
 Idade atual: _____ Tempo de duração do LES: _____
 Data da 1ª consulta: _____ Data avaliação: _____
 Raça: _____ Sexo: _____ Procedência: _____
 Naturalidade: _____ Telefone: _____
 Endereço: _____
 CEP: _____ Bairro: _____ Cidade: _____ Estado: _____
 Escolaridade: _____ Profissão: _____

B – MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DO LES

• Sintomas constitucionais	sim ()	não ()
Febre	sim ()	não ()
Perda de peso	sim ()	não ()
• Sistema retículo-endotelial	sim ()	não ()
Adenomegalia	sim ()	não ()
Hepatomegalia	sim ()	não ()
Esplenomegalia	sim ()	não ()
• Cutâneo-mucoso	sim ()	não ()
Eritema malar	sim ()	não ()
Vasculite cutânea	sim ()	não ()
Fotossensibilidade	sim ()	não ()
Livedo reticular	sim ()	não ()
Úlceras orais / nasais	sim ()	não ()
Outros _____	sim ()	não ()
• Músculo-esquelético	sim ()	não ()
Artrite	sim ()	não ()
Miosite	sim ()	não ()
Osteonecrose	sim ()	não ()
• Cardíaco	sim ()	não ()
Pericardite	sim ()	não ()
Miocardite	sim ()	não ()
Valvulite	sim ()	não ()

• Pulmonar	sim ()	não ()
Pleurite	sim ()	não ()
Pneumonite intersticial	sim ()	não ()
• Sistema nervoso central	sim ()	não ()
Cefaléia importante	sim ()	não ()
Convulsão	sim ()	não ()
Distúrbio do comportamento	sim ()	não ()
Acidente vascular cerebral	sim ()	não ()
Psicose	sim ()	não ()
Coréia	sim ()	não ()
Amaurose fugaz	sim ()	não ()
Coma	sim ()	não ()
Mielite transversa	sim ()	não ()
• Rim	sim ()	não ()
• Hipertensão arterial	sim ()	não ()
• Tiroidite	sim ()	não ()
• Osteoporose	sim ()	não ()
• Outros.....	sim ()	não ()

C - MANIFESTAÇÕES LABORATORIAIS DO LES

• Renal	sim ()	não ()
Hematuria	sim ()	não ()
Leucocitúria	sim ()	não ()
Cilindrúria	sim ()	não ()
Proteinúria	sim ()	não ()
Insuficiência renal	sim ()	não ()
• Biópsia Classe histológica I () IIa () IIb () III () IV () V () OMS VI ()		
• Hematológico	sim ()	não ()
Anemia hemolítica	sim ()	não ()
Leucopenia	sim ()	não ()
Linfopenia	sim ()	não ()
Plaquetopenia	sim ()	não ()
Alterações de coagulação	sim ()	não ()
↓ C3, ↓ C4, ↓ CH50	sim ()	não ()
• Autoanticorpos	sim ()	não ()
FAN	sim ()	não ()
anti-DNA	sim ()	não ()
anti-Sm	sim ()	não ()
anti-RNP	sim ()	não ()
anti-Ro	sim ()	não ()
anti-La	sim ()	não ()

anti P	sim ()	não ()
anti Clp IgM	sim ()	não ()
anti Clp IgG	sim ()	não ()
anticoagulante lúpico	sim ()	não ()

D - ATIVIDADE, CURSO E GRAVIDADE

- SLEDAI à admissão ao estudo _____
- Curso do LES: policíclico-contínuo () remissivo ()
- Gravidade do LES: leve () moderado-grave ()

E - TRATAMENTO UTILIZADO

- corticosteróides (prednisona/deflazacort/metilprednisolona/hidrocortisona)
Sim () Não ()
dose atual: _____ dose total: _____ tempo de uso: _____
efeitos colaterais _____
- pulsoterapia com ciclofosfamida
Sim () Não ()
nº pulsos (dose/indução) _____
nº pulsos (dose/manutenção) _____
dose atual: _____ dose total: _____ tempo de uso: _____
indicação _____
efeitos colaterais _____
- metotrexate
Sim () Não ()
dose atual _____ dose semanal: _____ dose total: _____
via de administração (VO,IM,SC): _____ tempo de uso: _____
efeitos colaterais: _____
- azatioprina
Sim () Não ()
dose atual: _____ dose total: _____ tempo de uso: _____
efeitos colaterais: _____
- ciclosporina
Sim () Não ()
dose diária: _____ dose total: _____ tempo de uso: _____
efeitos colaterais: _____
- micofenolato mofetil
Sim () Não ()
dose diária: _____ dose total: _____ tempo de uso: _____
efeitos colaterais: _____

- cloroquina/ hidroxiclороquina

Sim () Não ()

dose diária: _____ dose total: _____ tempo de uso: _____

efeitos colaterais: _____

- outras drogas: _____

Sim () Não ()

dose diária: _____ dose total: _____ tempo de uso: _____

efeitos colaterais: _____

Exames na data do estudo

VHS _____ PCR _____ anti-DNA _____ anti-Sm _____

HB _____ Ht _____ Leuc. _____ Plaq. _____

Bt _____ Seg _____ Linf _____ Mo _____ Eo _____

Outros Exames _____

ANEXO E – Reagentes utilizados na pesquisa**SOLUÇÃO TAMPÃO FOSFATO SALINO (PBS) pH = 7,2**

Composição:

Fosfato mono ácido de sódio dodecahidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$)	2,60g
Fosfato ácido de sódio hidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	0,36g
Cloreto de sódio (NaCl)	8,17g
Água (H_2O)	1000 ml

SOLUÇÃO TAMPÃO FOSFATO SALINO-AZIDA (PBS-Azida) 0,1% pH=7,4

Composição:

Azida de sódio (NaN_3)	1,0g
PBS q.s.p.	1000 ml

SOLUÇÃO TAMPÃO FOSFATO SALINO-AZIDA- soro fetal bovino 2%

Composição:

Soro fetal bovino	0,1g
PBS-Azida	500 ml

PARAFORMALDEIDO 1% pH=7,4

Composição:

Paraformaldeido	10g
PBS	1000 ml

PARAFORMALDEIDO 4% pH=7,4**Composição:**

Paraformaldeido	40g
PBS	1000 ml

SOLUÇÃO TAMPÃO FOSFATO SALINO – TWEEN (PBS-Tween) 0,5%**Composição:**

Tween-20	5 ml
PBS q.s.p.	1000 ml

9. REFERÊNCIAS

Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Autotolerância e Auto-imunidade. In: *Imunologia Celular e Molecular*. 3rd ed. Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Revinter Ltda, 2000a. Cap. 19, p.415-431.

Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Processamento do antígeno e apresentação ao linfócito T. In: *Imunologia Celular e Molecular*. 3rd ed. Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Revinter Ltda, 2000b. Cap. 6, p.117-139.

Adams D. How the immune system works and why it causes autoimmune diseases. *Immunology Today* 1996;17(7):300-2.

Albert ML, Sauter B, Bhardwaj N. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I restricted CTL. *Nature* 1998;392:86.

Al-Maini MH, Mountz JD, Al-Mohri HA, El-Ageb EM, Al-Riyami BM, Stenson KLG, Zhou T, Richens ER. Serum levels of soluble Fas correlate with indices of organ damage in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2000;9:132-9.

Amasaki Y, Kobayashi S, Takeda T, Ogura N, Jodo S, Nakabayashi T, Tsutsumi A, Fujisaku A, Koike T. Up-regulated expression of Fas antigen (CD95) by peripheral naive and memory T cell subsets in patients with systemic lupus erythematosus (SLE): a possible mechanism for lymphopenia. *Clin Exp Immunol*. 1995;22(2):245-50.

Andrade F, Casciola-Rosen L, Rosen A. Apoptosis in Systemic Lupus Erythematosus. Clinical Implications. *Rheum Dis Clin of North Am*. 2000;26(2):215-27.

Andrade F, Casciola-Rosen L, Rosen A. Granzyme B- Induced cell death. *Acta Haematol*. 2004;111:28-43.

Anel A, Buferne M, Boyer C, Schmitt-Verhulst AM, Golstein P. T cell receptor-induced Fas ligand expression in cytotoxic T lymphocyte clones is blocked by protein tyrosine kinase inhibitors and cyclosporin A. *Eur J Immunol*. 1994;24:2469-76.

Anolik J, Sanz I. B cells in human and murine systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol*. 2004;16:505-12.

Antolin J, Amerigo MJ, Cantabrana A, Roces A, Jimenez P. Systemic Lupus Erythematosus: Clinical Manifestations and Immunological Parameters in 194 Patients. Subgroups Classification of SLE. *Clin. Rheumatol* 1995;14(6):678-85.

Antunes RNS. *Proteínas P-GP, Bcl-2 e Bax: Um Estudo nos linfócitos circulantes em portadores de Leucemia Linfóide Crônica*. [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2000.

Ara Glossary Committee. Dictionary of rheumatic disease. Vol 1: signs and symptoms. American Rheumatism Association, ed. New York, Contact Associates International Ltd. 1985:3-39.

Araujo MN, Silva NP, Andrade LE, et al. C2 deficiency in blood donors and lupus patients: Prevalence, clinical characteristics and HLA-associations in Brazilian population. *Lupus* 1997;6:462.

Aringer M, Wintersberger W, Steiner CW, Kiener H, Prestler E, Jaeger U, Smolen JS, Graninger WB. High levels of Bcl-2 protein in circulating T lymphocytes, but not B lymphocytes of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1994;10:1423-30.

Arnett FC. Genetic Aspects of Human Lupus. *Clin Immunol Immunopathol*. 1992;63(1):4-6.

Arnett FC. The Genetics of Human Lupus. In: Wallace DJ, Ham BH., ed. *Dubois Lupus Erythematosus*. 5th ed. Philadelphia Lea & Febinger; 1997. p.77-117.

Bacal NS, Faulhaber MHW. Introdução a citometria de fluxo. In: Aplicação prática em citometria de fluxo. São Paulo, Editora Atheneu, 2003a. Cap.1, p1-4.

Bacal NS, Faulhaber MHW. Aspectos analíticos. In: Aplicação prática em citometria de fluxo. São Paulo, Editora Atheneu, 2003b. Cap.2, p5-16.

Bacon PB, Gordon C, Salmon M. Update on systemic lupus erythematosus: autoantibodies and apoptosis. *Clinical Medicine* 2001;1(1):10-4.

Barron KS, Silveira ED, Gonzales J, Reveille JD. Clinical, serologic and immunogenetic studies in childhood-onset systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1993;36(3):348-54.

Bastos WA, Sacchetti SB. Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES). In: Oliveira SKF, Azevedo ECL. ed. *Reumatologia Pediátrica*. Tijuca, Rio de Janeiro, Editora Médica e Científica LTDA, 1991. p.89-204.

Batchelor JR. Systemic Lupus Erythematosus and genes within the HLA region. *Br J Rheumatol*. 1993;32(1):13-5.

Behrens L, Bender A, Johnson MA, Hohlfeid R. Cytotoxic mechanisms in inflammatory myopathies. Co-expression of Fas and protective Bcl-2 in muscle fibres and inflammatory cells. *Brain* 1997;120(Pt6):929-38.

Benz C, Witznitzer I, Lee SH. Flow cytometric analysis of fluorescein-conjugated estradiol (E-BSA-FITC) binding in breast cancer suspensions. *Cytometry* 1986;6:260-7.

Bermas BL, Petri M, Goldman D, Mittleman B, Miler MW, Stocks NI, Via CS, Shearer GM. T helper cell dysfunction in systemic lupus erythematosus (SLE): relation to disease activity. *J Clin Immunol*. 1994;14(3):169-77.

Bickerstaff MC, Botto M, Hutchinson WL, Hebert J, Tennent GA, Bybee A, Mitchell DA, Cook HT, Butler PJ, Walport MJ, Pepys MB. Serum amyloid P component controls chromatin degradation and prevents antinuclear autoimmunity. *Nat Med* 1999;5(6):694-7.

Bijl M, Horst G, Limburg PC, Kallenberg CG. Fas expression on peripheral blood lymphocytes in systemic lupus erythematosus (SLE): relation to lymphocyte activation and disease activity. *Lupus* 2001a;10(12):866-72.

Bijl M, Horst G, Limburg PC, Kallenberg CGM. Anti-CD3-induced and anti-Fas-induced apoptosis in systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol*. 2001b;123:127-32.

Bijl M, Horst G, Limburg PC, Kallenberg CGM. Expression of costimulatory molecules on peripheral blood lymphocytes of patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*. 2001c;60:523-6.

Bijl M, Dijstelbloem HM, Oost WW, Bootsma H, Derksen RHW, Atem J, Limburg PC, Kallenberg CGM. IgG subclass distribution of autoantibodies differs between renal and extra-renal relapses in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology* 2002;41(1):62-7.

Blakemore AIF, Tarlow JK, Cork MJ, Gordon C, Emery P, Gordon WD. Interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism as a disease severity factor in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1994;37(9):1380-85.

Blasini AM, Stekman IL, Gonzales F, Tositti ML, Rodriguez MA. T lymphocytes from patients with Systemic Lupus Erythematosus show increased response to interleukin-2 after costimulation with OKT3

monoclonal antibody and phorbol esters. *Clin Immunol Immunopathol.* 1994;70(1):66-72.

Boes M, Schmidt T, Likemann K, Beaudette BC, Marshak Rothstein A, Chen J. Accelerated development of IgG antibodies and autoimmune disease in the absence of secreted IgM. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97(3):1148-9.

Bohan A, Peter JB, Bowman RL, Pearson CN. A computer-assisted analysis of 153 patients with polymyositis and dermatomyositis. *Medicine* 1977;56:255.

Bohan A, Peter JB. Polymyositis and dermatomyositis (parts 1 and 2). *N Engl J Med.* 1975;292:344-7 and 403-7.

Bombardier C, Gladman DD, Urowitz MB, Karon D, Chang CH. COMMITTEE ON PROGNOSIS STUDIES IN SLE. Derivation of the SLEDAI. A Disease Activity Index for Lupus patients. *Arthritis Rheum.* 1992;35(6):630-40.

Botto M, Dell'Angola C, Bygrave AE, et al. Homozygous C1q deficiency causes glomerulonephritis associated with multiple apoptotic bodies. *Nat Genet.* 1998;19:56.

Botto M. Links between complement deficiency and apoptosis. *Arthritis Res.* 2001;3(4):207-10.

Brewer EJ Jr, Bass JC, Baum J, Cassidy JT, Fink C, Jacobs J, Hanson V, Levinson JE, Schaller J, Stillman JS. Current proposed revision of JRA Criteria. JRA Criteria Subcommittee of the Diagnostic and Therapeutic Criteria committee of the American rheumatism Section of the Arthritis Foudation. *Arthritis Rheum.* 1977;20(2 suppl):195-9.

Brewer EJ, Bass JC, Cassidy JT, et al. Criteria classification of juvenile rheumatoid arthritis. *Bull Rheum Dis.* 1972;23-9.

Brown R. The bcl-2 family of proteins. In: Wyllie A. ed. Apoptosis. British Medical Bulletin 1997;53(3):466-77.

Browness P, Davies KA, Norsworthy PJ, Athanassiou P, Taylor-Wiedeman J, Borysiewicz LK, Meyer PA, Walport MJ. Hereditary C1q deficiency and systemic lupus erythematosus. *QJM* 1994;87:455-64.

Cabral AR, Alarcón-Segovia D. Autoantibodies in systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol*. 1997;9:387-92.

Cascino I, Ballerini C, Audino S, Rombola G, Massacesi L, Colombo G, Scorza Smeraldi R, d'Alfonso S, Momigliano Richiardi P, Tosi R, Ruberti G. Fas gene polymorphism are not associated with systemic lupus erythematosus, multiple sclerosis and HIV infection. *Dis Markers* 1998;13:221-5.

Casciola-Rosen LA, Anhalt G, Rosen A. Autoantigens targeted in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic keratinocytes. *J Exp Med*. 1994;179:1317-30.

Casciola-Rosen LA, Rosen A, Petri M, Schlissel M. Surface blebs on apoptotic cells are sites of enhanced procoagulant activity: Implications for coagulation events and antigenic spread in systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:1624-29.

Cassidy JT, Petty RE. Systemic Lupus Erythematosus. In: Textbook of Pediatric Rheumatology. 4th ed. Philadelphia, Pennsylvania, W.B. Saunders Company, 2001. p.396-449.

Cassidy JT. Systemic Lupus Erythematosus, Juvenile Dermatomyositis, Scleroderma and Vasculitis. In: Kelley WN, Harris ED, Rudy S, Sledge CB. ed. Textbook of Rheumatology. 5th ed. Philadelphia, Pennsylvania, W. B. Saunders Company, 1997. cap.76, vol.2, p.1241-5.

Cassidy JT, Petty RE. Systemic Lupus Erythematosus. In: Textbook of Pediatric Rheumatology. 3rd ed. Philadelphia, Pennsylvania, W.B. Saunders Company, 1995. p.260-322.

Chan EY, Ko SC, Lau CS. Increased rate of apoptosis and decreased expression of bcl-2 protein in peripheral blood lymphocytes from patients with active systemic lupus erythematosus. *Asian Pac J Allergy Immunol.* 1997;15(1):3-7.

Cheng J, Zhou T, Lui C, et al. Protection from Fas mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. *Science* 1994;335:1759-62.

Clarke PGH. Historic apoptosis. *Nature* 1995;378:230.

Cleland LG, Bell DA. The occurrence of systemic lupus erythematosus in two kindreds in association with selective IgA deficiency. *J Rheumatol.* 1978;5(3):288-93.

Cline MJ. Histiocytes and histiocytosis. *Blood* 1994;84:2840-53.

Courtney PA, Crockard AD, Williamson K, Irvine AE, Kennedy RJ, Bell AL. Increased apoptotic peripheral blood neutrophils in systemic lupus erythematosus: relations with disease activity, antibodies to double stranded DNA and neutropenia. *Ann Rheum Dis.* 1999a;58:309-14.

Courtney PA, Crockard AD, Williamson K, McConnell J, Kennedy RJ, Bell AL. Lymphocyte apoptosis in systemic lupus erythematosus: relationships with Fas expression, serum soluble Fas and disease activity. *Lupus* 1999b;8:508-13.

Crow MK. Costimulatory molecules and T-cell-B-cell interactions. *Rheum Dis Clin N Am.* 2004;30:175-91.

Davies EJ, Hillarby MC, Cooper RG, Hay EM, Green JR, Shah S, Bernstein RM, Holt PJL, Grennan DM. HLA-DQ, DR and complement C4 variants in systemic lupus erythematosus. *B. J Rheumatol.* 1993;32:870-5.

Davies EJ, Hutchings CJ, Hillarby MC, Donn RP, Cooper RG, Hay EM, Bernstein RM, Holt PJL, Grennan DM, Ollier WER. HLA-DP does not contribute towards susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis.* 1994;53(3):188-90.

Davies EJ, Snowden N, Hillarby MC, Carthy D, Grennam DM, Thomson W, Olliver WE. Mannose binding protein gene polymorphism in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1995a;38:110-4.

Davies EJ, Steers G, Ollier WER, Grennam DM, Cooper RG, Hay EM, Hillarby MC. Relative contributions of HLA-DQA and complement C4A loci in determining susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Br J Rheumatol.* 1995b;34:221-5.

Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* 1997;388:300-4.

Digiuseppe JA, Lebeu P, Augenbraun J, Borowitz J. Multiparameter flow-cytometric analysis of Bcl-2 and Fas expression in normal and neoplastic hematopoiesis. *Hematopathology* 1996;106:345-51.

Doherty DG, Ireland R, Demaine AG, Wang F, Veerapan K, Welsh KI, Vergani D. Major Histocompatibility Complex Genes and susceptibility to Systemic Lupus Erythematosus in southern Chinese. *Arthritis Rheum.* 1992;35(6):641-6.

Drappa J, Vaishnaw AK, Sullivan KE, Chu JL, Elkon KB. Fas gene mutations in the Canele-Smith Syndrome, an inherited lymphoproliferative disorder associated with autoimmunity. *N Engl J Med*. 1996;335:1643-9.

Emlen W, Niebur J, Kadera R. Accelerated in vitro apoptosis of lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol*. 1994;152:3685-92.

Falcini F, Azzari C, Gelli VAMG, Luchetti M, Gabrielli A, Calzolari A, Pignone A, Generini S, Matucci Cerinic C. Reduction of bcl-2 in T cells during immunosuppressive therapy in patients with severe juvenile onset Systemic Lupus Erythematosus. *Clin Immunol*. 1999;93(1):59-64.

Falcini F, Calzolari A, Generini S, Pignone A, Simonini G, Zulian F, Matucci-Cerinic M. Bcl-2, p53 and c-myc expression in juvenile dermatomyositis. *Clin Exp Rheumatol*. 2000;18(5):643-6.

Fauci AS, Steinberg AD, Haynes BF, Walen G. Immunoregulatory aberrations in Systemic Lupus Erythematosus. *J Immunol*. 1978;121(4):1473-9.

Ferguson TA, Stuart PM, Hendon JM, Griffith TS. Apoptosis, tolerance and regulatory T cells - old wine, new wineskins. *Immunological Reviews* 2003;193:111-23.

Fernandes SRM, Persoli LB, Marques SBD, Costallat LTL. HLA antigens and susceptibility to systemic lupus erythematosus in Brazilian patients. *Lupus* 1995;4:43S.

Festjens N, Gurp MV, Loo GV, Saelens X, Vandenabeele P. Bcl-2 family members as sentinels of cellular integrity and role of mitochondrial intermembrane space protein in apoptotic cell death. *Acta Haematol*. 2004;111:7-27.

Fielder AHL, Walport MJ, Batchelor JR, Rynes RI, Black CM, Dodi IA, Hughes GRV. Family study of the MHC in patients with SLE: importance of null alleles of C4A e C4B in determing disease susceptibility. *Br Med J*. 1983;286:425-8.

Fong KY, Howe HS, Tim SK, Boey ML, Feng PH. Polymorphism of the regulatory region of tumor necrosis factor alpha gene in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Acad Med Singapore* 1996;25:90-3.

Gaffney PM, Moser KL, Graham RR, Behrens TW. Recent advances in the genetics of Systemic Lupus Erythematosus. *Rheum Dis Clin of North Am*. 2002;28(1):111-26.

Gaffney PM, Ortman WA, Selby SA, Shark KB, Ockenden TC, Rohlf KE, Walgrave NL, Boyum WP, Malmgren ML, Miller ME, Kearns GM, Messner RP, King RA, Rich SS, Behrens TW. Gemone screening in human systemic lupus erythematosus: results from a second Minesota cohort and combined analyses of 187 sib-pair families. *Am J Hum Genet*. 2000;66:547-56.

Garicochea B, Zago MA. Bases moleculares e citogenéticas. Oncogenes e antioncogenes. In: Zago MA, Falcão RP, Pasquini R. ed. Hematologia - Fundamentos e Prática, 1ª ed., São Paulo, Atheneu, 2001, p.367-81.

Gatenby P, Irvini M. The Bcl-2 proto-oncogene is overexpressed in systemic lupus erythematosus. *J Autoimmun*. 1994;7:623-31.

Georgescu I, Vakkalanka K, Elkon K, Crow MK. Interleukin-10 promotes activation-induced cell death of SLE lymphocytes mediated by Fas ligand. *J Clin Invest*. 1997;100:2622-33.

Gershov D, Kim S, Brot N, Elkon KB. C-reactive protein binds to apoptotic cells, protects the cells from assembly of terminal complement components, and sustains an antiinflammatory innate response: implications for systemic autoimmunity. *J Exp Med*. 2000;92:1353-64.

Geske FJ, Gerschenson LE. The Biology of Apoptosis. *Hum Pathol*. 2001;32:1029-38.

Gewruz H, Roberts JL, Zeitz H. Homozygotic deficiency of C2 with fulminante SLE. *Arthritis Rheum*. 1978;21(1):28-36.

Glücksman A. Cell deaths in normal vertebrate ontogeny. *Biol Rev*. 1951;26:59-86.

Golan TD, Elkon KB, Gharavi AE, Krueger JG. Enhanced membrane binding of autoantibodies to cultured keratinocytes of systemic lupus erythematosus patients after ultraviolet B / ultraviolet A irradiation. *J Clin Invest*. 1992;90:1067-76.

Goldstein R, Sengar DPS. Comparative studies of the major histocompatibility complex in French Canadian and non-French Canadian Caucasians with Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1993;36(8):1121-7.

Graninger WB. Transcriptional overexpression of the proto-oncogene bcl-2 in patients with systemic lupus erythematosus. *Wien Klin Wochenscher* 1992;104:205-7.

Gratama JW, D'hautcourt JC, Mandy F, Rothe G, Barnett D, Janossy G, Papa S, Schimitz G, Lenker R. Flow cytometric quantification of immunofluorescence intensity: Problems and perspectives. *Cytometry* 1998;33:166-78.

Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis: a review. *Science* 1998;218:1309-12.

Green DR. Overview: apoptotic signaling pathways in the immune system. *Immunological Reviews* 2003;193:5-9.

Guo SW, Lange K. Genetic mapping of complex traits: promises, problems, and prospects. *Theor Popul Biol.* 2000;57:1-11.

Hahn BH. An Overview of the Pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus. In: Wallace DJ, Ham BH. ed. Dubois Lupus Erythematosus. 5th ed. Philadelphia Lea & Febinger, 1997a, p.69-75.

Hahn BH. Pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus. In: Kelley WN, Harris ED, Rudy S, Sledge CB. ed. Textbook of Rheumatology. 5th ed. Philadelphia, Pennsylvania, W. B. Saunders Company, 1997b, cap.76, vol.2, p.1015-27.

Harley JB, Moser KL, Gaffney PM, Behrens TW. The genetics of human systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Immunol.* 1998;10:690-6.

Hartung K, Baur MP, Coldewey R, Fricke M, Kalden JR, Lakomek HJ, Peter HH, Schendel D, Schneider PM, Seuchter SA, Stangel W, Deicher HRG. Major Histocompatibility Complex Haplotypes and Complement C4 Alleles in Systemic Lupus Erythematosus. Results of a multicenter study. *J Clin Invest.* 1992;90(4):1346-51.

Hashimoto H, Nishimura Y, Dong RP, Kimura A, Sasazuki T, Yamanaka K, Tokano Y, Murashima A, Kabasawa K, Hirose S. HLA antigens in Japanese patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Scand J Rheumatol.* 1994;23(4):191-6.

Hayata ALS. Diminuição da apoptose passiva e do receptor co-estimulatório CD28 nas células mononucleares do sangue periférico de pacientes com febre reumática. [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2004.

Herrmann M, Voll RE, Zoller OM, Hagenhofer M, Ponner BB, Kalden JR. Impaired phagocytosis of apoptotic cell material by monocyte-derived macrophages from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1998;41:1241-50.

Ho CY, Wong CK, Li EK, Lam WK. Effects of dexamethasone on expression of Fas molecules and apoptosis of lymphocytes in patients with systemic lupus erythematosus. *Immunol Invest.* 2001;30(3):231-43.

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

Hockenbery DM, Nuñez G, Millman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 1990;348:334-6.

Hockenbery DM, Zutter M, Hickey W, Nahm M, Korsmeyer SJ. Bcl-2 protein in topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:696-965.

Hockenbery DM, Oltvai ZN, Yin XM, Millman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 1993;75:241-51.

Hockenbery DM. Bcl-2, a novel regulator of cell death. *Bioessays* 1995;17:631-8.

Hong GH, Kim HY, Takeuchi F, Nakano K, Yamada H, Matsuta K, Han H, Tokunaga K, Ito K, Park KS. Association of complement C4 and HLA-DR alleles with Systemic Lupus Erythematosus in Koreans. *J Rheumatol*. 1994;21(3):442-7.

Hong NM, Masuko-Hongo K, Sasakawa H, Kato T, Shirai T, Okumura K, Nishioka K, Kobata T. Amelioration of lymphoid hyperplasia and hypergammaglobulinemia in lupus-prone mice (gld) by Fas-ligand gene transfer. *J Autoimmun*. 1998;11:301-7.

Huang QR, Morris D, Manolios N. Evaluation of the Bcl-2 gene locus as a susceptibility locus linked to the clinical expression of systemic lupus erythematosus (SLE). *Rheumatol Int*. 1996;16(3):121-4.

Huck S, Deveaud E, Namane A, Zouali M. Abnormal DNA methylation and deoxycytosine-deoxyguanine content in nucleosomes from lymphocytes undergoing apoptosis. *FASEB J*. 1999;13:1415-22.

Hughes J, Savill JS. Apoptosis in glomerulonephritis. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2005;14:389-95.

Illei GG, Tackey E, Lapteva L, Lipsky PE. Biomarkers in Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis rheum*. 2004;50:2048-65.

Itoh N, Tsujimoto Y, Nagata S. Effect of bcl-2 on Fas antigen-mediated cell death. *J Immunol*. 1993;151:621-7.

Ivanovska I, Galonek HL, Hildeman DA, Hardwick JM. Regulation of cell death in the lymphoid system by Bcl-2 family proteins. *Acta Haematol*. 2004;111:42-55.

Janeway Jr CA, Travers P, Walport M, Schomchik MJ. Autoimmunity and transplantation. In *Immunobiology: the immune system in health and disease*. 6th ed. New York and London, Garland Science, 2005a. p557-612.

Janeway Jr CA, Travers P, Walport M, Schomchik MJ. Manipulation of the Immune Response. In *Immunobiology: the immune system in health and disease*. 6th ed. New York and London, Garland Science, 2005b. p613-62.

Jodo S, Kobayashi S, Kayagaki N, Ogura N, Feng Y, Amasaki Y, Fujisaku A, Azuma M, Yagita H, Okumura K, Koike T. Serum levels of soluble Fas/APO-1 (CD95) and its molecular structure in patients with systemic lupus erythematosus (SLE) and other autoimmune diseases. *Clin Exp Immunol*. 1997;107:89-95.

Ju ST, Panka DJ, Cui HER, El-Khatib M, Sher DH, Stanger BZ, Marshak-Rothstein A. Fas (CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation. *Nature* 1995;373:444-8.

Kamradt T, Mitchinson NA. Advances in immunology: Tolerance and Autoimmunity. *N Engl J Med*. 2001;344(9):655-64.

Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26:239-57.

Kim SJ, Gershov D, Ma X, Brot N, Elkon NB. I-PLA(2) activation during apoptosis promotes the exposure of membrane lysophosphatidylcholine leading to binding by natural immunoglobulin M antibodies and complement activation. *J Exp Med* 2002;196(5):655-65.

Kojima T, Horiuchi T, Nishizaka H, Sawabe T, Higuchi M, Harashima SI, Yoshizawa S, Tsukamoto H, Nagasawa K, Niho Y. Analysis of Fas ligand gene mutation in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2000;42(1):135-9.

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;158:4525-28.

Korganow AS, Ji H, Mangialiaio S, Duchatelle V, Pelanda R, Martin T, Degott C, Kikutani H, Rajewsky K, Pasquali JL, Benoist C. From systemic T cell self reactivity to organ-specific autoimmune disease via immunoglobulins. *Immunity* 1999;10:451-61.

Kotzin BL. Systemic Lupus Erythematosus. *Cell* 1996;85:303-6.

Koutouzov S, Jeronimo AL, Campos H, Amoura Z. Nucleosomes in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Rheum Dis Clin N Am.* 2004;30:529-58.

Kovacs B, Liossis SNC, Dennis GJ, Tsokos GC. Increased expression of functional Fas-ligand in activated T cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity* 1997;25:213-21.

Krueger A, Fas SC, Baumann S, Krammer PH. The role of CD95 in the regulation of peripheral T-cell apoptosis. *Immunological Reviews* 2003;193:58-69.

Landowshi HT, Gleason-Guzman MC, Dalton WS. Selection for drugs resistance results in resistance to Fas-mediated apoptosis. *Blood* 1997;89:1854-61.

Lehman TJA. Systemic Lupus Erythematosus in Childhood and Adolescence. In: Wallace DJ, Ham BH. ed. Dubois Lupus Erythematosus. 5th ed. Philadelphia Lea & Febinger, 1997, p.851-70

Li XC, Wells AD, Strom TB, Turka LA. The role of T cell apoptosis in transplantation tolerance. *Curr Opin Immunol.* 2000;12:522-7.

Lichter P, Walczak H, Witz S, Berhmann I, Krammer PH. The human APO-1 antigen maps to 10q23, a region which is sythenic with mouse chromossome 19. *Genomics* 1992;14:179-80.

Lindqvist AK, Alarcon-Riquelme ME. The genetics of systemic lupus erythematosus. *Scand J Immunol.* 1999;50:562-71.

Linker-Israeli M, Wallace DJ, Michael D, et al. Novel alleles of the IL-6 gene minisatelite are associated with systemic lupus erythematosus (SLE) and with differentiation IL-6 expression. *Arthritis Rheum.* 1998;41:1499.

Liphaus BL. *Estudo dos antígenos de histocompatibilidade leucocitária de classe II-DR (HLA de classe II-DR) em crianças Brasileiras com Lúpus Eritematoso Sistêmico.* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 1998.

Liphaus BL, Goldeberg AC, Kiss MHB, Silva CAA. Analysis of human leukocyte antigens of class II-DR in Brazilian children and adolescents with Systemic Lupus Erytematosus. *Rev Hosp Clin Fac Med S Paulo* 2002;57(6):277-82.

Liu H, Pope RM. Phagocytes: mechanisms of inflammation and tissue destruction. *Rheum Dis Clin N Am.* 2004;30:19-39.

Liu ST, Wang CR, Yin SD, Liu MF, Lea GL, Chen MY, Chung CY, Chen CY. Hydroxycloquine sulphate inhibits in vitro apoptosis of circulating lymphocytes in patients with systemic lupus eruthematosus. *Asian Pac J Allergy Immunol.* 2001;19(1):29-35.

Llorente L, Garcia-Padilla C, Richaud-Patin Y, et al. Treatment of systemic lupus erythematosus with an interleukin-10 nonoclonal antibody. *Arthritis Rheum.* 1998;40(suppl.):462.

Llorente L, Richaud-Patin Y, Coudere J, et al. Dysregulation of interleukin-10 production in relatives of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1997;40 (suppl.):429.

Lorenz HM, Grunke M, Hieronymus T, Herrman M, Kuhnel A, Manger B, Kalden JR. In vitro apoptosis and expression of apoptosis related molecules in lymphocytes from patients with Systemic Lupus Erythematosus and other autoimmune diseases. *Arthritis Rheum.* 1997;40(2):306-17.

Madaio MP, Fabbi M, Tsio M, Daga A, Puccetti A. Spontaneously produced anti-DNA / Dnase I autoantibodies modulate nuclear apoptosis in living cells. *Eur J Immunol.* 1996;26:3035-41.

Manfredi AA, Rovere P, Galati G, Heltai S, Bozzolo E, Soldini L, Davoust J, Balestrieri G, Tincani A, Sabbadini MG. Apoptotic cell clearance in systemic lupus erythematosus. I. Opsonization by antiphospholipid antibodies. *Arthritis Rheum.* 1998a;41:205-14.

Manfredi AA, Rovere P, Heltai S, Galati G, Nebbia G, Tincani A, Balestrieri G, Sabbadini MG. Apoptotic cell clearance in systemic lupus erythematosus. II. Role of β 2-glycoprotein I. *Arthritis Rheum.* 1998b;41:215-23.

Marti GE, Steler-Stevenson M, Bleesing JJH, Fleisher TA. Introduction to Flow Cytometry. *Sem Hematol.* 2001;38(2):93-9.

Martin SJ, Reutelingsperger CPM, McGahon AJ, Rader JA, Van Schic CAA, Laface D, Green DR. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and ABL. *J Exp Med.* 1995;182:1545-56.

Mehmet H, Edwards AD. Hypoxia, ischemia, and apoptosis. *Arch Dis Child.* 1996;75:73-5.

Mehrian R, Quismorio Jr FP, Strassmann G, Stimmler MM, Horwitz DA, Kitridou RC, Gauderman WJ, Morrison J, Brautbar C, Jacob CO. Synergistic effect between IL-10 and Bcl-2 genotypes in determining susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1998;41(4):596-602.

Mevorach D, Mascarehans JO, Gershov D, Elkon KB. Complement-dependent clearance of apoptotic cells by human macrophages. *J Exp Med.* 1998;188:2313-20.

Mevorach D. Systemic Lupus Erythematosus and Apoptosis. A question of Balance. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2003;25:49-59.

Miret C, Font J, Molina R, Garcia-Carrasco M, Filella X, Ramos M, Cervera R, Ballesta A, Ingelmo M. Bcl-2 oncogene (B cell lymphoma/leukemia-2) levels correlate with systemic lupus erythematosus disease activity. *Anticancer Res.* 1999;19(4B):3073-6.

Miret C, Font J, Molina R, Garcia-Carrasco M, Filella X, Ramos M, Cervera R, Ballesta A, Ingelmo M. Relationship of oncogenes (sFas, Bcl-2) and cytokines (IL-10, alfa-TNF) with the activity of systemic lupus erythematosus. *Anticancer Res.* 2001;21(4B):3053-9.

Miyashita T, Reed JC. Bcl-2 gene transfer increases relative resistance of S49.1 and WEH17.2 lymphoid cells death and DNA fragmentation induced by glucocorticoids and multiple chemotherapeutic drugs. *Cancer Res.* 1992;52:5407-11.

Miyashita T, Reed JC. Bcl-2 oncoprotein blocks chemotherapy-induced apoptosis in a human leukemia cell line. *Blood* 1993;81:151-7.

Mills JA. Systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med.* 1994;330:1871-9.

Mukai M, Bohgaki T, Notoya A, Kohmo M, Tateno M, Kobayashi S. Liver dysfunction due to apoptosis in a patient with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2000;9:74-7.

Murakami M, Kumagai S, Sugita M, Iwai K, Imura H. In vitro induction of IgG anti-DNA antibody from high density B cells of Systemic Lupus Erythematosus patients by a HLA DR-restricted T cell clone. *Clin Exp Immunol*. 1992;90:245-50.

Nagata S, Goldstein P. The Fas death factor. *Science* 1995;267:1449-56.

Nakamura N, Ban T, Yamaji K, Moneda Y, Wada Y. Localization of apoptosis-inducing activity of lupus anticoagulant in an annexin V-binding antibody subset. *J Clin Invest*. 1998;101:1951-9.

Nicholson DW. From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. *Nature* 2000;407:810-6.

Nuñez G, London L, Hockenbery D, Alexander M, Mckearn JP, Korsmeyer SJ. Deregulated Bcl-2 gene expression selectively prolongs survival of growth factor-deprived hematopoietic cell lines. *J Immunol*. 1990;144:3602-10.

Nuñez G, Hockenbery D, Mcdonell TJ, Sorensen CM, Korsmeyer SJ. Bcl-2 maintains B cell memory. *Nature* 1991;353:71-3.

Nuñez G, Merino R, Grillot D, González-García M. Bcl-2 and Bcl-x: regulatory switches for lymphoid death and survival. *Immunol Today* 1994;15:582-8.

Ohsako S, Hara M, Harigai M, Fukasawa C, Kashiwagaki S. Expression and function of fas antigen and Bcl-2 in human Systemic Lupus Erythematosus lymphocytes. *Clin Immunol Immunopathol*. 1994;73(1):109-14.

Okuda EM. *Avaliação de um índice de atividade (SLEDAI) em 104 crianças com lúpus eritematoso sistêmico*. [Dissertação] São Paulo: Faculdade de Ciências Médicas Santa Casa de São Paulo; 1995.

Papo T, Parizot C, Ortova M, Piette JC, Frances C, Debre P, Godran P, Gorochoy G. Apoptosis and expression of soluble Fas mRNA in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 1998;7:455-61.

Passos LF. Apoptosis and LES: another piece in the puzzle? *Br J Rheumatol*. 1999;37:327-34.

Passos LF. Great expectations: SLE and Human Genome Project. *Br J Rheumatol*. 2000;40(6):291-304.

Pereira J. *Estudo de células precursoras em leucemias agudas: identificação e fator de prognóstico das proteínas Bcl-2, Bax e CD95/Fas/APO-1*. [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2000.

Petty RE, Southwood TR, Manners P, Baum J, Glass DN, Goldenberg J, He X, Maldonado-Cocco J, Orozco-Alcala J, Prieur AM, Suarez-Almazor ME, Woo P. International League of Associations for Rheumatology classification of juvenile idiopathic arthritis: second revision, Edmonton, 2001. *J Rheumatol*. 2004;31:390-2.

Pickering MC, Botto M, Taylor PR, Walport MJ. Systemic Lupus Erythematosus, complement deficiency, and apoptosis. *Adv Immunol*. 2000;76:227-34.

Pickering MC, Fischer S, Lewis MR, Walport MJ, Botto M, Cook HT. Ultraviolet-Radiation-Induced Keratinocyte Apoptosis in C1q-deficient mice. *J Invest Dermatol*. 2001;117:52-8.

Plana M, Font J, Vinas O, Martorell J, Ingelmo M, Vives J. Responsiveness of T lymphocytes from Systemic Lupus Erythematosus to signals provided through CD26 antigen. *Clin Immunol Immunopathol*. 1994;72(2):227-32.

Poncelet P, Carayon P. Cytofluorometric quantification off cell-surface antigens by indirect immunofluorescence using monoclonal antibodies. *J Immunol Methods* 1985;85:65-74.

Prodeus AP, Goerg S, Shen LM, Pozdnyakova OO, Chu L, Alicot EM, Goodnow CC, Carroll MC. A critical role for complement in maintenance of self-tolerance. *Immunity* 1998;9:721-31.

Rascu A, Repp R, Westerdaal NA, Kalden JT, van de Winkel JG. Clinical relevance of Fc gamma receptor polymorphisms. *Ann N Y Acad Sci*. 1997;815:282-95.

Reed JC, Tsujimoto Y, Alpers JD, Croce CM, Nowell PC. Regulation of Bcl-2 proto-oncogene expression during normal human lymphocyte proliferation. *Science* 1987;236:1295-9.

Reed JC. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol*. 1994;124:1-6.

Reed JC. Bcl-2 family proteins: Regulators of apoptosis and chemoresistance in hematologic malignancies. *Semin Hematol*. 1997;34:9-19.

Ren Y, Savill J. Apoptosis: The importance of being eaten. *Cell Death Differentiation* 1998;5:563.

Reveille JD, Anderson KL, Schrohenloher RE, Acton RT, Borges BD. Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of HLA-DR, DQ, DP and C4 Alleles in Caucasians with Systemic Lupus Erythematosus. *J Rheumatol*. 1991a;18:14-8.

Reveille JD, Barger BO, Hodge TW. HLA-DR2-DRB1 allele frequencies in DR2-positive black Americans with and without systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens* 1991b; 38(4):178-80.

Rieax-Laucat F, Le Deist F, Hivroz C, Roberts IAG, Debatin KM, Fischer A, De Villartay JP. Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science* 1995;268:1347-9.

Roberti MRF. *Expressão da proteína Bcl-2 em sangue periférico de portadores de leucemia linfóide crônica*. [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 1998.

Rose LM, Latchman DS, Isenberg DA. Bcl-2 and Fas, molecules which influence apoptosis. A possible role in systemic lupus erythematosus ? *Autoimmunity* 1994;17(4):271-8.

Rose LM, Latchman DS, Isenberg DA. Bcl-2 expression is unaltered in unfractionated peripheral blood mononuclear cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Br J Rheumatol*. 1995;34(4):316-20.

Rose LM, Latchman DS, Isenberg DA. Apoptosis in peripheral lymphocytes in systemic lupus erythematosus: A review. *Br J Rheumatol*. 1997;36:158-63.

Rosen A, Casciola-Rosen L. Autoantigens as substrates for apoptotic proteases: Implications for the pathogenesis of systemic autoimmune disease. *Cell Death Differentiation* 1999;6:6.

Rosner B. Fundamentals of biostatistics. 5th ed. Duxburg, California, Thomsom Learning, 2000.

Rudwaleit M, Gibson K, Wordsworth P, Pile K, Oh V. HLA associations of systemic lupus erythematosus in Chinese from Singapore. *Ann Rheum Dis*. 1995a;54(8):686-7.

Rudwaleit M, Tikly M, Gibson K, Pile K, Wordsworth P. HLA class II antigens associated with systemic lupus erythematosus in black South Africans. *Ann Rheum Dis*. 1995b;54:678-80.

Sacchetti SB. *Lúpus eritematoso sistêmico na infância: estudo clínico-laboratorial e histopatológico de 40 casos*. [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 1991.

Salvesen GS, Dixit VM. Caspases: Intracellular signaling by proteolysis. *Cell* 1997;91:443-6.

Santiago-Schwarz F. Dendritic cells: friend or foe in autoimmunity ? *Rheum Dis Clin N Am*. 2004;30:115-34.

Savill J, Fadok VA, Henson PM, Haslett C. Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunol Today* 1993;14:131-36.

Savill J. Recognition and phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Br Med Bull*. 1997;53:491-508.

Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM, Krammer PH, Peter ME. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J*. 1998;17:1675-87.

Schmitz L, Favara BE. Nosology and pathology of Langerhans cell histiocytosis. *Hematol Oncol Clin North Am*. 1998;12:221-46.

Schuller D, Szende B, Borsi JD, Marton T, Bocsi J, Magyarossy E, Koos R, Csoha M. Apoptosis as a possible way of destruction of lymphoblasts after glucocorticoid treatment of children with acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Hematol Oncol*. 1994;11:641-9.

Schur PH. Genetics of systemic lupus erythematosus. *Lupus* 1995;4:425-37.

Seery JP, Carroll JM, Cattell V, Watt FM. Antinuclear autoantibodies and lupus nephritis in transgenic mice expressing interferon gamma in the epidermis. *J Exp Med*. 1997;186:1451-9.

Seery JP, Cattell V, Watt FM. Cutting edge: amelioration of kidney disease in a transgenic model of lupus nephritis by administration of caspase inhibitors carbobenoxyl-valyl-alanyl-aspartyl-(beta-o-methyl)-fluoromethyl. *J Immunol*. 2001;167(5):2452-5.

Seki M, Ushiyama C, Seta N, Abe K, Fukazawa T, Asakawa J, Takasaki Y, Hashimoto H. Apoptosis of lymphocytes induced by glucocorticoids and relationship to therapeutic efficacy in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1998;41:823-30.

Shai R, Quismorio Jr FP, Li L, et al. Genome-wide screen for systemic lupus erythematosus susceptibility genes in multiplex families. *Hum Mol Genet*. 1999;8:639-44.

Shoenfield Y, Alarcon-Segovia D, Buskila D, Abu-Shakra M, Sorber M, Sella Y, Berden J, Moroni PL, Valesini G, Koike T, Alarcón-Riquelme ME. Frontiers of SLE: review of the 5th International Congress on Systemic Lupus Erythematosus, Cancun, Mexico, April 20-25, 1998. *Semin Arthritis Rheum*. 1999;29:112-30.

Silva CHM. Lúpus Eritematoso Sistêmico. In Marcondes E. ed. *Pediatria Básica*. 8° ed. São Paulo, Savier, 1991. vol.1, p.797-801.

Silva CHM, Campos LMNA, Liphaut BL. Lúpus Eritematoso Sistêmico. In Marcondes E. ed. *Pediatria Básica*. 9° ed. São Paulo, Savier, 2003. vol. 2, p.811-15.

Sioud M, Mellbye O, Forre O. Analysis of the NF-Kappa B p65 subunit, Fas antigen, Fas ligand and Bcl-2 related proteins in the synovium of RA and polyarticular JRA. *Clin Exp Rheumatol*. 1998;16(2):125-34.

Simón JA, Cabiedes J, Ortiz E, Alcoer-Varela J, Sánchez-guerrero J. Anti-nucleosome antibodies in patients with systemic lupus erythematosus of recent onset. Potential utility as a diagnostic tool and disease activity marker. *Rheumatology* 2004;43:220-4.

Smolen JS, Chused TM, Leiserson WM, Reeves JP, Alling D, Steinberg AD. Heterogeneity of Immunoregulatory T-cell Subsets in Systemic Lupus Erythematosus. Correlation with Clinical Features. *Am J Med*. 1982;72:783-90.

Smolewska E, Brozik H, Smolewski P, Biernacka-Zielinska M, Darzynkiewicz Z, Stanczyk J. Apoptosis of peripheral blood lymphocytes in patients with juvenile idiopathic arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2003;62(8):761-3.

Staunton NJ, Gaffney EF. Apoptosis: basic concepts and potential significance in human cancer. *Arch Pathol Lab Med*. 1998;122:310-9.

Strasser A, Whittingham S, Vaux DL, Bath ML, Adams JM, Cory S, Harris AW. Enforced Bcl-2 expression in B lymphoid cells prolongs antibody responses and elicits autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:8661-65.

Suda T, Takahashi T, Golstein P, Nagata S. Molecular cloning and expression of the Fas ligand: a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 1993;75:1169-78.

Sugiura T, Murakawa Y, Nagai A, Kondo M, Kobayashi S. Fas and Fas ligand interaction induces apoptosis in inflammatory myopathies: CD4+ T cells cause muscle cell injury directly in polymyositis. *Arthritis Rheum.* 1999;42(2):291-8.

Sullivan KE, Wooten C, Schmeckpeper B, Goldman D, Petri MA. A promoter polymorphism of tumor necrosis alpha is associated with systemic lupus erythematosus in African Americans. *Arthritis Rheum.* 1997;40:2207-11.

Sullivan KE. Genetics of Systemic Lupus Erythematosus. Clinical implications. *Rheum Dis Clin of North Am.* 2000;26(2):229-56.

Suzuki N, Sakame T. Abnormal Fas and Fas ligand expression of lymphocytes in patients with SLE. *Nippon Rinsho* 1996;54(7):1955-9.

Szodoray P, Jellestad S, Nakken B, Brun JG, Jonsson R. Programed cell death in Rheumatoid Arthritis peripheral blood T-cell subpopulations determined by laser scanning cytometry. *Lab Invest.* 2003;83(12):1839-48.

Takemura T, Murakami K, Miyazato H, Yagi k, Yoshioka K. Expression of Fas antigen and Bcl-2 in human glomerulonephritis. *Kidney Int.* 1995;48(6):1886-92.

Tan EM, Cohen AS, Frils JF, Masi AT, Mcshane D, Rothifield NF, Scholler J, Tatal N, Winchester R. The 1982 revised criteria for the classification of SLE. *Arthritis Rheum.* 1982;25:1271-7.

Tanaka S, Saito K, Reed JC. Structure-function analysis of Bcl-2 oncoprotein. *J Biol Chem*. 1993;268:10920-6.

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;192:359-66.

Tang S, Lui SL, Lai KN. Pathogenesis of lupus nephritis: An update. *Nephrology* 2005;10:174-9.

Tiede I, Fritz G, Strand S, Poppe D, Dvorsky R, Strand D, Lehr HA, Wirtz S, Becker C, Atreya R, Mudter J, Hildner L, Bartsch B, Holtmann M, Blumberg R, Walczak H, Iven H, Galle PR, Ahmadian MR, Neurath MF. CD28-dependent Rac 1 activation is the molecular target of azathioprine in primary human CD4+ T lymphocytes. *J Clin Invest*. 2003;111:1133-45.

Tinaztepe K, Ozen S, Gucer S, Ozdamar S. Apoptosis in renal disease: a brief review of the literature and report of preliminary findings in children lupus nephritis. *Turk J Pediatr*. 2001;43(2):133-8.

Tsao BP, Cantor RM, Kalunian KC, Chen CJ, Badsha H, Singh R, Wallace DJ, Kitridou RC, Chen SL, Shen N, Song YW, Isenberg DA, Yu CL, Hahn BH, Rotter JL. Evidence for linkage of a candidate chromosome 1 region to human systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest*. 1997a;99:725-31.

Tsao BP, Cantor RM, Badsha H, et al. A susceptibility gene for SLE maps to a 5cM region of chromosome 1q. *Arthritis Rheum*. 1997b;40(suppl.):S315.

Tsao BP. Lupus susceptibility genes on human chromosome 1. *Int Rev Immunol*. 2000;19:319-34.

Tsao BP. Update on human systemic lupus erythematosus genetics. *Curr Opin Rheumatol*. 2004;16:513-21.

Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E, Croce CM. Involvement of the Bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* 1985;4706:1440-3.

Tsujimoto Y, Croce CM. Analysis of the structure, transcripts, and protein products of Bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:5214-18.

Vaux DL, Korsmeyer SJ. Cell death in development. *Cell* 1999;96:245-54.

Verhoven B, Schilegel RA, Williamson P. Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T lymphocytes. *J Exp Med*. 1995;182:1567-1601.

Voll RE, Herrmann M, Roth EA, Stach C, Kalden JR. Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature* 1997;390:350-1.

Walport MJ. Complement. Second of two parts. *N Engl J Med*. 2001;344(15):1140-4.

Wang Y, Hu O, Madre JA. Amelioration of lupus-like autoimmune disease in NZB/WF1 mice after treatment with a blocking monoclonal antibody specific for complement component C5. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:8563.

Weinstein E, Peeva E, Putterman C, Diamond B. B-cell biology. *Rheum Dis Clin N Am*. 2004;30:159-74.

White S, Rosen A. Apoptosis in systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol*. 2003;15:557-62.

Wilson AG, de Vries N, Pociot F, di Giovine FS, van der Putte LB, Duff GW. An allelic polymorphism in the human tumor necrosis factor a promoter region is strongly associated with HLA A1, B8, and DR3 alleles. *J Exp Med*. 1993;177:557-60.

Wilson AG, Gordon C, Di Giovine FS, et al. A genetic association between systemic lupus erythematosus and tumor necrosis factor alpha. *Eur J Immunol*. 1994;24:191.

Wu J, Wilson J, He J, Xiang L, Schur PH, Mountz JD. Fas ligand mutation in a patient with systemic lupus erythematosus and lymphoproliferative disease. *J Clin Invest*. 1996;98:1107-13.

Wyllie AH. Apoptosis: an overview. *Br Med Bull*. 1997;53:451-65.

Yang E, Zha J, Jockel J, Boise I, Thompson CB, Korsmeyer SJ. Bad, a heterodimeric partner for Bcl-xl and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell* 1995;80:285-91.

Youinou P, Jamin C, Lydyard P. CD5 expression in human B-cell populations. *Immunol. Today* 1999;20:312-16.