DOMINGOS ALEXANDRE CICCONE BOTTE

**Avaliação do efeito anti-inflamatório do hormônio alfa
estimulador de melanócito (Alfa MSH) em modelo
experimental de lúpus**

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

Programa de Ciências Médicas
Área de concentração: Processos
Inflamatórios e Alérgicos

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Suzana
Beatriz Veríssimo de Mello

**São Paulo
2013**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Botte, Domingos Alexandre Ciccone

Avaliação do efeito anti-inflamatório do hormônio alfa estimulador de melanócito (Alfa MSH) em modelo experimental de lúpus / Domingos Alexandre Ciccone Botte. -- São Paulo, 2013.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Ciências Médicas. Área de concentração: Processos Inflamatórios e Alérgicos.

Orientadora: Suzana Beatriz Veríssimo de Mello.

Descritores: 1.Alfa-MSH 2.Lúpus eritematoso sistêmico 3.Citocinas
4.Nefropatias 5.Modelos animais 6.Artrite

USP/FM/DBD-209/13

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Olga e Lourival; meu irmão
Thiago; meus avós; minha esposa Ciane e aos
nossos futuros filhos.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Suzana Beatriz Veríssimo de Mello, por acreditar em mim no início deste projeto e por todo o conhecimento, companheirismo e amizade transmitida durante toda a jornada;

À Maria Aurora Gomes da Silva e Maria de Fátima de Almeida, por todos os momentos que passamos juntos;

À Antônio dos Santos Filho, Valdeci Francisco da Silva e Valter Marques da Silva por terem mantido os nossos animais durante o projeto;

À Monique Kowalski Schmitz, companheira do início ao fim da aventura;

Ao Sérgio Catanozi, pela determinação na construção das gaiolas metabólicas;

À Tatiana V. Peixoto, pela ajuda imprescindível no trabalho;

À Alessandra e Gabriela que apoiaram e estiveram presentes nos momentos difíceis;

A todos os amigos do LIM 17 que me ajudaram na construção do conhecimento;

Angela Maria de Souza	Liliam Takayama Guerra	Solange Carrasco
Angélica de Belem de Souza	Luciana Parente	Valéria de Falco Caparbo
Claudia Reis de Oliveira	Margarete Vendramini	Vilma Alves Miranda
Cleonice Bueno	Maria Aparecida A. Ferraz	Vilma dos Santos T. Viana
Cristina Maria Nazareth	Marta Janete Pereira	Virgínia Lúcia Nazário Bonoldi
Diogo Souza Domiciano	Moacir Marques da Silva	Walcy Rosolia Teodoro
Elaine Pires Leon	Prof. Eduardo Ferreira B. Neto	Walkiria Aparecida Schneider
Elenice Mantovani	Prof. Ricardo Fuller	
Elislaine Fiori G. dos Reis	Profª. Claudia G. Schainberg	
Fátima Corrêa da Silva	Profª. Ieda Maria M. Laurindo	
Iná Silvia Santos Santiago	Rose Cler Ferreira	
Juraci Pereira		

À prof^a. Irene Noronha e seus alunos, que sempre foram muito receptivos
em seu laboratório;

Alexandre C. Santana

Filipe M. O. Silva

Willian P. Felix

Cleonice Silva

À prof^a. Denise Maria Avancini Costa Malheiros, pela ajuda ímpar na
análise histopatológicas das lâminas;

À Fernanda Guedes Luiz, pelo auxílio com a preparação
imunohistoquímica;

Ao prof. Luiz Fernando Ferraz da Silva, pelo auxílio com o sistema
computacional de quantificação de imagens;

À Maria Luisa Guzzo Valentti, pelo auxílio técnico no biotério central;

Ao Prof. Niels Olsen Saraiva Câmara, pela participação em minha banca
de qualificação;

Aos Profs. Ana Maria de Lauro Castrucci, Anna Catania, Mauro Perretti,
Minoru Satoh pelas discussões científicas ao longo do projeto;

A todos os outros companheiros de profissão e amigos que também
contribuíram de maneira significativa para a conclusão dessa tese;

À minha cunhada Inajara Maria, pelas correções gramaticais na língua
inglesa;

Aos camundongos utilizados nessa tese, realmente sem eles isso não
seria possível, sou muito grato a todos eles;

A todos os pesquisadores que trabalharam ou trabalham com o hormônio
 α -MSH e no entendimento do lúpus, pois o futuro da ciência não se faz
sem passado ou presente;

A Dr^a. Eloisa Silva Dutra de Oliveira Bonfá, pela confiança durante o
trabalho;

À FAPESP e a CAPES, por apoiarem financeiramente o projeto.

“Diversos pesquisadores sugerem que fragmentos do ACTH, com peso molecular muito menor que o peptídeo, possam apresentar atividade fisiológica. Isso abre a possibilidade de que a síntese um potente peptídeo possa ser obtida a partir do hormônio”.

PHILIP S. HENCH – Nobel Lecture, December 11, 1950

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referencias: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão 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. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO	3
1.1 A NEFRITE LÚPICA	7
1.1.2 TRATAMENTO DA NEFRITE LÚPICA E NOVAS PERSPECTIVAS	12
1.2 SISTEMA NEURO-IMUNOENDÓCRINO	14
1.3 α -MSH, UMA MELANOCORTINA COM PROPRIEDADES IMUNOMODULADORAS	20
1.4 APLICAÇÕES DO α -MSH EM MODELOS EXPERIMENTAIS DE DOENÇAS AUTO-IMUNES E INFLAMATÓRIAS	28
1.5 O USO DE MELANOCORTINAS NO TRATAMENTO DE PATOLOGIAS RENAIAS	31
1.6 APLICAÇÕES DO α -MSH EM MODELO DE DOENÇAS RENAIAS	34
1.7 MODELO MURINO DE LES INDUZIDO POR PRISTANE	39
2.0 OBJETIVOS	45
3.0 MATERIAL E MÉTODOS	49
3.1 MODELO DE LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO	50
3.1.1 TRATAMENTOS	50
3.1.2 QUANTIFICAÇÃO TOTAL DE LEUCÓCITOS	51
3.1.3 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE IGG	51
3.1.4. AVALIAÇÃO DOS ANTICORPOS ANTINUCLEARES	52
3.1.5 DETERMINAÇÃO DE CITOCINAS SÉRICAS POR MULTIPLEX.	53
3.2 AVALIAÇÃO DA ARTRITE	54
3.3 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO RENAL	54
3.4 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DO TECIDO RENAL	55
3.4.1 MARCAÇÕES IMUNOHISTOQUÍMICAS.	56
3.5 LEITURA DAS LÂMINAS	58
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	59
4.0 RESULTADOS	63
4.1 Características Gerais	63
4.2 EFEITO DO TRATAMENTO COM NDP-MSH NOS PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS DO LES	65
4.2.1 ANÁLISE DE CITOCINAS SÉRICAS	67
4.3 EFEITO DO TRATAMENTO COM NDP-MSH NO DESENVOLVIMENTO DA ARTRITE.	69

4.4 EFEITO DO TRATAMENTO COM NDP-MSH NOS PARÂMETROS URINÁRIOS DE ANIMAIS COM LES	70
4.4.1 CELULARIDADE GLOMERULAR	71
4.4.2 LESÃO GLOMERULAR	72
4.4.3 AVALIAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DE MARCADORES DE FUNÇÃO RENAL DE ANIMAIS COM LES INDUZIDO POR PRISTANE	73
4.4.4 AVALIAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DE MELANOCORTINA NOS GLOMERULOS DE ANIMAIS COM LES INDUZIDO POR PRISTANE	79
5.0 DISCUSSÃO	85
6.0 CONCLUSÕES	97
7.0 REFERÊNCIAS	101

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico ou corticotrofina
AMPc	Adenosina monofosfato cíclica
ANA	Anticorpos antinucleares
AR	Artrite reumatoide
BSA	Albumina Sérica Bovina
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP
C3	Fator 3 do sistema complemento
CD3	Receptor de linfócitos
CG	Glicocorticoide
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CREB	Proteína ligante do elemento de resposta ao AMPc
CRF	Fator liberador da corticotrofina
DRET	Doença renal em estágio terminal
FAN	Fatores antinucleares e citoplasmático
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
GPX	Glutathione peroxidase
Grupo C	Animais normais utilizados como controle do experimento
Grupo LES	Animais que tiveram LES induzido por pristane e tratados com salina 0,9%
Grupo LES-MSH	Animais que tiveram LES induzido por pristane e tratados com NDP-MSH 1,25 mg/Kg/dia
Hep-2	Linhagem de células humanas provenientes de carcinoma de laringe
HP Acthar Gel®	ACTH1-39 Gel
HPA	Hipotálamo-Hipófise-Adrenal
IC	Imunocomplexo
IL	Interleucina

iNOS	Óxido nítrico-sintase indutível
IP	Intraperitoneal
IV	Intravenosa
LES	Lúpus eritematoso sistêmico
LID	Lúpus induzido por drogas
MCR	Receptor de melanocortinas
MHC-I	Moléculas de histocompatibilidade de classe I
NDP-MSH; Melanotan-I; [Nle4, dphe7]-α-MSH	Alfa hormônio estimulador de melanócito com substituição da metionina na posição 4 pela norleucina e da l-fenilalanina na posição 7 pela d-fenilalanina
NFκB	Fator de transcrição nuclear
NL	Nefrite lúpica
NM	Nefropatia membranosa
NO	Óxido nítrico
PC1	Pró-hormônio convertase 1
PGE2	Prostaglandinas
PKA	Proteína quinase dependente de AMPc
PLC	Fosfolipase C
POMC	Pro-opiomelanocortina
SC	Subcutâneas
SLICC	Systemic Lupus Collaborating Clinics
SN	Síndrome nefrótica
SNC	Sistema nervoso central
Synacthen®	ACTH1-24 sintético
TLR	Receptores do tipo Toll
TMPD	2,6,10,14-tetrametilpentadecano; pristane
TNF	Fator de necrose tumoral
α-MSH	Hormônio alfa estimulador de melanócito
α-SMA	Alfa actina de músculo liso

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fisiopatologia do Lúpus. No painel A, os genes ligados ao desenvolvimento da doença e fatores ambientes que a afetam. Em B, os processos de apresentação de autoantígenos e ativação dos braços inatos e adaptativos da resposta imune. Em C a produção de citocinas e alterações linfocíticas no processo inflamatório. Adaptado de (CRISPIN et

al., 2010a; SIFUENTES GIRALDO et al., 2012; SU et al., 2012) 6

Figura 2. Espectro das alterações glomerulares no LES. No lado esquerdo, lesões podocitárias, ou alterações estruturais do glomérulo que afetam o funcionamento dos podócitos (por exemplo, por formação de cicatrizes ou deposição de excesso de matriz ou de outro material), provoca proteinúria e síndrome nefrótica. A direita, o processo inflamatório leva a danos e proliferação celular, quebra da membrana basal glomerular e hematuria. Adaptado de (Boon; Davidson, 2006; Ooi; Kitching, 2012)..... 9

Figura 3. Mecanismos que desencadeiam a nefrite lúpica (A). ICs ativam células glomerulares e imunes aumentando a produção de mediadores pró-inflamatórios. No exterior do rim, autoantígenos nucleares ativam as células apresentadoras de antígenos para secretar citocinas pró-inflamatórias e ativar as células T e células B. No painel B, A deposição do ICs dentro do vaso que promovem lesões podocitárias, destruição da membrana basal glomerular e proteinúria. Em C, uma visão geral do processo de NL, com o acometimento de cada segmento do néfron. Adaptado de (Davidson; Aranow, 2010; Migliorini; Anders, 2012; Ooi; Kitching, 2012) 11

Figura 4. Regulação do eixo HPA durante o estresse inflamatório. Adaptado de (Crispin et al., 2010; Gong, R., 2012) 15

Figura 5. Síntese de peptídeos derivados da POMC na hipófise (painel A). O éxon 2 codifica a sequência sinal e somente o éxon 3 transcreve a proteína POMC bioativa. Em B, homologia entre as diferentes melanocortinas. adaptado de (Brzoska et al., 2008; Lindskog, J. A., 2012) . 21

Figura 6. Modelo da sinalização dos receptores MCRs após a ligação do α -MSH. A AC ativa a PKA, que fosforila o CREB. A interação com a cascata da (MEK/MAPK) suprime a degradação do I κ B, modulando a transcrição de genes inflamatórios. A ativação de PLC ativa o a via do fosfato inositol/Ca²⁺/diacilglicerol levando à ativação ou inibição de fatores de transcrição. Adaptado de (Catania, 2010) 25

Figura 7. Mecanismos de eficácia terapêutica do α -MSH em nefropatias. A expressão dos receptores de melanocortinas é cortical e medular. Não foi demonstrada a expressão de MC2R no rim. Adaptado de (Gong, R., 2012; Taraphder, 2013)..... 35

Figura 8. Variação ponderal (peso final – inicial em g) após a indução do LES. Animais controle (C, □, n=5) inoculados com pristane e tratados com salina (LES, ■, n=5) e tratados com NDP-MSH 1,25 mg/Kg (LES-MSH, x, n=10). Os animais foram pesados 0, 30, 60, 90 e 180 dias após a injeção de pristane. Os resultados estão expressos como média $\pm$ epm. *p<0,05 por comparação aos animais controle, #p<0,05 por comparação com o grupo LES..... 63

- Figura 9.** Variação de leucócitos periféricos por mm^3 de sangue (final - inicial dias) em animais normais controle (C, n=5), inoculados com pristane e tratados com salina (LES, n=5) e tratados com NDP-MSH 1,25 mg/Kg (LES-MSH, n=10). Dados apresentados como mediana com máximo e mínimo. * $p < 0,05$ por comparação aos animais controle.64
- Figura 10.** Cavidade peritoneal de camundongo LES 180 dias após a injeção pristane (A), as setas brancas apontam granulomas ao redor do fígado e baço. Em B observa-se a cavidade peritoneal de camundongo controle 180 dias após a injeção de solução salina.65
- Figura 11.** Níveis Plasmáticos de imunoglobulinas IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 em animais controle (C, n=5) inoculados com pristane e tratados com salina (LES, n=5) e tratados com NDP-MSH 1,25 mg/Kg (LES-MSH, n=10) 180 dias após a inoculação com pristane. Títulos de 1:15.000. Dados apresentados como mediana com máximo e mínimo. * $p < 0,05$ por comparação aos animais controle, # $p < 0,05$ por comparação com o grupo LES.66
- Figura 12.** Efeito do NDP-MSH 1,25 mg/Kg/dia na incidência de FAN em camundongos com LES (Painel A), padrão negativo (Painel B) padrão nucleolar e citoplasmático (painel C) padrão nuclear e citoplasmático (painel D). Diluição de 1:200 e aumento original 400x. * $p < 0,05$ por comparação aos animais controle, # $p < 0,05$ por comparação com o grupo LES.67
- Figura 13.** Perfil de citocinas plasmáticas em animais controle (C, n=5), inoculados com pristane e tratados com salina (LES, n=5) e tratados com NDP-MSH 1,25 mg/Kg/Dia (LES-MSH, n=10) 180 dias após a inoculação. Dados apresentados como mediana com máximo e mínimo. * $p < 0,05$ vs C e # $p < 0,05$ vs LES.68
- Figura 14.** Efeito do tratamento com NDP-MSH sobre a artrite desenvolvida após a inoculação com pristane. **Painel A** estão apresentados os resultados (mediana com máximo e mínimo) do escore de artrite em animais controles (C, n=5) em animais LES tratados com salina (LES, n=5) e LES tratados com NDP-MSH 1,25 mg/Kg (LES-MSH, n=10). * $p < 0,05$ por comparação aos animais controle, # $p < 0,05$ por comparação com o grupo LES. **Painel B**, artrite em animal LES. **Painel C**, artrite em animal LES-MSH.69
- Figura 15.** Efeito do tratamento com NDP-MSH nos parâmetros urinários de animais com LES. Painel A, proteinúria dos animais controles (C, n=5) inoculados com pristane e tratados com salina (LES, n=5) e LES tratados com NDP-MSH 1,25 mg/Kg (LES-MSH, n=10). Dados apresentados como mediana com máximo e mínimo. * $p < 0,01$ por comparação com animais controle. Painel B, perfil eletroforético das amostras de urina dos animais, ressaltando a banda da albumina.71
- Figura 16.** Celularidade glomerular dos animais controles (C, n=5) animais com LES tratados com salina (LES, n=5) e LES tratados com NDP-MSH 1,25 mg/Kg (LES-MSH, n=10). Dados apresentados como mediana com máximo e mínimo. * $p < 0,05$ vs. animais controle, # $p < 0,05$ por comparação com o grupo LES.72
- Figura 17.** Painel A, Lesão glomerular dos animais controles (C, n=5) animais com LES e tratados com salina (LES, n=5) e LES tratados com NDP-MSH 1,25 mg/Kg (LES-MSH, n=10). Painel B, Fibrose glomerular em animais controles (C, n=5) animais com LES e tratados com salina (LES, n=5) e LES tratados com NDP-MSH 1,25 mg/Kg (LES-MSH,

n=10). Os resultados estão expressos como mediana. * $p < 0,05$ por comparação aos animais controle, # $p < 0,05$ por comparação com o grupo LES. 73

Figura 18. Efeito do NDH-MSH 1,25 mg/kg/dia na expressão de IgG glomerular. No Painel A mediana com máximo e mínimo da presença de IgG em rins de animais controles normais (C, n=5) animais LES tratados com salina (LES, n=5) e LES tratados com NDP-MSH 1,25 mg/Kg (LES-MSH, n=10). No painel B, um exemplo de marcação de glomérulo controle; no painel C, marcação de um glomérulo de animal LES; painel D, marcação de glomérulo de animal LES-MSH, *** $p < 0,001$ vs controle e ## $p < 0,01$ vs LES. 74

Figura 19. Efeito do NDH-MSH 1,25 mg/kg/dia na expressão de α -SMA glomerular. No Painel A mediana com máximo e mínimo de α -SMA glomerular em rins de animais controles (C, n=5) animais com LES e tratados com salina (LES, n=5) e LES tratados com NDP-MSH 1,25 mg/Kg (LES-MSH, n=10). O painel B ilustra a marcação de glomérulo controle; painel C a marcação de um glomérulo de animal LES; painel D a marcação de glomérulo de animal LES-MSH, ** $p < 0,01$ vs controle e ## $p < 0,01$ vs LES. 75

Figura 20. Efeito do NDH-MSH 1,25 mg/kg/dia na expressão de iNOS glomerular. No Painel A estão expressos mediana com máximo e mínimo de iNOS em rins de animais controles (C, n=5) animais com LES e tratados com salina (LES, n=5) e LES tratados com NDP-MSH 1,25 mg/Kg (LES-MSH, n=10). O painel B ilustra a marcação de glomérulo controle; painel C a marcação de um glomérulo de animal LES; painel D a marcação de glomérulo de animal LES-MSH, * $p < 0,01$ vs controle e # $p < 0,01$ vs LES. 76

Figura 21. Efeito do NDH-MSH 1,25 mg/kg/dia na expressão de C3 glomerular. No Painel A estão expressos mediana com máximo e mínimo de C3 em rins de animais controles (C, n=5) animais com LES e tratados com salina (LES, n=5) e LES tratados com NDP-MSH 1,25 mg/Kg (LES-MSH, n=10). O painel B ilustra a marcação de glomérulo controle; painel C a marcação de um glomérulo de animal LES; painel D a marcação de glomérulo de animal LES-MSH. 77

Figura 22. Efeito do NDH-MSH 1,25 mg/kg/dia na expressão de CD3 glomerular. No Painel A estão expressos mediana com máximo e mínimo de CD3 em rins de animais controles (C, n=5) animais com LES e tratados com salina (LES, n=5) e LES tratados com NDP-MSH 1,25 mg/Kg (LES-MSH, n=10). O painel B ilustra a marcação de glomérulo controle; painel C a marcação de um glomérulo de animal LES; painel D a marcação de glomérulo de animal LES-MSH. 78

Figura 23. Efeito do NDH-MSH 1,25 mg/kg/dia na expressão de MC1R glomerular. No Painel A estão expressos a mediana com máximo e mínimo de MC1R em rins de animais controles (C, n=5) animais com LES e tratados com salina (LES, n=5) e LES tratados com NDP-MSH 1,25 mg/Kg (LES-MSH, n=10). O painel B ilustra a marcação de glomérulo controle; painel C a marcação de um glomérulo de animal LES; painel D a marcação de glomérulo de animal LES-MSH, ** $p < 0,01$ vs controle. 79

Figura 24. Efeito do NDH-MSH 1,25 mg/kg/dia na expressão de CRF glomerular. No Painel A estão expressos a mediana com máximo e mínimo de CRF em rins de animais controles (C, n=5) animais com LES (LES, n=5) e LES tratados com NDP-MSH 1,25 mg/Kg (LES-MSH, n=10). O painel B ilustra a marcação de um glomérulo controle; painel C a marcação de

um glomérulo de animal LES; painel D a marcação de glomérulo de animal LES-MSH , ##
 p <0,05 vs LES.....80

Figura 25. Efeito do NDH-MSH 1,25 mg/kg/dia na expressão de α -MSH glomerular. No
 Painel A estão expressos a mediana com máximo e mínimo de α -MSH glomerular em rins
 de animais controles (C, n=5) animais com LES e tratados com salina (LES, n=5) e LES
 tratados com NDP-MSH 1,25 mg/Kg (LES-MSH, n=10). O painel B ilustra a marcação de
 glomérulo controle; painel C a marcação de um glomérulo de animal LES; painel D a
 marcação de glomérulo de animal LES-MSH.....81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Critérios do colégio Americano para diagnóstico e classificação do LES.....	04
Tabela 2. Classificação de Nefrite Lúpica.....	10
Tabela 3. Receptores para melanocortinas e seus efeitos biológicos.....	22
Tabela 4. Efeitos anti-inflamatório do α -MSH <i>in vitro</i>	27
Tabela 5. Perfis sorológicos e clínicos entre o LES humano e em modelos animais.....	41
Tabela 6. Relação de anticorpos primários empregados nas reações de imunohistoquímica.....	58

RESUMO

O hormônio alfa estimulador de melanócito (α -MSH) é um neuropeptídeo com atividade anti-inflamatória que apresenta efeitos benéficos em modelos experimentais de doenças autoimunes. Entretanto pouca atenção tem sido dada a seus efeitos no lúpus eritematoso sistêmico (LES). No presente estudo utilizou-se o tratamento com o super análogo NDP-MSH em modelo experimental de LES induzido por pristane. Grupos de camundongos fêmeas foram tratados diariamente com 1,25 mg/Kg de NDP-MSH ou solução salina por 180 dias. Foram avaliados os seguintes parâmetros séricos: isotipos de IgG, anticorpos antinucleares (FAN) e citocinas. A intensidade da artrite foi mensurada por graduação de edema e eritema. A função renal foi estimada por proteinúria e escore histopatológico. A expressão de IgG, α -SMA, iNOS, C3, CD3, MC1R, CRF e α -MSH glomerular foi quantificada por imunohistoquímica. Camundongos com LES apresentaram aumento de IgG, FAN, IL-6, IL-10 e TNF α , escore de artrite, disfunção renal e celularidade mesangial quando comparados aos animais controle normais. O tratamento dos animais LES com NDP-MSH reduziu os títulos de IgG1 e IgG2a ($p<0,05$ e $p<0,001$ respectivamente), bem como a incidência de FAN⁺ ($p<0,05$). Níveis séricos de IL-6 e IL-10 foram abrandados e houve aumento dos níveis de TNF α ($p<0,05$). O escore de artrite foi reduzido em 70% ($p<0,01$). A proteinúria não foi afetada pelo tratamento, entretanto houve 50% de redução do grau de lesão glomerular ($p<0,05$). A avaliação imunohistoquímica mostrou que o tratamento reduziu os depósitos de IgG e a expressão de α -SMA e iNOS glomerular ($p<0,01$; $p<0,01$ e $p<0,05$ respectivamente). A expressão do receptor MC1R foi menor nos grupos LES, tratados ou não. A expressão de α -MSH e CRF estavam diminuídas somente no grupo tratado com NDP-MSH enquanto a expressão de C3 e CD3 não diferiu entre os grupos. Em conjunto nossos resultados sugerem, pela primeira vez, que o tratamento com o análogo de α -MSH melhora a atividade da doença em modelo experimental de LES.

Descritores: 1. alfa-MSH 2. Lúpus eritematoso sistêmico 3. Citocinas 4. Nefropatias 5. Modelos animais 6. Artrite

ABSTRACT

Alpha-melanocyte stimulating hormone (α -MSH) is a neuropeptide with anti-inflammatory activity that has beneficial effects in experimental models of autoimmune diseases. However little attention has been paid to its effects on systemic lupus erythematosus (SLE). Herein we employed the treatment with the super analogue NDP-MSH in experimental SLE induced by pristane. Groups of female mice were treated daily with 1.25 mg/Kg of NDP-MSH (SLE-MSH) or saline for 180 days. The following parameters were evaluated: serum IgG isotypes, antinuclear antibodies (ANA) and cytokines. Arthritis was graded by edema and erythema in each paw. Renal function was estimated by proteinuria and histopathological score. The expression of IgG, α -SMA, iNOS, C3, CD3, MC1R, CRF and α -MSH was quantified by immunohistochemistry in glomerulus. SLE mice presented increased IgG levels, ANA, IL-6, IL-10 and TNF α , arthritis incidence, renal dysfunction and mesangial cellularity when compared with normal animals. Animals SLE-MSH presented reduction of IgG1 and IgG2a titles ($p<0.05$ and $p<0.001$ respectively), as well as the incidence of FAN+ ($p<0.05$). The treatment reduced IL-6 and IL-10 serum levels and increase of TNF α levels ($p<0.05$). Arthritis score was reduced in 70% in SLE-MSH animals ($p<0.01$). Proteinuria was not affected by the treatment, however it was registered a 50% reduction of the glomerular lesion ($p<0.05$). The immunohistochemical evaluation revealed reduced IgG deposits and glomerular expression of α -SMA and iNOS in SLE-MSH animals ($p<0.01$, $p<0.01$ and $p<0.05$ vs.LES, respectively). MC1R was sub expressed in SLE animals, treated or not. The expression of α -MSH and CRF were impaired only in the SLE-MSH group. Taken together our results suggest for the first time that treatment with α -MSH analogue improve disease activity in an experimental model of SLE.

Descriptors: 1.Alpha-MSH 2. Systemic lupus erythematosus 3.Cytokine
4.Nephropathys 5.Animal models 6.Arthritis

1.0 INTRODUÇÃO

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença autoimune que pode acometer diversos órgãos (pele, articulações, coração, pulmões, sangue, rins e cérebro) e seu início pode ocorrer de maneira aguda ou insidiosa, com posteriores manifestações clínicas polimórficas (Yoshinari; de Oliveira Bonfá, 2000). Segundo a classificação de Gell e Coombs o LES é considerado uma reação de hipersensibilidade do tipo III caracterizada pela reação imune generalizada resultante da produção de autoanticorpos e consequente deposição de imunocomplexos (IC). Estes causam uma resposta inflamatória crônica, por meio da ativação da via clássica do complemento, bem como o recrutamento e ativação de células fagocíticas e linfócitos CD4 (Boon; Davidson, 2006).

O diagnóstico do LES baseia-se numa combinação de características clínicas e alterações laboratoriais (tabela 1), onde pelo menos quatro dos 11 fatores apresentados devem estar presentes no paciente (Hochberg, 1997). No entanto, de acordo com a nova revisão proposta pelo grupo Systemic Lupus Collaborating Clinics (SLICC), o paciente pode ser diagnosticado com LES, mesmo que apresente somente nefrite lúpica (NL) confirmada por biópsia na presença de anticorpos antinucleares (ANA) ou anti-DNA_{fita dupla} (Petri et al., 2012).

Tabela 1. Critérios do colégio Americano para diagnóstico e classificação do LES

1. Eritema malar	
2. Erupção discóide	
3. Fotosensibilidade	
4. Úlceras orais	
5. Artrite	
6. Serosite:	a) Pleurite
	b) Pericardite
7. Alterações renais	a) Proteinúria acima de 0,5g/24h
	b) Cilindros celulares: hemoglobina
8. Alterações neurológicas	a) Convulsões
	b) Psicoses
9. Alterações hematológicas	a) anemia hemolítica
	b) Leucopenia
	c) Linfopenia
	d) Trombocitopenia
10. Alterações imunológicas	a) anticorpo anti-DNA aumentado
	b) Anticorpo anti-Smith
	c) Anticorpo anti-fosfolípide
11. Anticorpos	FAN em valores elevados

Autoanticorpos contra antígenos nucleares e citoplasmáticos ocorrem com surpreendente variedade no LES, contudo quase 100% dos pacientes em atividade são positivos para o exame contra fatores antinucleares e citoplasmático (FAN). Atualmente, a cultura de células de linhagem humana provenientes de carcinoma de laringe (Hep-2) é o substrato mais empregado para a detecção de anticorpos antinucleares e citoplasmáticos com positividade de 99%. O teste do FAN complementado pela pesquisa de autoanticorpos específicos apresentam grande utilidade clínica (CARVAHO; LANNA; BÉRTOLO, 2008).

A etiologia do LES é multifatorial, tanto fatores genéticos quanto hormonais, imunológicos e ambientais (luz ultravioleta, infecções e medicamentos) podem contribuir para a exacerbação dos sintomas. Na figura 1A estão apresentadas as possíveis alterações genéticas da doença, algumas identificadas no locus HLA dentro do cromossomo 6, em outros casos nos componentes do complemento C1q, C2 e C4, do receptor de imunoglobulina FcγRIIIb e da exonucleases de DNA TREX1. Adicionalmente, outros estudos identificaram polimorfismos comuns que predispoem ao LES, incluindo o gene ITGAM, que codifica uma integrina; os genes IRF5 e STAT4, que estão envolvidos na sinalização de interferon e o gene BLK, que está envolvido na sinalização de células B e muitos outros resumidos na figura 1A (Colledge; Walker; Ralston, 2010).

O LES é caracterizado pela produção de diversos autoanticorpos, em particular contra componentes da cromatina, como nucleossomos, histonas, ribonucleoproteínas e DNA_{fita dupla}. Apesar de não haver total compreensão de por que os antígenos nucleares são alvos da resposta autoimune, evidências sugerem que o fenômeno está correlacionado a expressão de autoantígenos na superfície de vesículas apoptóticas, ao aumento da apoptose, e/ou falhas na remoção de corpos apoptóticos.

Existem indicações que a apoptose de nucleossomos sejam os imunógenos iniciais no LES, com subsequente direcionamento para histonas e DNA_{fita dupla}. Adicionalmente, verificou-se que somente no plasma de pacientes lúpicos encontra-se um subconjunto de nucleossomos que contém uma proteína não-histônica HMGB1, capaz de

induzir a maturação de células dendríticas e a liberação de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos via receptores de tipo Toll (TLR) (Borchers et al., 2012). Posteriormente, observa-se hiper-responsividade de células B e T, aumento da produção de autoanticorpos e citocinas pró-inflamatórias (INF- α , IL-6, e IL-10), desencadeando a quebra de tolerância imunológica, resumidos na figura 1B e C (Wallace, D. J.; Hahn; Dubois, 2007).

Figura 1. Fisiopatologia do Lúpus. No painel A, os genes ligados ao desenvolvimento da doença e fatores ambientais que a afetam. Em B, os processos de apresentação de autoantígenos e ativação dos braços inatos e adaptativos da resposta imune. Em C a produção de citocinas e alterações linfocíticas no processo inflamatório. Adaptado de (CRISPIN et al., 2010a; SIFUENTES GIRALDO et al., 2012; SU et al., 2012)

Independente da causa, acredita-se que a formação dos ICs seja um importante mecanismo que promove o dano tecidual no LES ativo, levando a vasculite generalizada e ao comprometimento a órgãos específicos. De fato, o envolvimento articular é a manifestação mais encontrada no LES, depois dos sintomas constitucionais, detectado em mais de 90% dos pacientes durante a evolução da doença (Lahita, 2004). Além disso, o comprometimento renal ocorre entre 30-60% dos pacientes durante os primeiros 10 anos da doença. Esta é a manifestação mais severa da doença e a falência renal é um forte preditivo de mortalidade (Hahn et al., 2012).

1.1 A NEFRITE LÚPICA

As doenças renais são consideradas atualmente um grave e crescente problema de saúde pública em escala mundial. Dados do censo brasileiro de diálise de 2011 estimam que a prevalência e incidência de pacientes dialíticos é de 475 e 149 pacientes por milhão de pessoas, respectivamente. Além disso, o relatório conclui que as glomerulonefrites crônicas representam o terceiro maior fator causal para admissão de pacientes em diálise no país (Sesso et al., 2012).

Um estudo retrospectivo em que foram avaliados os relatórios de 9.617 biópsias renais de todas as regiões brasileiras entre 1993 e 2007,

concluiu que a NL é a maior causa de glomerulonefrites secundárias no Brasil (Polito; de Moura; Kirsztajn, 2010). Dentre patologias que evoluem para doença renal em estágio terminal (DRET), as glomerulopatias são as que determinam deterioração mais acentuada da função renal. São caracterizadas por intenso processo inflamatório e desenvolvimento de síndrome nefrótica (SN), proteinúria, hipoalbuminemia, hiperlipidemia e edema periférico (Couser, 2012; Vianna et al., 2011).

O comprometimento renal é uma característica comum do LES; apesar de poder aparecer em qualquer momento da doença, geralmente ocorre dentro de um ano após o diagnóstico, e quase sempre no prazo de 5 anos (Borchers et al., 2012). Especificamente, o termo NL é reservado para lesões renais mediadas por ICs e suas intercorrências. As características clínicas são polimórficas, variando desde anormalidades urinárias assintomáticas, síndrome nefrítica e até a SN, como demonstrado na figura 2 (Anders; Weening, 2013; Romick-Rosendale et al., 2011).

A apresentação clínica não está totalmente correlacionada com os achados histológicos. Assim, as biópsias renais são o padrão-ouro para estabelecer o diagnóstico da NL e também para determinar a atividade/cronicidade da doença, a fim de formular o tratamento adequado (Borchers et al., 2012).

Figura 2. Espectro das alterações glomerulares no LES. No lado esquerdo, lesões podocitárias, ou alterações estruturais do glomérulo que afetam o funcionamento dos podócitos (por exemplo, por formação de cicatrizes ou deposição de excesso de matriz ou de outro material), provoca proteinúria e síndrome nefrótica. A direita, o processo inflamatório leva a danos e proliferação celular, quebra da membrana basal glomerular e hematúria. *Adaptado de (Boon; Davidson, 2006; Ooi; Kitching, 2012)*

As alterações histológicas encontradas em tecido renal de pacientes com LES são multifacetadas, apresentando desde envolvimento mesangial leve, passando por formas de glomerulonefrites proliferativa até terminar com fibrose em estágio final (Borchers et al., 2012). As possibilidades de acometimento encontrados na NL foram classificadas pelas associações de nefrologia com base nas lesões glomerulares. Apesar de alterações túbulo-intersticiais e vasculares não terem sido contempladas, existem recomendações específicas para a abordagem de tais eventos. Na Tabela 2 está apresentada a mais recente classificação dos diferentes níveis de danos encontrados na NL (Weening et al., 2004).

Tabela 2. Classificação de Nefrite Lúpica *Sociedade Internacional de Nefrologia/Sociedade de Patologia Renal de 2003*

Classe I	NL mesangial mínima
Classe II	NL mesangial proliferativa
Classe III	NL focal (<50% dos glomérulos)
	III (A): lesões ativas
	III (A/C): lesões crônicas e ativas
	III (C): lesões crônicas
Classe IV	NL difusa (> 50% dos glomérulos)
	Difusa segmentada (IV-S) ou global (IV-G)
	NL
	IV (A): lesões ativas
	IV (A/C): lesões crônicas e ativas
	IV (C): lesões crônicas
Classe V	NL membranosa
Classe VI	NL esclerosante avançada
	(>90% de glomérulos esclerosados sem atividade residual)

Dentre os mais de 150 diferentes autoantígenos relacionados ao LES, os antígenos nucleares são os mais fortemente implicados na patogênese da NL. Contudo, mais recentemente observa-se que o anticorpos anti-C1q e anti-glomerulares (como anti- α -actinina, anti-laminina1, anti-fibronectina, anti-miosina, e anti-colágeno) são detectados no estabelecimento da doença, antes mesmo da detecção de anticorpos antinucleares e da proteinúria (Hanrotel-Saliou et al., 2010).

A figura 3 ilustra as diversas situações que ocorrem para o estabelecimento da NL, que pode ser iniciada pela deposição de ICs, o que dispara a cascata de eventos inflamatórios com ligação da FcR em células mononucleares e células renais, (células mesangiais e endoteliais) com consequente consumo de complemento. A seguir, células glomerulares produzem citocinas, quimiocinas, espécies reativas de oxigênio e mediadores lipídicos que promovem apoptose de células endoteliais, aumentando o influxo de linfócitos, macrófagos e neutrófilos para o interstício renal. Esse infiltrado pode então sofrer expansão e

diferenciação local, tornando os rins uma espécie de órgão linfóides secundários com capacidade de produção de células plasmáticas produtoras de autoanticorpos. Acredita-se que essa situação esteja associada ao mal prognóstico da doença, bem como no agravamento da falência renal (Crispin et al., 2010; Gigante et al., 2011).

Figura 3. Mecanismos que desencadeiam a nefrite lúpica (A). ICs ativam células glomerulares e imunes aumentando a produção de mediadores pró-inflamatórios. No exterior do rim, autoantígenos nucleares ativam as células apresentadoras de antígenos para secretar citocinas pró-inflamatórias e ativar as células T e células B. No painel B, A deposição do ICs dentro do vaso que promovem lesões podocitárias, destruição da membrana basal glomerular e proteinúria. Em C, uma visão geral do processo de NL, com o acometimento de cada segmento do néfron. Adaptado de (Davidson; Aranow, 2010; Migliorini; Anders, 2012; Ooi; Kitching, 2012)

Nas etapas finais do processo, ocorre alteração fenotípica de células mesangiais ativadas, que se transformam em fibroblastos capazes de liberar proteases, citocinas, mediadores oxidativos e colágeno. A consequência é a lesão e morte das células glomerulares e o declínio do funcionamento dos néfrons (Vianna et al., 2011).

Na sequência, o processo inflamatório se estende em direção a regiões túbulo-intersticiais. Se a lesão permanecer ativa, os processos reparadores tornam-se crônicos e amplificam ainda mais a inflamação e a fibrose (de Zubiria Salgado; Herrera-Diaz, 2012; Iwata et al., 2011; Kammoun et al., 2011).

1.1.2 TRATAMENTO DA NEFRITE LÚPICA E NOVAS PERSPECTIVAS

Se a NL não for tratada, a doença evolui para óbito de 80% dos pacientes no prazo de 5 anos. Contudo, a introdução de terapias imunossupressoras, que incluem glicocorticoides (CG), ciclofosfamida, azatioprina e micofenolato de mofetila, foram capazes de alterar a perspectiva desses pacientes e atualmente a taxa de sobrevida é de 88% em 10 anos (Borba et al., 2008; KDIGO., 2012).

Porém o desfecho clínico mesmo após a terapia imunossupressora de amplo espectro ainda é insatisfatório. As taxas de remissão completa ocorre somente em 20-50% dos doentes e recorrência em até 30% durante o período de 2 anos (Davidson; Aranow, 2010). Estima-se que 5-20% destes pacientes progridam para DRET, tornando necessária a

intervenção com terapia dialítica de longo prazo ou a transplante renal

(Mattos; Santiago, 2012)•

As recorrências da NL exigem aumento da imunossupressão, que pode levar ao aumento dos efeitos colaterais, incluindo infecção, cushing e malignidade. Além dos efeitos adversos comuns, a utilização em longo prazo de ciclofosfamida pode acarretar em insuficiência ovariana, um problema relevante, uma vez que até 90% dos pacientes com LES são mulheres jovens. Adicionalmente, a frequência de doenças cardiovasculares prematuras em doentes com LES está claramente elevada, sendo a principal causa de morte após o primeiro ano de tratamento. Este aumento, em parte, reflete o controle parcial da doença, mas também pode estar vinculado ao uso de agentes imunossupressores

(Smith, R. M.; Clatworthy; Jayne, 2010)•

Portanto, continua inexistente a cura para a SN. Os tratamentos atuais apenas aliviam os sintomas e ainda podem causar graves efeitos adversos. Além disso, existe a possibilidade do paciente se tornar esteroide-resistente, entrar em recorrência após a redução/descontinuidade e até não responder ao tratamento (Bomback et al.,

2012; Ito et al., 2011; Lombel; Hodson; Gipson, 2013)•

Dessa forma, frequentemente, há necessidade de utilizar uma segunda, terceira e até quarta linha terapêutica para obter remissão da doença. Atualmente novos agentes são testados para auxiliar o resgate de pacientes em SN, como por exemplo, as melanocortinas, o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) ou corticotrofina e o hormônio alfa estimulador

de melanócito (α -MSH), dois neuropeptídeos que possuem um papel fundamental no controle do sistema neuro-imunoendócrino.

1.2 SISTEMA NEURO-IMUNOENDÓCRINO

Neuro-imunoendocrinologia é o estudo das interações moleculares, celulares e fisiológicas entre os sistemas nervoso, imune e endócrino (Wilder, 2002). Essa área do conhecimento foi bastante reconhecida após o Nobel de 1949, quando Hench e colaboradores demonstraram os efeitos anti-inflamatórios da cortisona e do ACTH na artrite reumatoide (AR) (Hench; Kendall; et al., 1949). Atualmente sabe-se que um grande número de neuropeptídeos e seus receptores são compartilhados entre esses três sistemas, sugerindo a participação do sistema nervoso central (SNC), como imunomodulador de diferentes condições patológicas, especialmente auto-imunes como o LES (Mok; Lau, 2003b; Silverman, M. N.; Sternberg, E. M., 2012; Szyper-Kravitz et al., 2005).

O eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HPA) é uma das principais vias do sistema neuro-imunoendócrino e está envolvido em muitos processos vitais, incluindo homeostasia metabólica e energética. Adicionalmente o eixo HPA, uma vez que pode sofrer regulação de mediadores inflamatórios, principalmente pelas citocinas TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-10, pode ser considerado um modulador imune primário. A Figura 4 sintetiza os eventos que ocorrem durante a inflamação. Inicialmente o

hipotálamo produz o fator liberador da corticotrofina (CRF) e vasopressina, que induzem a hipófise a secretar ACTH, que finalmente estimula a produção de GCs pela adrenal (Mellmed, 2010).

Figura 4. Regulação do eixo HPA durante o estresse inflamatório. Adaptado de (Crispin et al., 2010; Gong, R., 2012)

Os CGs endógenos modulam várias respostas fisiológicas, tais como o metabolismo da glicose, atividade cardiovascular, alterações

comportamentais. Com relação à reações imunes, podem controlar o infiltrado leucocítico através do controle da expressão de moléculas de adesão, da permeabilidade vascular, da secreção de citocinas, das atividades fagocitárias e microbidas (Cavalcanti et al., 2007).

Em 1989, pela primeira vez demonstrou-se que ratos após a indução de artrite por meio da injeção de peptídeoglicano da parede celular de estreptococos apresentavam menores respostas plasmáticas de ACTH e corticosterona, demonstrando a importância do eixo HPA como um importante fator de risco para a suscetibilidade e severidade da artrite inflamatória em linhagens de ratos propensas a doença (Sternberg et al., 1989).

Desde então, deficiência de resposta do eixo HPA foi demonstrada em diversos modelos experimentais e em doenças inflamatórias e auto-imunes humanas, incluindo AR (Silverman; Sternberg, 2008), fibromialgia (Parker; Wessely; Cleare, 2001), doença de Crohn (Stasi; Orlandelli, 2008), esclerose múltipla (Gold et al., 2005) e condições alérgicas (Buske-Kirschbaum, 2009). O aumento da suscetibilidade inflamatória pode estar relacionada a deficiências em qualquer um dos níveis do eixo HPA, levando a alterações globais como a doença de Addison (hipocortisolismo). Além disso, alterações locais nos receptores de CG levam a um estado de resistência ao esteroide, que impedem as células e tecidos do corpo de responder adequadamente ao estímulo inflamatório (Silverman, Marni N.; Sternberg, Esther M., 2012).

Dessa forma, falhas de comunicação entre um ou mais atores do sistema imune-neuroendócrino podem acarretar no agravamento de

doenças, como o LES e doenças renais (Abeyagunawardena; Hindmarsh; Trompeter, 2007; Jara, 2011; Wilder, 2002).

Diferentes estudos, em humanos e animais, validam a existência de respostas atenuadas do eixo HPA para diferentes estímulos no LES (Mok; Lau, 2003a). Um estudo em mulheres com LES ativo sem tratamento mostrou que os níveis de cortisol estavam significante menores, em resposta a hipoglicemia induzida por insulina, quando comparados com mulheres saudáveis (Rovensky et al., 1998). Em animais com síndrome semelhante ao LES humano (NZB_XW_{F1} e MRL_{lpr/lpr}) observa-se que, apesar dos níveis basais da corticosterona sérica estarem elevados, a resposta de GCs após a injeção de IL-1_{α/β} foi menor que a observada em animais controle. Simultaneamente, a concentração de ACTH no soro destes animais manteve-se normal, indicando uma resposta anormal das adrenais via eixo HPA (Lechner et al., 2000).

Além das alterações neuro-imunoendócrinas, outros sistemas reguladores neuronais parecem estar alterados no LES. Observa-se produção descompensada de norepinefrina e epinefrina em pacientes lúpicos, bem como aumento da resposta do sistema nervoso simpático, uma vez que ocorre aumento dos níveis plasmáticos do neuropeptídeo Y (Harle et al., 2006; Huang et al., 2008; Shalimar et al., 2006). Os neuropeptídeos periféricos como a substância P, peptídeo intestinal vasoativo e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina também parecem estar hiperexpressos no LES (Bracci-Laudiero et al., 1998; Liu et al., 2007).

Atualmente observa-se que as doenças renais também podem apresentar distúrbios do eixo HPA. A inflamação crônica parece estar associada à resistência a GCs, uma vez que pacientes nefropatas acabam por apresentar efeitos cushingóides antes de obter o efeito terapêutico (Wallace, D.; Hahn, 2012). De fato, outros autores demonstram que pacientes com NL têm menor expressão e mutações nos receptores de GC presentes em células mononucleares (Jiang et al., 2001). Além disso, pacientes lúpicos apresentam maior frequência de linfócitos com alta atividade da glicoproteína P, responsável por transportar esteroides para fora do citoplasma (Lu et al., 2008). Sugere-se ainda, que crianças em SN com grave supressão do eixo HPA, sejam mais propensas à recidiva da doença (Abeyagunawardena et al., 2007). Dados epidemiológicos mostram que a maioria dos pacientes com glomeruloesclerose segmentar focal (40-70%) seja esteroide-resistente (Canetta; Radhakrishnan, 2013; Colquitt et al., 2007). Em pacientes com SN foram observadas alterações em genes relacionados à eliminação intracelular de esteroides (Choi et al., 2011).

Outras alterações do eixo HPA são verificadas em relação às concentrações plasmáticas do MSH em doenças renais. Pacientes em diálise apresentam aumento plasmático de β -MSH não relacionado ao aumento de pigmentação epitelial ou ao grau de lesão renal (Smith, A. G. et al., 1975). Estudos posteriores demonstraram que pacientes dialíticos, particularmente indivíduos com endotoxemia sem uso de corticoides, apresentam aumento dos níveis de α -MSH. É importante frisar que, verificou-se uma correlação inversa entre os níveis de IL-6 e α -MSH

nesses pacientes, indicando um papel de regulação do α -MSH sobre mediadores inflamatórios (Airaghi et al., 2000).

Alterações dos níveis de α -MSH são também descritos em doenças autoimunes. Pacientes com AR e artrite juvenil têm níveis elevados de α -MSH no líquido sinovial, mas não no plasma. Adicionalmente uma maior concentração de α -MSH é encontrada na membrana sinovial e está correlacionada com o grau de inflamação (Getting et al., 2009).

Na esclerose múltipla, níveis baixos ou indetectáveis de α -MSH foram encontrados em 2/3 dos pacientes (Sandyk; Awerbuch, 1992). Outro estudo demonstrou que pacientes com esclerose múltipla mais grave apresentavam níveis de α -MSH mais altos. (Catania et al., 2000) Pacientes com vitiligo apresentaram baixos níveis séricos de α -MSH, o que pode indicar uma condição de tolerância periférica desta doença autoimune (Pichler et al., 2006). Em pacientes psoriásicos e com alopecia areata foi observado aumento da expressão de α -MSH na epiderme (Kim, H. S. et al., 2006; Kim, J. E. et al., 2007).

Alterações nos níveis de α -MSH circulantes são também observados em outras condições fisiológicas. Durante a gravidez ocorre aumento progressivo na concentração plasmática de α -MSH (tolerância maternal) (Clark, D. et al., 1978). Em contrapartida, ocorre diminuição com o envelhecimento (imunossenescência) (Catania et al., 1998; Srinivasan et al., 2005). No humor aquoso, local privilegiado imunologicamente para prevenir inflamação local, foi observado que α -MSH possui efeito tolerinérgico (Taylor, A. W.; Lee, 2010; Taylor, A. W.; Streilein; Cousins, 1992).

Em conjunto estas observações sugerem que, na vigência de uma reação inflamatória, possa ocorrer um aumento da concentração de α -MSH sérico para neutralizar a ação dos diferentes mediadores inflamatórios. Acredita-se que, quando este aumento não ocorre ou é insuficiente para frear a ação de mediadores inflamatórios, o processo de doença é mais grave. Dessa forma, o tratamento com α -MSH sintético poderia modular o eixo HPA e conseqüentemente o sistema imuno-neuroendócrino, garantindo a homeostasia e auxiliar no tratamento de pacientes com enfermidades inflamatórias (Catania et al., 2000).

1.3 α -MSH, UMA MELANOCORTINA COM PROPRIEDADES IMUNOMODULADORAS

No final da década de 70 demonstrou-se que as melanocortinas ($\alpha/\beta/\gamma$ -MSH, ACTH, CLIP, endorfinas e β -lipotropina) são originadas a partir de um único pró-hormônio precursor, a pro-opiomelanocortina (POMC) (Bertolini; Tacchi; Vergoni, 2009). A POMC e o MSH são peptídeos extremamente conservados evolutivamente, éxons para eles são encontrados na hipófise de peixes ágnatos (Nozaki et al., 1995; Takahashi et al., 1995). A Figura 5 ilustra a produção do α -MSH, resumidamente ocorre quebra proteolítica da POMC pelo pró-hormônio convertase 1 (PC1) gerando o ACTH, posteriormente a PC2 cliva os primeiros 14 aminoácidos da porção

N-terminal do ACTH e por fim ocorre clivagem pela carboxipeptidase, amidação e acetliação do peptídeo resultando no α -MSH (ACTH₁₋₁₃)

(Millington, 2006; Nery; Castrucci, 1997).

Figura 5. Síntese de peptídeos derivados da POMC na hipófise (painel A). O éxon 2 codifica a sequência sinal e somente o éxon 3 transcreve a proteína POMC bioativa. Em B, homologia entre as diferentes melanocortinas. *adaptado de (Brzoska et al., 2008; Lindskog, J. A., 2012)*

Até hoje cinco diferentes receptores de melanocortinas (MCR) foram clonados (MC1R/2, 3, 4 e 5R) e os resíduos His-Phe-Arg-Trp presentes nas melanocortinas parecem ser utilizados para a ativação dos mesmos (Dores, 2009). Os MCRs são os menores receptores da superfamília

dos receptores acoplados a proteína G com sete domínios transmembrânicos, além disso, são os únicos que possuem agonistas e antagonistas endógenos (agouti e a proteína relaciona a agouti) (Catania et al., 2004).

Todos esses receptores apresentados na tabela 3, já foram descritos em espécies de mamíferos em diversos tipos celulares de regiões hipotalâmicas e periféricas, como (Arnason et al., 2013; Cone, 2005; Getting, 2006; Gong, R., 2012; Kadekaro et al., 2003; Plantinga et al., 1992; van der Kraan et al., 1999). A expressão destes receptores é controlada por mediadores endógenos e exógenos (CRF, melatonina, citocinas pró-inflamatórias, luz UV, agentes microbianos e outros) (Abdel-Malek, 2001; Bohm; Schiller; Luger, 2006; Luger, T. A., 1998; Luger, Thomas A., 1999; Luger, T. A.; Brzoska, 2007; Valverde et al., 1995). Até o momento o MC1R é descrito como receptor de maior afinidade para α -MSH em camundongos, enquanto o MC2R só é ativado pelo ACTH e está relacionado diretamente com a produção de cortisol pelas adrenais (Brzoska et al., 2008).

Tabela 3. Receptores para melanocortinas e seus efeitos biológicos.

Receptor	Principais locais de expressão	Agonista e afinidade	Efeito biológico
MC1R	SNC, melanócitos, testículos, glândulas epidérmicas, células endoteliais, podócitos, fibroblastos, neutrófilos, células dendríticas, monócitos, linfócitos e macrófagos.	NDP-MSH > α -MSH $\geq$ ACTH > β -MSH > γ -MSH	Pigmentação, antipirético, imunidade antimicrobiana, respostas anti-inflamatória, imunomodulação.
MC2R	Adipócitos, rins, adrenais, osteoblastos.	Somente ACTH	Estereoidogênese, proteção óssea.
MC3R	SNC, rins, placenta, trato gastrointestinal, pâncreas, linfócitos B, macrófagos.	NDP-MSH > γ -MSH $\geq$ ACTH $\geq$ α/β -MSH	Homeostasia energética, resposta anti-inflamatória, imunomodulação, comportamental.
MC4R	SNC, rins	Igual ao MC1R	Homeostasia energética, regulação do apetite, antipirético e comportamento sexual.
MC5R	Rins, glândulas exócrinas, linfonodos, leucócitos, tecido adiposo e muscular.	Igual ao MC1R	Modulação de funções exócrinas e imunomodulação

Os estudos relacionados à estrutura-função das melanocortinas resultaram na síntese de um análogo mais potente, resistente a degradação proteolítica e com atividade biológica prolongada, o [Nle(4),D-Phe(7)]-MSH ou NDP-MSH, resultante da substituição da metionina na posição 4 pela norleucina, um aminoácido mais estável e pouco sensível a oxidação, e da l-fenilalanina na posição 7 pela d-fenilalanina, um estereoisômero que estabiliza a molécula na conformação reversa (Gonindard et al., 1996). Tais alterações, dependendo do ensaio empregado, tornaram o NDP-MSH de 10-1000 vezes mais ativo que o α -MSH. Essa nova molécula tem uma melhor estabilidade e a biodistribuição *in vivo*, com meia-vida após injeção subcutânea variando entre 45-100 minutos versus 20-25 minutos do peptídeo nativo (Castrucci et al., 1984; Sawyer et al., 1993; Ugwu et al., 1997).

O α -MSH, originalmente identificado por seus efeitos na dispersão da melanina na epiderme de vertebrados inferiores, a partir dos estudos realizados pelo professor Ferrari e demais pesquisadores, se mostrou com funções extra pigmentação. Dentre elas a de agente anti-inflamatório e imunossupressor (Bertolini et al., 1986; Ferrari, 1958). O α -MSH foi utilizado com sucesso para evitar a rejeição de aloenxertos, prolongando a sobrevivência do órgão em modelo de transplante cardíaco (Gatti et al., 2002). Sua capacidade de reduzir a febre induzida por pirógenos é 20.000 a 25.000x superior à do paracetamol (Murphy; Richards; Lipton, 1983). Devido a essas características, excelentes resultados tolerinérgicos e anti-inflamatórios

foram obtidos com a aplicação do α -MSH em estudos experimentais de inflamação crônica e aguda (Brzoska et al., 2008).

Acredita-se que as principais vias de sinalização celular mediadas pelas melanocortinas seja por meio de receptores MC1R e MC3R em tecidos periféricos e pelo MC4R no SNC (figura 6). Os MCRs estimulam a via de transdução de sinal através da ativação da adenilato ciclase. Após a ativação dos receptores ocorre aumento adenosina monofosfato cíclica (AMPc), ativação da proteína quinase dependente de AMPc (PKA) e proteção da I κ B α da fosforilação, que impede a translocação do fator de transcrição nuclear (NF κ B). Paralelamente a ativação dos receptores, ocorre inibição da enzima glutathiona peroxidase (GPx) e a PKA fosforila a proteína ligante do elemento de resposta ao AMPc (CREB), que atua no núcleo modulando a transcrição de fatores inflamatórios (Catania; Lonati; Sordi; Carlin; et al., 2010; Daniels et al., 2003; Delgado; Ganea, 2008; Hata; Hori; Takahashi, 2003; Haycock et al., 2000; Newton et al., 2007; Smalley, K.; Eisen, 2000; Smalley, K. S.; Eisen, 2002; Yoon et al., 2008; Yoon et al., 2003a). Outras evidências sugerem a utilização de vias intracelulares alternativas, caso a via dominante do AMP cíclico esteja bloqueada. Nessas condições o α -MSH pode sinalizar via fosfolipase C (PLC), pela ativação do inositol trifosfato com aumento do Ca²⁺ e também pela via diacilglicerol e ativação da PKC, levando a ativação ou inibição de fatores de transcrição. Outros trabalhos demonstram atenuação da fosforilação de p38 MAPK e posterior diminuição da ativação da quinasse ativada por estresse, JNK3 (Yoon et al., 2003b).

Figura 6. Modelo da sinalização dos receptores MCRs após a ligação do α-MSH. A AC ativa a PKA, que fosforila o CREB. A interação com a cascata da (MEK/MAPK) suprime a degradação do IκB, modulando a transcrição de genes inflamatórios. A ativação de PLC ativa o a via do fosfato inositol/Ca²⁺/diacilglicerol levando à ativação ou inibição de fatores de transcrição. Adaptado de (Catania, 2010)

A tabela 4 resume alguns dos efeitos anti-inflamatórios verificados *in vitro*. Estes parecem estar relacionados à diminuição do número de linfócitos, inibição/ativação de células dendríticas, inibição da migração neutrofílica, aumento de células T reguladoras, aumento dos níveis de IL-10, supressão de mediadores pro-inflamatórios como IL-1β, IL-6, IL-12 e TNF-α, Gro-α, IFN-γ, óxido nítrico (NO), prostaglandinas (PGE₂) bem como da expressão de COX-2. Além disso, observa-se que o neuropeptídeo reduz a expressão de moléculas de adesão (ICAM-1,

VCAM, E-selectina, P-selectina), bem como moléculas co-estimulatórias (CD86 e CD40), anexina A1 e moléculas de histocompatibilidade de classe I (MHC-I) (Becher et al., 1999; Bhardwaj, R. et al., 1997; Bhardwaj, R. S.; Luger, 1994; Bhardwaj, R. S. et al., 1996; Bohm et al., 1999; Brzoska et al., 1999; Brzoska et al., 2008; Cannon et al., 1986; Caruso et al., 2004; Cooper et al., 2005; Cragolini et al., 2006; Grabbe et al., 1996; Luger, T. A.; Brzoska, 2007; Luger, T. A. et al., 2000; Mandriks, I.; Muceniece, R.; Wikberg, J. E., 2001; Manna; Sarkar; Sreenivasan, 2006; Min et al., 2011; Muceniece et al., 2003; Muceniece et al., 2004; Muceniece et al., 2006; Namba et al., 2002; Patel; Leoni; et al., 2010; 1998; Scholzen, T. et al., 1998; Scholzen, T. E.; Brzoska; Kalden; Hartmeyer; et al., 1999; Scholzen, T. E.; Brzoska; Kalden; O'Reilly; et al., 1999; Scholzen, T. E. et al., 2007; Scholzen, T. E. et al., 2003; Sunderkotter et al., 1999; Taherzadeh et al., 1999; Taylor, A.; Namba, 2001; Taylor, A. W., 2003; 2005; Taylor, A. W.; Streilein; Cousins, 1994).

Tabela 4. Efeitos anti-inflamatórios do α -MSH *in vitro*. Adaptado de (Granstein, R.D.; Luger, T.A., 2009)

	Efeito
Citocinas	
- TNF α	Inibição
- IL-1 β	Inibição
- IL-6	Inibição
- IL-8	Inibição
- Gro α	Inibição
- IFN γ	Inibição
- IL-4	Inibição
- IL-12 (p70)	Inibição
- IL-10	Estimulação
Outros mediadores	
- iNOS	Inibição
- NO $_2^-$	Inibição
- Neopterina	Inibição
- Histamina	Inibição (camundongos) Estimulação (Humanos)
- PGE	Inibição
- PGF $_2$	Inibição
Moléculas de adesão	
- ICAM 1	Inibição
- VCAM	Inibição
- E-selectina	Inibição
Moléculas Co-estimulatórias	
- CD11b	Inibição
- CD86	Inibição
- CD80	Inibição
-CD40	Inibição
-CD14	Inibição
Receptores do tipo Toll (TLR)	
TLR3, 4, 7, 9	Inibição
Migração Neutrófila	Inibição (CXCR)
Apresentação antigênica	Inibição
Células T supressoras/reguladoras	Estimulação
Produção de IgE	Inibição

1.4 APLICAÇÕES DO α -MSH EM MODELOS EXPERIMENTAIS DE DOENÇAS AUTO-IMUNES E INFLAMATÓRIAS

O α -MSH e seus análogos se mostraram bons agentes anti-inflamatórios em diferentes modelos experimentais. Injeções subcutâneas (SC) ou intravenosa (IV) de NDP-MSH reduziram os níveis circulantes de IL-1 e TNF- α em sépsis induzida por LPS (Gonindard et al., 1996). Adicionalmente, demonstrou-se que em modelo de peritonite/endotoxemia induzida por ligação cecal, a administração IV de α -MSH (100 μ g) foi tão eficaz quanto à de gentamicina (Maaser et al., 2006). Independente da via de administração, o α -MSH reduziu a inflamação cutânea (Denko; Gabriel, 1985), reprimindo a sensibilização e a resposta imune (Rheins et al., 1989). Estudos utilizando α -MSH IV (75 μ g/kg) mostraram que o peptídeo induz tolerância hapteno-específica (Dai; Streilein, 1997), que pode ser suprimida através da aplicação de ACs contra IL-10 ou de um antagonista sintético do α -MSH. (Grabbe et al., 1996).

Em modelo de vasculite cutânea induzida em camundongos através de injeções SC de LPS, a administração intraperitoneal (IP) de 25 μ g de α -MSH reduziu as lesões hemorrágicas e inibiu a expressão de E-selectina e VCAM-1 (Scholzen, T. E. et al., 2003). Em modelo de doença inflamatória intestinal induzida pela ingestão de solução de dextran sulfato em camundongos, a administração IP de α -MSH (50 μ g) duas vezes ao dia, reduziu em 80% o número de animais que apresentavam sangue nas fezes, a perda de peso e a produção de TNF α e NO (Rajora et al., 1997).

Dentre os efeitos anti-inflamatórios do α -MSH salientam-se o anti-artrítico. A administração de 50 μ g de α -MSH IP, duas vezes ao dia, foi tão eficaz quanto a prednisolona (100 mg/Kg), em reduzir os sinais clínicos e histológicos da artrite induzida por adjuvante em ratos (Ceriani et al., 1994). Recentemente demonstrou-se que camundongos com artrite induzida por soro K/BxN e posteriormente tratados com 400 μ g do agonista seletivo do receptor MC3R (D[Trp8]- γ MSH) tiveram atenuação da doença (Patel; Bombardieri; et al., 2010). Além disso, em gota induzida em camundongos por injeção IP de cristais de urato de sódio, o tratamento com 0,01 mg/kg SC de NDP-MSH reduziu a migração neutrofílica peritoneal e a produção de KC, IL-1 β e TNF α (Getting et al., 2006).

Em modelo de uveíte autoimune induzida em murinos com a proteína ligante do fotoreceptor da retina e adjuvante, a administração de α -MSH (100 μ g/animal IP) reduziu o dano ocular da mesma maneira que o tratamento com dexametasona (2,0 mg/Kg) (Edling et al., 2011). Adicionalmente, em modelo de encefalomielite autoimune, induzida com o peptídeo protelipídico humano + adjuvante completo e toxina pertussis, a administração de α -MSH (50 μ g IP) resultou em diminuição da paralisia dos animais, menor produção de IFN- γ e aumento na produção de TGF- β (Taylor, A. W.; Kitaichi, 2008).

Em modelo experimental de ooforite autoimune, induzida com homogenatos de ovários de ratos + adjuvante completo de Freund. A administração de α -MSH intracerebroventricular (1 μ g/ μ L) não foi capaz de bloquear o desenvolvimento da doença, contudo reduziu a liberação de

hormônio luteinizante durante o diestro (Berberian et al., 2006). Previamente os mesmos pesquisadores demonstraram que a administração de α -MSH reduzia a liberação de NO durante o estro e diestro e também a progesterona no proestro (Casalino-Matsuda; Durando; Celis, 2002).

Além de atuar como anti-inflamatório, existem evidências que o α -MSH também possui efeitos antifibrogênicos/antifibrótico em modelos experimentais de fibrose. Em modelo de esclerodermia induzido por injeções SC de bleomicina, a administração de α -MSH (5,0 μ g/animal SC) resultou em diminuição da fibrose da pele, com redução da marcação de procolágeno tipo I, colágeno resistente a pepsina e aumento da expressão de enzima anti-oxidativa superóxido dismutase 2 e heme oxigenase 1 (Kokot et al., 2009). Em modelo de lesão pulmonar aguda, induzido em ratos por injeção intratraqueal de bleomicina, a administração de NDP-MSH (100 μ g/animal IP) foi capaz de reduzir o edema, lesão da parede alveolar, infiltrado inflamatório e a liberação de NO (Colombo et al., 2007). Posteriormente verificou-se no mesmo modelo de lesão, mas prolongada por 14 dias, que a aplicação intraperitoneal de um análogo do α -MSH (1,25 mg/kg) reduziu o dano renal, a perda de peso, a expressão de procolágenos I e II, a produção de hidroxiprolina, proliferação de miofibroblastos, proliferação leucocítica para o pulmão, a produção de TNF α , IL-6 e TGF β (Xu et al., 2011).

Em modelo murino de disfunção de múltiplos órgãos decorrente da inflamação generalizada induzida por injeções de LPS e zymozan, a administração de NDP-MSH (340 μ g/kg IP) reduziu os níveis de TNF α , aumentou a expressão de IL-10, aliviou o infiltrado inflamatório, estenose e

necrose hepática, também reduziu o infiltrado, congestão vascular e edema intersticial pulmonar o que aumentou a sobrevida dos animais (Bitto et al., 2011).

1.5 O USO DE MELANOCORTINAS NO TRATAMENTO DE PATOLOGIAS RENAIAS

O uso de melanocortinas na clínica médica não é inédito, no início da década de 1950 o ACTH, por suas propriedades esteroideogênicas, foi utilizado com agente anti-inflamatório para o tratamento de doenças reumáticas e para SN infantil. Seu uso, entretanto, foi rapidamente descontinuado devido ao efeito cushingóide e a facilidade na produção/administração da prednisona (Barnett, 1952; Frankel; Groen; Hellinga, 1950; Gong, R., 2012; Schwartz, M.; Sonne, 1950; Schwartz, T. B., 1953; Waldman; Austin, 2012).

Acidentalmente, no final da década de 1990, Berg e colaboradores ressuscitaram o uso ACTH, com o análogo do neuropeptídeo (ACTH₁₋₂₄) usado para reduzir lipídeos em pacientes com nefropatia membranosa (NM) idiopática, contudo, os pacientes tratados apresentaram diminuição de 90% da excreção de albumina urinária e um aumento de 25% na taxa de filtração glomerular (Berg; Nilsson-Ehle; Arnadottir, 1999). A seguir, verificou-se que seu uso também foi benéfico para pacientes com glomerulonefrite mesangioproliferativa/mesangiocapilar e glomérulo-esclerose segmentar focal (Berg; Arnadottir, 2004). Subsequentemente um pequeno estudo clínico

multicêntrico demonstrou que os resultados do tratamento de pacientes com NM idiopática apresentaram respostas similares, tanto com uso de metilprednisolona alternada com agentes citotóxicos, quanto com o ACTH₁₋₂₄ sintético (Synacthen®) em terapia inicial (Ponticelli et al., 2006).

Propriedades antiproteinúricas e renoprotetoras também foram relatadas em outros dois estudos clínicos que utilizaram o neuropeptídeo nativo ACTH₁₋₃₉ (HP Acthar Gel®, um extrato hipofisário suíno altamente purificado em formulação gel). Dentre os 36 pacientes randomizados somente uma paciente com NL classe V foi incluída e respondeu transitoriamente à terapia, com recidiva assim que o tratamento foi interrompido (Bomback et al., 2012; Bomback et al., 2011).

Apesar dos efeitos benéficos, efeitos colaterais semelhantes aos dos corticoides são associados ao uso de ACTH. Estes incluem, tontura, intolerância à glicose, diarreia, alterações de comportamento e humor, aumento do apetite, ganho de peso, pigmentação epidérmica e efeitos cushingóides (edema, aumento da pressão arterial e osteoporose) (Lindskog, J. A., 2012).

Os exatos mecanismos pelo qual o neuropeptídeo ACTH atua no controle da proteinúria ainda não estão completamente esclarecidos. Acredita-se que sejam extra-esteroidogênicos, uma vez que a concentração utilizada nos ensaios clínicos estimulou uma baixa produção de cortisol endógeno, incapaz resolver crises nefróticas (Lindskog, J. A., 2012).

Posteriormente demonstrou-se que o ACTH atua por outras vias. É capaz de reduzir a produção de autoanticorpos contra o receptor da

fosfolipase A₂, o principal antígeno alvo na NM idiopática. Adicionalmente, foi sugerido que a ACTH possa ter seus efeitos renoprotetores através do α -MSH, o peptídeo derivado do ACTH, correspondente aos primeiros 13 aminoácidos da porção N-terminal, que não ativa a produção de cortisol endógeno (Beck LH, 2009; Fervenza, 2012).

Um estudo em modelo de NM demonstrou que, ratos com nefrite de Heymann induzida apresentaram redução da proteinúria quando tratados com α -MSH e não com ACTH. Nesse estudo verificou-se que não existe expressão do receptor exclusivo para o ACTH no tecido renal. Juntos esses resultados sugerem que o efeito renoprotetor das melanocortinas possa ocorrer via interação com os receptores para α -MSH nos podócitos (Lindskog, A. et al., 2010). Essa é uma possível explicação para a resposta satisfatória de pacientes esteroide resistentes ao tratamento com ACTH (Fervenza, 2012).

De fato, o α -MSH vem sendo apontado como um importante imunorregulador, capaz de contribuir para o ajuste fino do processo inflamatório (Granstein, Richard D.; Luger, Thomas A., 2009; Kastin, 2006; Lajtha; Tettamanti; Goracci, 2007). Os papéis clássicos do α -MSH em mamíferos são pigmentar e cronobiológico. Há algumas décadas verificou-se um papel imunorregulador em modelos *in vitro* e *in vivo* (Castrucci et al., 1997; Cone, 2005; Cragnolini et al., 2006; Evans-Brown et al., 2009; Lassalle et al., 2003). Além disso, o neuropeptídeo vem sendo empregado com sucesso em tratamento de animais com nefropatia, incluindo injúria isquêmica, nefrotoxicidade, obstrução ureteral e NM (Gong, R., 2012).

Atualmente sugere-se que interações neuro-imunoendócrinas desempenhem importantes papéis na patogênese lúpica, por exemplo: a diminuição na resposta neuroendócrina pré-mórbida pode predispor a maior suscetibilidade para o desenvolvimento do LES e diferenças no número de receptores ou a sensibilidade para GC alteram o curso da doença e também do próprio tratamento. (Wallace, D.; Hahn, 2012). Desse modo, um estudo na interface desses três sistemas pode contribuir para a compreensão/tratamento da doença. Sugere-se, portanto que a utilização do neuropeptídeo α -MSH possa ser benéfica para o tratamento de pacientes com LES, uma vez que o α -MSH não está associado à esteroidogênese e ainda assim tenha efeitos imunossupressores e renoprotetores.

1.6 APLICAÇÕES DO α -MSH EM MODELO DE DOENÇAS RENAIIS

As primeiras evidências que relatam a participação do α -MSH no tecido renal foram realizadas na década de 70. A administração do neuropeptídeo radiomarcado teve acúmulo nos rins (Dupont et al., 1975). Posteriormente demonstrou-se expressão do MC1R na medula renal externa (Lee, Y. S.; Park; Chung, 2008) e os MC3R/4/5 foram encontrados em regiões corticais e medulares (Chhajlani, 1996; Fathi; Iben; Parker, 1995; Lee, Y. S. et al., 2008; Ni et al., 2006). Recentemente, demonstrou-se expressão exclusiva do MC1R

nos podócitos, enquanto não foram detectadas marcações para os outros receptores em camundongos (Lindskog, J. A., 2012). Entretanto em tecido humano foi detectada expressão de MC1/4R nos podócitos, endotélio glomerular, células mensangiais e epiteliais tubulares (Lindskog, A. et al., 2010). Ressalta-se que nenhum estudo até o momento detectou a expressão de MC2R no tecido renal, o receptor exclusivo para ACTH, evidenciando ainda mais a importância do α -MSH no efeito renoprotetor. A figura 7 resume as possíveis vias de atuação no controle de nefropatias mediadas pelo α -MSH.

Figura 7. Mecanismos de eficácia terapêutica do α -MSH em nefropatias. A expressão dos receptores de melanocortinas é cortical e medular. Não foi demonstrada a expressão de MC2R no rim. Adaptado de (Gong, R., 2012; Taraphder, 2013)

A participação do α -MSH na regulação do metabolismo hidromineral e cardiovascular tem sido observada por diversos pesquisadores. A privação de água durante 12 horas e posterior injeção de solução salina hipertônica por via oral ou venosa reduziu a marcação do α -MSH na hipófise, sugerindo secreção compensatória em resposta a elevação da concentração salina no organismo. Injeções IP de α -MSH produzem efeito natriurético e caliurético em ratos normais, hipofisectomizados ou adrenalectomizados, indicando ação independente da hipófise/adrenal e ação direta nos rins (Orias; McCann, 1970; 1972a; 1972b). Em hamsters adrenalectomizados, a injeção de α -MSH tem também efeito diurético, natriurético e caliurético (Hradec; Horky, 1979). Um estudo posterior mostrou que a injeção intraperitoneal de α -MSH (3,0 e 9,6 nmol) apresenta efeito diurético e aumenta significativamente a excreção de sódio e potássio (PicancoDiniz et al., 1997). Além disso, demonstrou-se que em camundongos normais conscientes e monitorados por radiotelemetria, a administração de NDP-MSH (0,3 mg/Kg IP) provoca aumento da pressão arterial e da frequência cardíaca em até 120 minutos após a injeção (Rinne et al., 2012).

Além de efeito anti-inflamatório, um número crescente de trabalhos destaca a proteção do α -MSH no controle da lesão renal aguda. Camundongos submetidos à isquemia renal transitória por oclusão bilateral dos pedículos renais e tratados com α -MSH (25 μ g/animal IV) antes ou após a oclusão, apresentaram aumento da sobrevivência, diminuição dos níveis de ureia e creatinina plasmática, contenção da necrose tubular, infiltrado neutrofílico, congestão capilar e redução da expressão de IL-8,

ICAM-1 e da liberação de NO (óxido nítrico) e iNOS (óxido nítrico sintase indutível). Destaca-se que o tratamento com α -MSH teve efeito protetor similar ou mais efetivo, quando comparado com a aplicação de fator de crescimento insulina-like I, anticorpos anti-ICAM-1 ou oligonucleotídeos antisense para iNOS (Chiao et al., 1997b). Esses achados foram observados mesmo na ausência de neutrófilos. Camundongos “knock-out” para ICAM-1 e com lesão renal aguda, quando tratados com α -MSH tiveram igual redução do dano renal, o que sugere uma participação direta do hormônio nos túbulos renais (Chiao et al., 1998).

Em modelo de oclusão bilateral das artérias renais o α -MSH preveniu lesões também no pulmão (Deng et al., 2004). Ratos submetidos à oclusão bilateral das artérias renais ou dos ureteres e tratados com α -MSH (50-100 μ g IV) de, apresentaram redução da apoptose, melhora na taxa de filtração glomerular, prevenção da redução da expressão de aquaporinas 1, 2 e 3 e dos transportadores de sódio (NH3, BSC-1 e Na, K-ATPase) (Gong, H. et al., 2004; Kwon et al., 1999; Kwon et al., 2000; Li et al., 2006)

Em modelos de nefrectomia e posterior isquemia/reperfusão da artéria remanescente, o tratamento com α -MSH (50 μ g IP) preveniu a elevação de ureia e creatinina plasmática, do infiltrado leucocítico, da apoptose e da expressão de ICAM-1 e de FAS e FAS ligante (Jo et al., 2001). Mais recentemente, empregando o mesmo modelo em suínos, demonstrou-se melhora na taxa de filtração glomerular e diminuição da creatinina plasmática após a administração diária do AP214, um super análogo do α -MSH (200 μ g/kg IV) (Simmons et al., 2010)

Em modelo de lesão renal aguda induzida por sépsis, camundongos tratados com AP214 (10 µg IV) ou α-MSH (71µg/kg SC), apresentaram aumento da sobrevivência, diminuição de creatinina plasmática, do dano hepático e tubular, prevenção da neutropenia, hipotensão e bradicardia. Além disso, o tratamento reduziu a apoptose esplênica, os níveis séricos de TNFα, IL-10 e a ativação do NFκB no rim e baço de maneira dose dependente (Doi et al., 2008b; Si et al., 2013). Ratos submetidos a transplante renal e tratados com 6 doses de α-MSH (150 µg IV) apresentaram menores níveis de creatinina sérica (Deng et al., 2001).

Em modelo experimental de nefrotoxicidade, dois trabalhos indicam a ação renoprotetora do α-MSH. Na nefropatia crônica induzida por ciclosporina, demonstrou-se que o α-MSH (50 µg/animal/dia durante 48 dias IP) reduziu a apoptose tubular e intersticial, atenuou o infiltrado monócítico e a fibrose tubulointersticial. Além disso o tratamento reduziu a expressão de reguladores apoptóticos Bax e TGF-β e aumentou a expressão de fatores anti-apoptose BCL2. Entretanto, a função renal, os níveis de ureia e a creatinina sérica permaneceram elevados (Lee, S. Y. et al., 2004). Em modelo de nefrotoxicidade induzida por gentamicina, os ratos tratados com α-MSH (25 µg IP), embora tenham apresentado redução das lesões histológicas não apresentaram melhora da função renal (Kolgazi; Arbak; Alican, 2007).

Ratos com nefrite de Heymann passiva tratados com α-MSH (10 µg/dia) ou ligante exclusivo para MC1R, apresentaram redução da proteinúria, do estresse oxidativo e da pressão sanguínea. Além disso,

apresentaram melhora na morfologia renal com aumento do número de processos podais (Lindskog, A. et al., 2010).

Apenas um trabalho descreve os efeitos do α -MSH em alguns parâmetros da nefrite em camundongos que desenvolvem lúpus espontaneamente. Nesse trabalho, publicado em uma revista não indexada nas principais bases de dados, a administração de NDP-MSH (5 μ g/animal IP) não foi capaz de mudar o curso da doença. Entretanto, quando foi adicionado cloreto de lítio ao tratamento, houve um aumento da sobrevida e redução da proteinúria e glomerulonefrite (Hart, 1998). Contudo, esse estudo, além de empregar uma baixa dose do neuropeptídeo, utilizou um modelo que não desenvolve muitos dos parâmetros da doença (Perry et al., 2011).

1.7 MODELO MURINO DE LES INDUZIDO POR PRISTANE

O lúpus induzido por drogas (LID), também ocorre em humanos com sintomas semelhante à doença clássica. Entretanto, normalmente ocorre resolução do quadro com a suspensão do medicamento (Mota et al., 2007).

O surgimento mais comum da doença está relacionado com o uso de procainamida e a hidralazina. Recentemente, após a introdução dos medicamentos biológicos, o uso de agentes anti-TNF parece induzir a

doença. Os sintomas podem ser semelhantes aos de LES, havendo comprometimento cutâneo, musculoesquelético, sintomas constitucionais e serosites, porém raramente observa-se comprometimento hematológico grave, neuropsiquiátrico ou renal. (Chang; Gershwin, 2011; Mota et al., 2007). Por outro lado, os modelos de LES induzidos permitem o estudo dos mecanismos envolvidos no estabelecimento da doença (Perry et al., 2011)

Devido à heterogeneidade da doença, estudos em animais que desenvolvam síndromes semelhantes à patologia humana são importantes para a compreensão da doença. Os modelos mais estudados são os espontâneos ou genéticos (NZB_xW)_{F1} e MRL-*Fas*^{lpr}, contudo, esses modelos divergem em alguns aspectos do LES humano (tabela 5). Nos animais B_xW_{F1} verificam-se diferenças no perfil de auto-ACs e ausência de vasculite. A linhagem MRL_{lpr/lpr} diferencia-se por mutação do antígeno Fas e linfoproliferação (Kuhn; Lehmann; Ruzicka, 2005; Pollard, 2006; Wallace, D. J. et al., 2007). Os modelos induzidos por agentes químicos, em especial o pristane, se diferenciam dos demais em função da produção de auto-ACs em quase todas as linhagens de camundongo (Kammer; Tsokos, 1999).

A administração intraperitoneal de 0,5 mL do alcano isoprenóide (2,6,10,14-tetrametilpentadecano, TMPD), conhecido como pristane, em linhagens de camundongos não propensas a doenças auto-imune reproduz o aumento nos níveis de IFN- α/β e gera a produção de auto-ACs em altos títulos, bem como glomerulonefrites mediada por ICs (IgG, IgM glomerular, deposição de complemento aparentemente independente de DNA_{fitá dupla} e IL-6 dependente). Ocorre ainda, hiper celularidade mesangial

encontrada na maioria dos pacientes com LES (Richards et al., 1997; Rose; Mackay,

2006; Satoh et al., 1996; Satoh et al., 1995; Satoh et al., 2000; Shaheen et al., 1999; Zabriskie, 2009).

A exposição intraperitoneal de camundongos ao pristane resulta em inflamação peritoneal crônica caracterizada pela apoptose de células endoteliais e posterior formação tecido linfóide terciário ao redor da gota de óleo, com geração de células T e células dendríticas, produção de quimiocinas, citocinas (IFN- γ , IL-6, IL-12) e autoanticorpos, conforme demonstrado na figura 8 (Reeves et al., 2009).

Tabela 5. Perfis sorológicos e clínicos do LES humano e em modelos animais

Manifestação	LES	Modelos Animais				
		Lúpus Espontâneo		Lúpus induzido quimicamente		
		MRL lpr/lpr	(NZB x NZW)F1	Procainamida	Pristane Balb/cAn	SJL/J
Razão Fêmeas: machos	9:1	M=F 90% de mortalidade em 9 meses	F>M 50% de mortalidade em 8 meses		F>M	F>M Início das mortes com 4 meses
Contribuição genética	HLA classe III Fc γ RIII, TREX1	<i>Lpr</i> e <i>fas</i>	H-2 ^{d/z} , Sles1 Cr2, Ifi202		H-2 ^d	H-2 ^s
Artrite	50% Não- erosiva	Sim erosiva	Não	Sim	Sim (baixa) erosiva	Não
Serosite	30-60%		Não	Sim	raro	raro
Fotosensibilidade	> 50%	Sim	Não	Não	Não	Não
Hepatoesplenomegalia	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim
Hipergamaglobulinemia	Sim	Sim rapidamente	Sim		Sim (3 -5 meses)	Sim
FAN	98%	Sim	Sim (2-3 meses)	Sim	Espicular (2-6 meses)	Citoplasmático (2-6 meses)
Anti-DNA ^{fita dupla}	50-90%	100% (4- 5 meses)	100% (4-5 m) IgG2a/b		38% (6-10 meses)	Sim (após 4 meses)
Anti-Cromatina	50-70%	Sim IgG2a	Sim		60% (3 -5 meses)	Sim
Ensaio <i>Crithidia</i>	Sim	Sim			Sim (7 -8 meses)	Sim
Anti-RNP/sm	10-30% 3-30%	37 - 44% (5 meses)			50-90%	13% (4 meses)
Anti-proteína P ribossômica	10-20%				Não	75-100% (2 - 4 meses) IgM, IgG1e IgG2b
IC glomerular	50-80%	100% rapidamente	100% (rapidamente)	Não	Sim (> 5 meses)	Sim
Proteinúria	Sim	Sim (1 - 3 meses)	Sim (5-7 meses)	Não	Sim	Sim (3-6 meses)
Nefrite	30 - 60%	Proliferativa difusa, intersticial severa (IgG1, IgG2a, IgG3)	Proliferativa progressiva (IgG2a)	Não	Proliferativa focalizada (IgG, IgM e C3)	Sim proliferativa (IgG2a/2b, IgG1, IgG3 IgM e C3) (4-6 meses)
Assinatura IFN-I	Sim	Não	Possível	Não	Sim	Sim

De acordo com os dados da tabela 5, animais inoculados com pristane apresentam macrófagos peritoneais produtores de IL-6 e EP, iNOS, COX2, IL-12p40/p70, IFN- γ e TNF- α (Akaogi et al., 2004a; Chae et al., 2008; Kuroda et al., 2004; Kuroda et al., 2006). Em relação às alterações renais, fêmeas da linhagem SJL/J quando inoculadas apresentam glomérulos 25-30% maiores do que animais controle, proliferação e influxo de células mononucleares bem como aumento da matriz extracelular mesangial. A membrana glomerular basal apresenta aumento de gotas lisossomais PAS-positivas nas células epiteliais tubulares (Calvani et al., 2003a; Lin; Gerth; Peng, 2004; Richards et al., 2001a; Richards et al., 1999; Richards et al., 1998b; Satoh et al., 1996; Savarese et al., 2008).

Estudo recente utilizando o modelo de LES murino induzido por pristane, mostrou que o neuropeptídeo melatonina (1mg/kg/dia, via oral) ministrado após a indução da doença promoveu redução nos títulos de anticorpos IgM anti-DNA_{fit} dupla e anti-histonas, diminuição dos níveis séricos de IL-6 e IL-13 e melhora da lesão renal, similar a observada com os animais tratados com prednisona (Zhou et al., 2010b). Camundongos tratados com anticorpos quiméricos e anti-CD20 tiveram o curso da doença retardado após a administração do óleo (Haas et al., 2010). A literatura, entretanto, é pequena em relação ao efeito do α -MSH nos LES.

Sendo assim, a utilização de um modelo de lúpus induzido, no qual se tem controle do ambiente fisiológico, deve contribuir para uma melhor compreensão da ação do α -MSH como anti-inflamatório.

2.0 OBJETIVOS

O objetivo desse estudo foi avaliar a eficácia anti-inflamatória do α -MSH em modelo experimental de LES induzido por pristane.

3.0 MATERIAL E MÉTODOS

Camundongos de 4-5 semanas de idade foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo da UNICAMP (Balb-C, subtipo An). Todos os animais foram mantidos em gaiolas com água e ração *ad libitum* no biotério climatizado da Disciplina de Reumatologia da FMUSP com temperatura, umidade, fluxo de ar e ciclo de luz controlado (12/12h-claro/escuro). Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina de acordo com o COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal) sob o registro de nº 4318, projeto CAPPesq nº 0612/09.

Uma vez que o estresse interfere no eixo HPA, 14 dias antes dos experimentos os animais foram condicionados ao manuseio e contenção diários. O peso foi mensurado semanalmente para controle das dosagens terapêuticas. A coleta do sangue foi realizada pelo plexo submandibular em animais não anestesiados. Todas as aplicações de ativos e coleta de biomateriais foram realizadas no período da manhã, com intuito de evitar qualquer variação circadiana (Cragolini et al., 2006; Lechner et al., 2000; Lechner et al., 1996). Ao final dos experimentos os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e exsanguinação aórtica.

O descarte dos animais atendeu ao Programa de Gerenciamento de Resíduos do Serviço de Saúde da FMUSP para resíduos do grupo A2 segundo a Resolução RDC nº 306, de 07 de dezembro de 2004 da

Agência Nacional de Vigilância Sanitária e resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA 358 de 29 de abril de 2005.

3.1 MODELO DE LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO

O modelo experimental de LES (SATO; REEVES, 1994) foi induzido em 15 camundongos fêmeas Balb/cAn através de uma injeção IP única de 0,5 mL de pristane (2,6,10,14 tetramethylpentadecane; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) previamente filtrado em membrana 0,22 μ m (Millipore, Billerica, MA, USA). Cinco animais controle receberam igual volume de solução salina 0,9% pela mesma via.

3.1.1 TRATAMENTOS

O super análogo do alfa Hormônio Estimulador de Melanócito [Nle⁴, DPhe⁷]- α -MSH (NDP-MSH; Melanotan-I) (Peptides International, Kentucky, EUA) foi preparado de acordo com indicações do fabricante. Inicialmente foi dissolvido em ácido acético 3% e em seguida salina 0,9% (concentração final de ácido foi de 0,06%, pH=5).

Camundongos com LES induzido por pristane foram alocados aleatoriamente em grupos de 5 ou 10 animais e foram tratados com

solução salina (LES); com o NDP-MSH 1,25 mg/kg/dia IP (LES-MSH). Um grupo controle foi tratado com solução salina (C). O tratamento diário foi realizado por 180 dias entre 8:00 e 10:00 am. Antes do sacrifício os animais foram anestesiados com Xilazina (5mg/Kg) e Ketamina (50mg/Kg) IP. Os animais foram sacrificados por exsanguinação e tiveram os rins perfundidos com solução salina.

3.1.2 QUANTIFICAÇÃO TOTAL DE LEUCÓCITOS

O sangue dos animais foi coletado por punção da veia submandibular nos tempos 0 e 180 dias após o tratamento. A contagem total de leucócitos foi realizada em câmara de Neubauer com amostras de sangue diluído 1:20 com Turk.

3.1.3 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE IGG

Os níveis séricos de IgG foram determinados por ELISA. Microplacas de poço plano (Maxisorp Immunoplate, Nunc, Naperville, IL) foram cobertas com 2,0 µg/mL de anti-IgG F(ab')₂ (Southern Biotechnology, Birmingham, AL) em tampão carbonato a 4°C durante a noite (overnight). Após o período de incubação, foram lavadas com

PBS/tween e bloqueadas com 0,5% de BSA em PBS. Os soros foram adicionados em diluições de 1:15.000 em PBS e encubados por 1h a temperatura ambiente. Após lavagem, foram adicionadas anticorpos específicos anti-camundongo marcados com peroxidase para IgG1, 2a, 2b e IgG3 (diluições 1:7500) (Southern Biotechnology, Birmingham, AL). Após nova lavagem, a revelação da reação foi realizada pela adição de 100 µL do substrato OPD (Sigma) e a reação foi interrompida pela adição de 50 µL de ácido sulfúrico 16%. A densidade óptica foi determinada por espectrofotometria em comprimento de onda de 492nm. Padrões de isotipos de Ig (IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3) (Southern Biotechnology, Birmingham, AL) foram utilizados para ajuste de curva padrão, com concentrações de 15,62 a 1000 ng/mL.

3.1.4. AVALIAÇÃO DOS ANTICORPOS ANTINUCLEARES

Células HEP-2 foram cultivadas em garrafas de vidro com meio 199 (Instituto Adolfo Lutz, Brasil) suplementado com 10% de soro fetal bovino, em estufa a 37°C com 5% de CO₂. Após as células atingirem confluência, foram retiradas pela adição de uma solução de tripsina 0,2% e Versene 0,02%, obtendo-se uma suspensão de células, que foi transferida para lâminas de microscópio. Após 24h, as células aderidas às lâminas foram lavadas com solução Hanks, fixadas com acetona gelada e armazenadas a -20 °C até o uso.

Autoanticorpos nucleares e citoplasmáticos foram detectados por imunofluorescência indireta. As células foram incubadas por 40 min com plasma murino diluído em PBS 1:200, lavadas e incubadas por 30 min com anticorpo anti-IgG de camundongo H + L conjugado com FITC 1:50 (Southern Biotechnology, Birmingham, AL). Após outra lavagem, as lâminas contendo as células foram analisadas sob fluorescência.

3.1.5 DETERMINAÇÃO DE CITOCINAS SÉRICAS POR MULTIPLEX.

O imunoensaio sanduiche baseado em micropartículas fluorescentes foi realizado utilizando os kits Fluorokine MAP mouse multianalyte profile kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) de acordo com as instruções do fabricante para quantificação das citocinas (IL-6, IL-10, IFN γ e TNF- α). Os dados foram coletados usando a versão 3.1.871.0 Xponent Luminex (Luminex, Austin, TX). A análise dos dados foi realizada utilizando o Analyst Milliplex v3.5.5.0 (Vigenetech, Carlisle, Massachusetts, EUA). A fórmula de regressão cinco parâmetros foi utilizada para calcular as concentrações da amostra a partir das curvas padrão. A fluorescência média foi avaliada e os dados foram dados em pg/mL. Amostras de plasma foram diluídas 1:2.

3.2 AVALIAÇÃO DA ARTRITE

A severidade da artrite 180 dias após a inoculação foi avaliada segundo um escore que considera edema, eritema e número de articulações acometidas (Patten et al., 2004). O sistema de pontuação classifica o acometimento de cada pata em: 1- pequeno, 2- moderado, 3- acentuado e 4- grave, sendo portanto o valor máximo de 16 pontos por animal

3.3 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO RENAL

Os animais foram colocados em gaiolas metabólicas individuais para coleta de urina 24 horas. Amostras de urina foram analisadas usando kits para quantificação de proteinúria (Labtest Diagnóstico, Minas Gerais, Brasil). Para estimar a concentração de albumina na urina, 10 mL de urina (1 mg/mL) foram carregados em um gel SDS-PAGE a 10% e posteriormente corado com Coomassie Blue. Padrões de albumina sérica bovina (BSA) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) foram utilizados para ajuste de curva padrão, com concentrações de 0,0625 - 0,5 µg/mL. As bandas foram submetidas à análise densitométrica com o software ImageJ.

3.4 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DO TECIDO RENAL

Os rins retirados foram fixados em formaldeído 4% tamponado e em seguida incluídos em parafina. Para microscopia de luz, cortes de tecido renal (3 μ m) foram coradas com hematoxilina/eosina (H&E) e ácido periódico-Schiff (PAS).

A avaliação do grau de NL induzida foi realizada através da análise da celularidade glomerular e contagem total de núcleos dentro da capsula glomerular, em lamina coradas com H&E (aumento de 400x). Pelo menos 30 glomérulos/lâmina foram avaliados e os resultados foram expressos em número de núcleos por glomérulo.

Adicionalmente, uma avaliação histopatológica cega para o tratamento foi realizada em seções de tecido renal corados pelo ácido periódico-Schiff. O grau de lesão tecidual foi atribuído, de acordo com o escore proposto por Richards (Richards et al., 2001a): 1= somente hiper celularidade focal leve, 2= hiper celularidade mesangial moderada; 3= hiper celularidade endocapilar complexa/com esclerose leve ou necrose; 4= glomerulonefrite proliferativa endocapilar grave com necrose ou formação de crescente. Só foram considerados positivos animais que apresentaram escore maior ou igual a 2.

3.4.1 MARCAÇÕES IMUNOHISTOQUÍMICAS.

Cortes histológicos de quatro μm de espessura foram obtidos a partir de material embebido em parafina e colocados em lâminas previamente preparadas com solução adesiva 2% de 3 amino-propyltriethoxy-silane (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO/USA, cód. A3648). A seguir, os cortes foram desparafinizados com dois banhos de xilol à temperatura ambiente (20 minutos) e foram hidratados em soluções de etanol (absoluto, 95% e 70%) e água corrente durante cinco minutos cada. O bloqueio de peroxidase endógena foi realizado em câmara escura com seis incubações em água oxigenada 3% por 10 minutos cada.

A exposição aos antígenos foi realizada em banho-maria (95° C) no tampão TRIS/EDTA 10mM/1mM pH 9,0 por 25 minutos (Tabela 6). A seguir as lâminas foram lavadas em água corrente e água destilada por cinco minutos e submersas em tampão PBS pH 7,4.

O bloqueio de biotina foi realizado em tecido de baço com bloqueador de biotina/avidina (Dako Cytomation, Carpinteria, CA, USA, cód. X0590), conforme instruções do fabricante. O bloqueio de proteínas inespecíficas do tecido foi feito com incubação em leite desnatado (Molico, Nestlé®) a 10% durante 30 minutos à temperatura ambiente.

As lâminas foram incubadas com os anticorpos primários diluídos em solução de albumina bovina (BSA) fração V (SERVA. 1930) 1% acrescida de azida sódica 0,1% em tampão PBS pH 7.4, overnight a 4°C.

Após duas lavagens das lâminas em PBS por cinco minutos cada, estas foram incubadas com os respectivos sistemas de detecção descritos na tabela 6, seguindo as especificações do fabricante.

A seguir, os sítios de ligações foram revelados com solução cromógena de diaminobenzidina (3,3'-diaminobenzidine, SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO/USA, cód. D5637) 0,05% acrescida de 1,2 ml de água oxigenada 3%. A intensidade da cor foi controlada ao microscópio óptico através dos controles positivos que acompanharam as reações.

Os controles positivos dos antígenos estudados foram: tecido de mama para células com expressão de actina- α de músculo liso; fragmento de baço de camundongo para CD3, IgG e C3 (Fator 3 do sistema complemento); fragmento de placenta para expressão de iNOS e fragmentos de hipotálamo para CRF, MCR e α -MSH. Os controles negativos das reações foram obtidos através da omissão do anticorpo primário, que foi substituído por PBS.

Os cortes processados foram lavados em água corrente por cinco minutos, contra corados com Hematoxilina de Carazzi por 10 segundos, lavados em água corrente, desidratados em etanol e diafanizados em xilol. A montagem das lâminas foi feita com resina Permount (FISHER Scientific, Fair Lawn, NJ/USA, cód. SP15-100).

Tabela 6. Relação de anticorpos primários empregados nas reações de imunohistoquímica.

Anticorpo	Marca/código	Diluição	Sistema de detecção/Marca
Ig de coelho anti- α actina de músculo liso (SMA)	Abcam/ab5694	1:100	EnVision-HRP/ Dako Cytomation
Ig de coelho anti-CD3	Abcam/ab5690	1:100	Advance/Dako Cytomation
Ig de camundongo anti-C3	Santa Cruz Biotechnology/sc-28294	1:50	LSAB-HRP/Dako Cytomation
Ig de coelho anti-iNOS	Pierce Biotechnology/PA5-16855	1:200	EnVision-HRP/ Dako Cytomation
Ig de coelho anti-IgG	Lifespan Biosciences/LS-C59195	1:400	EnVision-HRP/ Dako Cytomation
Ig de coelho anti-CRF	Phoenix Pharmaceuticals/H-019-06	1:100	Advance-HRP/ Dako Cytomation
Ig de coelho anti- α MSH	Phoenix Pharmaceuticals/H-043-01	1:100	LSAB-HRP/Dako Cytomation
Ig de coelho anti-MCR	Antibodies-online/ABIN686287	1:100	Advance-HRP/ Dako Cytomation

3.5 LEITURA DAS LÂMINAS

As lâminas foram arquivadas digitalmente através do scanner digital 3DHistech Pannomaramic Scan (versão de software 1.11.25.0, 3DHistech, Budapeste, Hungria), com objetiva de 20x e expandida para assegurar uma melhor resolução de imagem.

A expressão de α -SMA, CD3, C3, CRF, α -MSH, MC1R, iNOS e IgG foi avaliada nos glomérulos. Todas as marcações foram quantificadas através do software Image-ProPlus 4.1 para Windows (Media Cybernetics, Silver Spring, MD.) através da relação de área corada positivamente pela área glomerular total (μm^2).

Esses procedimentos geraram um arquivo que contém todos os dados de cor da seleção, que foram depois aplicadas a todas as amostras coradas.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os testes de significância foram realizadas com o programa InStat (GraphPad Software, San Diego, EUA). Os dados paramétricos foram analisados por meio de ANOVA com pós teste de Student-Newman-Keuls e os resultados foram expressos em média $\pm$ epm. Os resultados não paramétricos foram analisados usando Kruskal-Wallis e os resultados foram expressos em mediana com intervalo (box-plot). Comparação da positividade do FAN e escore renal foram feitas pelo teste de Fisher, enquanto . Os níveis de significância representados por: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

4.0 RESULTADOS

4.1 Características Gerais

A evolução ponderal dos animais, apresentada na figura 8, mostra que, os grupos LES e LES-MSH apresentaram maior ganho de peso após 180 dias de experimento.

Figura 8. Variação ponderal (peso final – inicial em g) após a indução do LES. Animais controle (C, □, n=5) inoculados com pristane e tratados com salina (LES, ■, n=5) e tratados com NDP-MSH 1,25 mg/Kg (LES-MSH, x, n=10). Os animais foram pesados 0, 30, 60, 90 e 180 dias após a injeção de pristane. Os resultados estão expressos como média ± epm. *p<0,05 por comparação aos animais controle, #p<0,05 por comparação com o grupo LES.

A avaliação hematológica revelou que o número total de leucócitos no sangue periférico de animais LES aumentou significativamente 180 dias após a administração do óleo, quando comparados com os animais

controle (figura 9). O tratamento com NDP-MSH não alterou a leucocitose dos animais LES.

Figura 9. Variação de leucócitos periféricos por mm^3 de sangue (final - inicial dias) em animais normais controle (C, n=5), inoculados com pristane e tratados com salina (LES, n=5) e tratados com NDP-MSH 1,25 mg/Kg (LES-MSH, n=10). Dados apresentados como mediana com máximo e mínimo. *p<0,05 por comparação aos animais controle.

Na necropsia foram evidenciadas formações de tecido granulomatoso no abdômen dos animais com LES (figura 10A, setas brancas). Estes achados foram encontrados no mesentério, diafragma, superfície hepática, renal e esplênica. Os animais tratados com NDP-MSH apresentaram redução na formação de granulomas, a cavidade abdominal desses animais se assemelhou a dos animais controle (Figura 10B). A relação do peso do rim direito, baço e fígado/peso corporal não foi diferente entre os grupos.

Figura 10. Cavidade peritoneal de camundongo LES 180 dias após a injeção pristane (A), as setas brancas apontam granulomas ao redor do fígado e baço. Em B observa-se a cavidade peritoneal de camundongo controle 180 dias após a injeção de solução salina.

4.2 EFEITO DO TRATAMENTO COM NDP-MSH NOS PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS DO LES

Na Figura 11, estão apresentados os subtipos IgG1 e IgG2a 180 dias após a injeção de pristane. Os resultados mostram que os animais com LES apresentaram aumento de anticorpos circulantes quando comparados aos controles. O tratamento com NDP-MSH (1,25 mg/Kg/dia), promoveu redução significativa dos níveis de IgG1 e IgG2a em comparação ao grupo LES ($p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente). Os subtipos IgG2b e IgG3 não diferiram entre os grupos.

Figura 11. Níveis Plasmáticos de imunoglobulinas IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 em animais controle (C, n=5) inoculados com pristane e tratados com salina (LES, n=5) e tratados com NDP-MSH 1,25 mg/Kg (LES-MSH, n=10) 180 dias após a inoculação com pristane. Títulos de 1:15.000. Dados apresentados como mediana com máximo e mínimo. * $p < 0,05$ por comparação aos animais controle, # $p < 0,05$ por comparação com o grupo LES.

A avaliação de anticorpos antinucleares (FAN) em animais com LES está apresentado na Figura 12. Cem por cento dos camundongos com LES induzido apresentaram FAN em títulos $\geq 1:200$ enquanto nenhum animal controle apresentou positividade ($p < 0,01$). Apenas 30% do grupo LES-MSH apresentou positividade ($p < 0,05$) (Painel A). A figura 12 painel B ilustra a ausência de FAN no plasma, o painel C ilustra os padrões de marcação citoplasmática e nucleolar e o painel D representa o padrão de marcação citoplasmática e nuclear verificado.

A Positividade de FAN/total de animais

Grupos	Basal	180 dias
Controle	0/5	0/5
LES	0/5	5/5*
LES-MSH	0/10	3/10 [#]

Figura 12. Efeito do NDP-MSH 1,25 mg/Kg/dia na incidência de FAN em camundongos com LES (Painel A), padrão negativo (Painel B) padrão nucleolar e citoplasmático (painel C) padrão nuclear e citoplasmático (painel D). Diluição de 1:200 e aumento original 400x. * $p < 0,05$ por comparação aos animais controle, # $p < 0,05$ por comparação com o

4.2.1 ANÁLISE DE CITOCINAS SÉRICAS

Dentre as citocinas avaliadas, foram observados níveis séricos de IFN γ abaixo da faixa de detecção em todos os grupos. Na figura 13 estão apresentados os resultados das citocinas avaliadas 180 dias após a inoculação dos animais. Animais com LES apresentaram aumento

significante nos níveis de IL-6 e IL-10 em relação ao grupo controle ($p=0,03$; $p=0,02$ e $p=0,04$ respectivamente).

Animais com LES tratados com NDP-MSH apresentaram discreta redução dos níveis plasmáticos de IL-6 e IL-10 quando comparados aos animais lúpicos ($p=0,099$ para ambos). Os animais LES tratados com NDP-MSH tiveram um aumento dos níveis de TNF- α quando comparados ao grupo não tratado ($p < 0,05$).

Figura 13. Perfil de citocinas plasmáticas em animais controle (C, n=5), inoculados com pristane e tratados com salina (LES, n=5) e tratados com NDP-MSH 1,25 mg/Kg/Dia (LES-MSH, n=10) 180 dias após a inoculação. Dados apresentados como mediana com máximo e mínimo. * $p < 0,05$ vs C e # $p < 0,05$ vs LES.

4.3 EFEITO DO TRATAMENTO COM NDP-MSH NO DESENVOLVIMENTO DA ARTRITE.

Na figura 14 A estão apresentados o resultado da avaliação da severidade da artrite em animais com LES e o efeito do tratamento com NDP-MSH. Uma artrite de magnitude média de 5,2 se desenvolveu em 80% dos animais LES. Os animais tratados com NDP-MSH apresentaram redução de 70% do escore de artrite (1,6, $p < 0,01$ vs.LES) em relação ao grupo LES e só se manifestou em 40% dos animais. No painel B está ilustrada a artrite das patas traseiras de um animal com LES e no painel C a redução do edema e eritema observada em animais LES tratados com NDP-MSH.

Figura 14. Efeito do tratamento com NDP-MSH sobre a artrite desenvolvida após a inoculação com pristane. **Painel A** estão apresentados os resultados (mediana com máximo e mínimo) do escore de artrite em animais controles (C, n=5) em animais LES tratados com salina (LES, n=5) e LES tratados com NDP-MSH 1,25 mg/Kg (LES-MSH, n=10). * $p < 0,05$ por comparação aos animais controle, # $p < 0,05$ por comparação com o grupo LES. **Painel B**, artrite em animal LES. **Painel C**, artrite em animal LES-MSH.

4.4 EFEITO DO TRATAMENTO COM NDP-MSH NOS PARÂMETROS URINÁRIOS DE ANIMAIS COM LES

Na figura 15 estão apresentados os resultados da avaliação da função renal em amostras de urina 24 horas, 150 dias após a inoculação com pristane. A excreção proteica foi significativamente aumentada nos animais com LES quando comparados a animais controle ($p < 0,01$), entretanto o tratamento com NDP-MSH foi ineficaz em reduzir a proteinúria (painel A). No painel B está ilustrado o perfil eletroforético das amostras de urina dos animais, destacando a banda de albumina. A análise da densidade óptica das bandas mostrou que os animais com LES apresentaram aumento da albuminúria e que esse parâmetro não foi significativamente afetado pelo tratamento com NDP-MSH.

Figura 15. Efeito do tratamento com NDP-MSH nos parâmetros urinários de animais com LES. **Painel A**, proteinúria dos animais controles (C, n=5) inoculados com pristane e tratados com salina (LES, n=5) e LES tratados com NDP-MSH 1,25 mg/Kg (LES-MSH, n=10). Dados apresentados como mediana com máximo e mínimo. * $p < 0,01$ por comparação com animais controle. **Painel B**, perfil eletroforético das amostras de urina dos animais, ressaltando a banda da albumina.

4.4.1 CELULARIDADE GLOMERULAR

A análise da celularidade glomerular, baseada na contagem do número de núcleos no interior dos glomérulos está apresentado na figura 16. Verifica-se que, os animais com LES induzido apresentaram um aumento significativo da celularidade em relação ao grupo de animais controle ($p < 0,01$). O tratamento com NDP-MSH (1,25 mg/kg/dia)

promoveu redução significativa deste parâmetro em relação ao grupo LES ($p<0,05$).

Figura 16. Celularidade glomerular dos animais controles (C, n=5) animais com LES tratados com salina (LES, n=5) e LES tratados com NDP-MSH 1,25 mg/Kg (LES-MSH, n=10). Dados apresentados como mediana com máximo e mínimo. * $p<0,05$ vs. animais controle, # $p<0,05$ por comparação com o grupo LES.

4.4.2 LESÃO GLOMERULAR

Na figura 17 estão apresentados os resultados da lesão glomerular (A) e fibrose glomerular (B) de cada animal 180 dias após a indução de LES. Animais com LES apresentaram um perfil histopatológico caracterizado por hiper celularidade mesangial moderada (escore=2), significativamente maior que o grau de lesão observado em rins de animais controle ($p<0,05$). Animais tratados com NDP-MSH 1,25 mg/kg/dia apresentaram redução significativa desse escore quando comparados aos animais com LES ($p<0,05$). Salienta-se que 80% dos animais tratados com

NDP-MSH apresentaram grau de lesão menor que 2 (ausência=0, hiper celularidade focal leve=1). Com relação ao grau de fibrose (painel B) não se verificou diferenças significativas entre animais controle e LES tratados ou não com NDP-MSH

Figura 17. Painel A, Lesão glomerular dos animais controles (C, n=5) animais com LES e tratados com salina (LES, n=5) e LES tratados com NDP-MSH 1,25 mg/Kg (LES-MSH, n=10). **Painel B,** Fibrose glomerular em animais controles (C, n=5) animais com LES e tratados com salina (LES, n=5) e LES tratados com NDP-MSH 1,25 mg/Kg (LES-MSH, n=10). Os resultados estão expressos como mediana. *p<0,05 por comparação aos animais controle, #p<0,05 por comparação com o grupo LES.

4.4.3 AVALIAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DE MARCADORES DE FUNÇÃO RENAL DE ANIMAIS COM LES INDUZIDO POR PRISTANE

Os resultados apresentados nas Figuras 18, 19 e 20, refletem a expressão glomerular de IgG, α -SMA e iNOS respectivamente. Verificou-

se que, em relação ao grupo controle, esse três marcadores tiveram sua expressão aumentada em animais com LES induzido. O tratamento diário com NDP-MSH promoveu uma redução significativa destes marcadores em relação ao grupo LES. A expressão de C3 e CD3 não diferiu entre os grupos (figuras 21 e 22).

Figura 18. Efeito do NDP-MSH 1,25 mg/kg/dia na expressão de IgG glomerular. No Painel A mediana com máximo e mínimo da presença de IgG em rins de animais controles normais (C, n=5) animais LES tratados com salina (LES, n=5) e LES tratados com NDP-MSH 1,25 mg/Kg (LES-MSH, n=10). No painel B, um exemplo de marcação de glomérulo controle; no painel C, marcação de um glomérulo de animal LES; painel D, marcação de glomérulo de animal LES-MSH, *** p < 0,001 vs controle e ## p < 0,01 vs LES.

Figura 19. Efeito do NDH-MSH 1,25 mg/kg/dia na expressão de α -SMA glomerular. No Painel A mediana com máximo e mínimo de α -SMA glomerular em rins de animais controles (C, n=5) animais com LES e tratados com salina (LES, n=5) e LES tratados com NDP-MSH 1,25 mg/kg (LES-MSH, n=10). O painel B ilustra a marcação de glomérulo controle; painel C a marcação de um glomérulo de animal LES; painel D a marcação de glomérulo de animal LES-MSH, ** p < 0,01 vs controle e ## p < 0,01 vs LES.

Figura 20. Efeito do NDH-MSH 1,25 mg/kg/dia na expressão de iNOS glomerular. No Painel A estão expressos mediana com máximo e mínimo de iNOS em rins de animais controles (C, n=5) animais com LES e tratados com salina (LES, n=5) e LES tratados com NDP-MSH 1,25 mg/Kg (LES-MSH, n=10). O painel B ilustra a marcação de glomérulo controle; painel C a marcação de um glomérulo de animal LES; painel D a marcação de glomérulo de animal LES-MSH, * p <0,01 vs controle e # p <0,01 vs LES.

Figura 21. Efeito do NDH-MSH 1,25 mg/kg/dia na expressão de C3 glomerular. No Painel A estão expressos mediana com máximo e mínimo de C3 em rins de animais controles (C, n=5) animais com LES e tratados com salina (LES, n=5) e LES tratados com NDP-MSH 1,25 mg/Kg (LES-MSH, n=10). O painel B ilustra a marcação de glomérulo controle; painel C a marcação de um glomérulo de animal LES; painel D a marcação de glomérulo de animal LES-MSH.

Figura 22. Efeito do NDH-MSH 1,25 mg/kg/dia na expressão de CD3 glomerular. No Painel A estão expressos mediana com máximo e mínimo de CD3 em rins de animais controles (C, n=5) animais com LES e tratados com salina (LES, n=5) e LES tratados com NDP-MSH 1,25 mg/Kg (LES-MSH, n=10). O painel B ilustra a marcação de glomérulo controle; painel C a marcação de um glomérulo de animal LES; painel D a marcação de glomérulo de animal LES-MSH.

4.4.4 AVALIAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DE MELANOCORTINA NOS GLOMERULOS DE ANIMAIS COM LES INDUZIDO POR PRISTANE

Com relação à expressão glomerular de MC1R, esta foi significativamente reduzida nos animais com LES ($p=0,007$) e em animais tratados com o neuropeptídeo NDP-MSH ($P=0,0007$) quando comparados com os animais controle (figura 23).

Figura 23. Efeito do NDP-MSH 1,25 mg/kg/dia na expressão de MC1R glomerular. No Painel A estão expressos a mediana com máximo e mínimo de MC1R em rins de animais controles (C, n=5) animais com LES e tratados com salina (LES, n=5) e LES tratados com NDP-MSH 1,25 mg/Kg (LES-MSH, n=10). O painel B ilustra a marcação de glomérulo controle; painel C a marcação de um glomérulo de animal LES; painel D a marcação de glomérulo de animal LES-MSH, ** $p < 0,01$ vs controle.

A expressão glomerular de CRF se apresentou reduzida significativamente apenas em camundongos tratados com NDP-MSH 1,25 ($P=0,04$) (figura 24). Em relação a expressão do α -MSH glomerular, apresentada na figura 25, verificou-se que o grupo tratado com o análogo sintético do hormônio, embora apresente redução em sua expressão, esta

Figura 24. Efeito do NDP-MSH 1,25 mg/kg/dia na expressão de CRF glomerular. No Painel A estão expressos a mediana com máximo e mínimo de CRF em rins de animais controles (C, n=5) animais com LES (LES, n=5) e LES tratados com NDP-MSH 1,25 mg/Kg (LES-MSH, n=10). O painel B ilustra a marcação de um glomérulo controle; painel C a marcação de um glomérulo de animal LES; painel D a marcação de glomérulo de animal LES-MSH, ## $p < 0,05$ vs LES.

Figura 25. Efeito do NDH-MSH 1,25 mg/kg/dia na expressão de α -MSH glomerular. No Painel A estão expressos a mediana com máximo e mínimo de α -MSH glomerular em rins de animais controles (C, n=5) animais com LES e tratados com salina (LES, n=5) e LES tratados com NDP-MSH 1,25 mg/Kg (LES-MSH, n=10). O painel B ilustra a marcação de glomérulo controle; painel C a marcação de um glomérulo de animal LES; painel D a marcação de glomérulo de animal LES-MSH.

5.0 DISCUSSÃO

O presente estudo mostra que o super-análogo de NDP-MSH exerce efeito anti-inflamatório e melhora uma série de parâmetros do LES induzido por pristane em camundongos. O tratamento reduziu a hipergamaglobulinemia, a incidência de FAN⁺, os níveis séricos de IL-10 e IL-6, preveniu o desenvolvimento da artrite e adicionalmente reduziu importantes parâmetros renais, como a deposição de IgG glomerular e a expressão de α -SMA e iNOS.

As doenças auto-imunes são influenciadas por diferentes fatores ambientais que podem agir como desencadeantes da síndrome lúpica em populações suscetíveis. Resíduos de pristane foram relacionados à incidência de lúpus em humanos (Dahlgren et al., 2007). Sendo assim o pristane pode ser relacionado como um possível fator causal do lúpus. De fato, sua aplicação em camundongos induz uma síndrome inflamatória que compartilha muitas das características descritas na doença humana, como: glomerunefrite, artrite, presença de FAN, diversos autoanticorpos lúpicos, incluindo anti-DNA_{fit} dupla e anti-SM (Reeves et al., 2009; Satoh et al., 2000). A injeção intraperitoneal de pristane induz uma doença lúpus-like possivelmente devido a uma peritonite crônica. Essa peritonite é caracterizada por apoptose e formação de tecido granulomatoso circundante as gotas de óleo, composto por neutrófilos, macrófagos, células T CD4⁺ e monócitos Ly6C^{hi}. Consequentemente ocorre a

formação de um tecido linfóide ectópico terciário, com padrões de centro germinativo com produção de células T e células dendríticas, quimiocinas (CCL19, CCL21, CXCL12, CXCL13), citocinas (IFN- γ , IL-6, IL-12) e anticorpos (Reeves et al., 2009).

Nesse sentido, nossos resultados mostraram que, seis meses após a injeção de pristane os animais com LES o centro de padrão germinativo (granulomas) bem como altos títulos de IgG1 e IgG2a plasmáticos e anticorpos antinucleares e anticitoplasmáticos circulantes. A eficácia antiinflamatória do tratamento diário com NDP-MSH foi confirmada pela redução da hipergamaglobulinemia e da incidência de FAN⁺. Esses parâmetros foram igualmente reduzidos em animais com LES induzido e tratados com outros compostos que se mostraram anti-inflamatórios como, anticorpo anti-IFN e melatonina (Ouyang et al., 2012; Zhou et al., 2010a). Adicionalmente, camundongos knockout para IL-6, IFN α , IFN- γ , ou receptores Toll-like (TLR) têm níveis baixos de IgG ou anticorpos antinucleares (Lee, P. Y. et al., 2008; Richards et al., 2001b; Richards et al., 1998a; Summers et al., 2010). A utilização de α -MSH (1mg/kg) em modelo de inflamação de vias aéreas, também induziu redução nos títulos de anticorpos IgG1 e IgG2a alérgeno específico (Raap et al., 2003).

Um importante parâmetro de disfunção imune é a produção de citocinas. Pacientes lúpicos têm níveis séricos alterados de IFN- α , IFN- γ , TNF- α , IL-6 e IL-10 que estão correlacionados com a atividade e gravidade da doença (Yap; Lai, 2013). O hormônio α -MSH via receptores MC1R e MC3R, atua na inibição do NF κ B (Giuliani et al., 2012). Sendo assim, o

tratamento com o neuropeptídeo pode bloquear a secreção de citocinas inflamatórias necessárias para a patogênese do lúpus induzido por pristane. Esse efeito foi confirmado em nosso estudo pela redução de IL-6, IL-10 que estavam aumentadas em animais com LES. O aumento da produção de IL-6 no LES induzido por pristane têm sido observada *in vivo* e *in vitro* (Chae et al., 2008; Minhas; Minz; Bhatnagar, 2011; Richards et al., 1998a; Summers et al., 2010). Além disso, camundongos knockout para IL-6 não desenvolvem autoanticorpos anti-DNA_{fit} dupla, fator reumatóide e lesão renal após a administração de pristane (Richards et al., 1998a). Em pacientes, o papel de IL-6 é bem definido, uma vez que é a citocina é superexpressa no LES e o tratamento com anti-IL6R melhora o SLEDAI e reduz autoanticorpos (Shirot et al., 2013).

Nossos resultados mostram que o α -MSH reduziu os níveis plasmáticos de IL-10. Apesar da IL-10 ser considerada uma citocina anti-inflamatória e imunossupressora, no modelo de lúpus induzido por pristane foi observada uma maior concentração dessa citocina no soro, no lavado broncoalveolar, em esplenócitos e macrófagos peritoneais estimulados (Chae; Shin, 2007; Chowdhary et al., 2007; Urbonaviciute et al., 2013). Além disso, a IL-10 também se apresenta elevada em doentes lúpicos (Beebe; Cua; de Waal Malefyt, 2002; Chun et al., 2007). Adicionalmente em um estudo clínico a utilização de anticorpos anti-IL-10 foi capaz de melhorar o SLEDAI (Llorente et al., 2000).

Com relação ao TNF- α , surpreendentemente, o tratamento com NDP-MSH aumentou sua produção nos animais com LES. Realmente, o TNF- α apresenta efeitos pleiotrópicos no LES humano e seu papel na

doença ainda não está completamente elucidado. Apesar de ser considerada uma citocina pró-inflamatória, alguns estudos clínicos demonstram que a utilização de terapia anti-TNF- α tem um efeito estimulante na atividade lúpica e, além disso é observado que a sua utilização pode desencadear uma síndrome autoimune “lúpus like” em pacientes (Yap; Lai, 2013). Não existem ainda conclusões sobre a causa desse efeito, mas sugere-se que o TNF- α seja necessário na supressão da produção de IFN- α . Além disso, ele também pode modular apoptose de populações de linfócitos maduros em doenças autoimunes, eliminando células autoreativas (Clark, D. N. et al., 2012; Theofilopoulos; Lawson, 1999)

De fato o TNF pode ter efeito duplo na NL. O tratamento de camundongos com LES espontâneo com baixas doses de TNF α recombinante (0,2 μ g/ 3x por semana) piora a NL. Contudo animais que receberam doses maiores (2,0 μ g/ 3x por semana) não apresentaram piora. A administração da citocina recombinante antes do aparecimento da doença não alterou o grau de NL (Brennan et al., 1989). Corroborando nossos achados, células de camundongos com LES induzido por pristane tem a produção de TNF α aumentada pela indometacina (Chae et al., 2008).

Classicamente o tratamento com NDP-MSH reduz os níveis de IL-6 e TNF- α bem como aumenta a expressão de IL-10. Entretanto, em modelo de lesão renal aguda induzida por sépsis, foi observado aumento de IL-10 em camundongos nefropatas. Nesse estudo, o tratamento se mostrou indutor ou supressor de IL-10, em função da dose empregada (Doi et al., 2008a). Adicionalmente, em estudo de peritonite induzida por carragenina,

não se observou ação do NDP-MSH sobre a produção de IL-10 e TNF- α (Figueiredo et al., 2013). A administração de NDP-MSH a ratos não alterou a expressão de RNAm para IL-10, IL-1 β e TNF- α (Catania; Lonati; Sordi; Leonardi; et al., 2010).

Em modelos experimentais o α -MSH têm se mostrado um potente redutor da artrite. Pacientes com AR e artrite juvenil apresentaram níveis elevados de α -MSH no líquido sinovial, provavelmente por um mecanismo compensatório frente a doença. Além disso, esse estudo mostrou que a concentração do hormônio estava diretamente correlacionada com o grau de inflamação (Catania et al., 1994). Em artrite induzida por *Mycobacterium* em ratos, a administração de α -MSH (50 ug IP) reduziu o escore de artrite e melhorou o grau de lesão histológica (Ceriani et al., 1994).

A injeção IP de pristane induz hiperplasia sinovial, periostite e erosões marginais em camundongos Balb/c, sugerindo uma condição de síndrome de sobreposição LES/AR (Reeves et al., 2009). Na artrite induzida por pristane ocorre aumento de citocinas pró-inflamatórias (TNF α , IL-1 e IL-6) na região articular. Esses animais tratados com drogas antiinflamatórias, entre elas indometacina, metotrexato e corticóide, tiveram redução do grau de artrite, entretanto apenas a prednisolona reduziu a expressão das citocinas articulares (Patten et al., 2004).

A doença renal no LES, é a principal causa de morbidade e mortalidade e se desenvolve em cerca de 60% dos pacientes com SLE. A proteinúria é um parâmetro extremamente importante para avaliação e tratamento do envolvimento renal nos pacientes com LES (Christopher-Stine et al.,

2004). Pacientes com NL caracterizada como SN (alta perda de proteína urinária e baixa albumina sérica) possuem maior atividade da doença, tendem a receber doses cumulativas maiores de prednisona e possuem maiores risco de apresentarem complicações vasculares (Falaschi et al., 2000).

O modelo de LES induzido por pristane é um dos poucos que pode evoluir com glomerulonefrite (Hamilton et al., 1998). A maioria dos camundongos Balb/c desenvolvem glomerulonefrite mediada por IC entre 4-6 meses após a injeção do pristane (Reeves et al., 2009). Outra característica do LES induzido por pristane é que a nefrite observada parece ser independente da produção de anticorpos anti-DNA^{figura dupla} (Richards et al., 1998a).

Assim como nos pacientes, não foram todos os animais em nosso trabalho que desenvolveram lesão glomerular. Em nosso estudo, 80% dos animais apresentaram proteinúria ou envolvimento renal, corroborando com experimentos anteriores que demonstram incidência similar (Richards et al., 2001b). Verificamos padrão de lesões glomerulares consistente com NL classe II, com hiperplasia mesangial. A literatura demonstra que pacientes que possuem a mesma classificação também podem apresentar perda proteica significativa, principalmente quando está associado com danos nos podócitos (Han; Schwartz; Lewis, 2006). No modelo de LES induzido por pristane também são reportados a presença NL classe II nos animais (Chowdhary et al., 2007). Além disso, o uso de moléculas anti-inflamatórias ou camundongos knockout para citocinas com IL-6, IL-12 e IFN apresentam redução da proteinúria e de lesões glomerulares (Calvani et al., 2003b; Dimitrova et al.,

2010; Minhas et al., 2011; Minhas et al., 2012; Richards et al., 2001b; Richards et al., 1998a; Zhou et al., 2010a).

O tratamento com NDP-MSH não reverteu a proteinúria, contudo melhorou parâmetros histopatológicos e imunohistoquímicos da lesão glomerular. Corroborando nossos resultados, dois grupos de pesquisa independentes obtiveram resultados semelhantes com o mesmo esquema terapêutico com α -MSH em modelos de nefrotoxocidade induzida por ciclosporina A ou gentamicina (Kolgazi et al., 2007; Lee, S. Y. et al., 2004) KOLGAZI et al., 2007; LEE, S. Y. et al., 2004). Nesses dois tipos de nefrite, o neuropeptídeo não afetou a ureia e creatinina plasmática, mas melhorou a lesão histológica, reduziu a fibrose intersticial e a expressão de marcadores inflamatórios e apoptóticos.

Nossa análise imunohistoquímica revelou que expressão de α -SMA está aumentada no LES induzido e reduzida em animais tratados com o NDP-MSH. Na fibrose renal, a α -actina de músculo liso é expressa em miócitos vasculares, em fibroblastos e células mesangiais. Existe associação da NL com maior expressão de α -SMA (Alpers et al., 1992; Hurtado et al., 1999). Corroborando nossos resultados, em células mesangiais de pacientes com NL classe II também aumento da expressão de α -SMA (Hurtado et al., 1999; Makni et al., 2009). Adicionalmente, a administração de análogos de α -MSH diminuem a expressão de α -SMA, em modelo de lesão hepática (Lee, T. H. et al., 2006; Wang, C. H. et al., 2004) e fibrose pulmonar (Xu et al., 2011).

Outro importante parâmetro afetado pelo tratamento com o análogo do hormônio foi a expressão da óxido nítrico sintase indutível (iNOS) no

rim. O NO é uma molécula bioativa de vida curta que possui papel central na regulação dos sistemas imune, nervoso e cardiovascular. A iNOS é a enzima que participa da produção de NO após estímulos imunológicos e inflamatórios. Evidências sugerem que formas reativas do nitrogênio estão elevadas no LES ativo e que a expressão de iNOS está associada a patogênese da doença (Oates; Gilkeson, 2006). Evidências apontam para uma maior expressão da enzima na NL, bem como em sua correlação com o dano renal (Wang, J. S. et al., 1997). Camundongos com LES espontâneo também apresentam maior expressão de iNOS no rim e a melhora da doença é associada à redução na expressão da enzima (Weinberg et al., 1994).

A administração IP de pristane aumenta a expressão de iNOS, tanto em macrófagos peritoneais, quanto na membrana sinovial dos animais (Akaogi et al., 2004b). A ação do α -MSH na redução de iNOS foi verificada tanto em macrófagos estimulados por LPS (Mandrika, I.; Muceniece, R.; Wikberg, J. E. S., 2001; Star et al., 1995), como em melanócitos (Tsatmali et al., 2000). Em modelo de doença renal aguda induzida por isquemia bilateral, a administração de α -MSH (50 μ g IV) reduziu a expressão de iNOS na zona medular renal (Chiao et al., 1997a).

Uma outra habilidade do α -MSH descrita, é a capacidade de converter células T efectoras em células T reguladoras, aumentando portanto a capacidade de suprimir a resposta imune contra antígenos alvo (Taylor, A. W.; Lee, 2011). Linfócitos T apresentam o receptor CD3 na superfície celular, portanto sua expressão é útil para determinar o infiltrado tecidual de linfócito (McWhinnie et al., 1986). Em nosso estudo, tanto animais lúpicos como os controles expressaram pouco CD3 no glomérulo e

portanto nenhum efeito do tratamento foi verificado. Isso possivelmente se deve ao grau de lesão. Apenas pacientes com NL proliferativa (classes III e IV) apresentam grande infiltrado de linfócitos T no rim (Yoshimoto et al., 2007).

Trabalhos prévios demonstram que a-MSH antagoniza a acumulação neutrofílica cutânea em resposta ao C5a (Modulation of IL-1, tumor necrosis factor, and C5a-mediated). A determinação do C3 glomerular é um importante parâmetro a ser avaliado no LES, indicando o consumo do complemento pelos ICs no tecido. Em nosso trabalho a detecção do fator 3 do complemento pode ter sido influenciada por fatores técnicos, apesar de trabalhos prévios demonstrarem correlação entre marcação com peroxidase e imunofluorescência para o fator 4 do complemento (Ludovico-Martins et al., 2009), nós não obtivemos diferenças entre os grupos, como demonstrado por outro grupo (Chowdhury et al., 2005; Seemayer et al., 2007).

Nos rins o receptor MC1R é expresso em diferentes células incluindo: neutrófilos, monócitos, células dendríticas, linfócitos-B, podócitos, células mesangiais, epiteliais e tubulares (Getting, 2006; Lindskog, A. et al., 2010). Em nosso estudo animais lúpicos, tratados ou não com NDP-MSH, apresentaram redução do receptor MC1R glomerular. Estudos mostram que, receptores MC1R e MC3R tiveram sua expressão reduzida 1 dia após isquemia-reperfusão renal em ratos (Lee, Y. S. et al., 2008).

Apesar da eficácia do α MSH em animais de insuficiência renal, um relato de caso recente descreveu que, a injeção de 6 mg de melanotan II (dose recomendada é de 0,01 - 0,025 mg/kg) induziu toxicidade. O

paciente apresentou sintomas simpatomiméticos, rabdomiólise e disfunção renal (Nelson; Bryant; Aks, 2012). Atualmente o uso terapêutico de melanocortinas para pacientes com síndrome nefrótica, tem se baseado em ACTH. Um paciente com glomerulonefrite lúpica classe V de trial clínico de ACTH, apresentou uma resposta transitória à terapia (queda da proteinúria a <500 mg / dia), mas com recidiva da doença assim que o ACTH foi interrompido (Bomback et al., 2011; Gong, R., 2012).

Nossos resultados demonstram que o α -MSH se opõe a inúmeros fatores envolvidos na patogênese do lúpus induzido. Considerando-se que o tratamento do paciente lúpico envolve um grande arsenal terapêutico que nem sempre controla toda a plêiade de sintomas da doença, acreditamos que o neuropeptídeo possa ser considerado como uma ferramenta antiinflamatória importante também nessa patologia.

6.0 CONCLUSÕES

Os animais com LES induzido por pristane tratados diariamente com NDP-MSH apresentaram redução dos seguintes parâmetros da atividade da doença:

1. Granulomas peritoneais
2. Títulos de IgG1 E IgG2a
3. Incidência de animais com FAN positivo
4. Escore artrítico
5. Grau de lesão glomerular
6. Marcadores de doença renal, incluindo depósitos de IgG, α -SMA e iNOS.

7.0 REFERÊNCIAS

Abdel-Malek, Z. A. Melanocortin receptors: their functions and regulation by physiological agonists and antagonists. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**. 2001; 58(3): 434-41.

Abeyagunawardena, A. S.; Hindmarsh, P.; Trompeter, R. S. Adrenocortical suppression increases the risk of relapse in nephrotic syndrome. **Archives of disease in childhood**. 2007; 92(7): 585-8.

Airaghi, L.; Garofalo, L.; Cutuli, M. G.; Delgado, R.; Carlin, A.; Demitri, M. T.; Badalamenti, S.; Graziani, G.; Lipton, J. M.; Catania, A. Plasma concentrations of alpha-melanocyte-stimulating hormone are elevated in patients on chronic haemodialysis. **Nephrol Dial Transplant**. 2000; 15(8): 1212-6.

Akaogi, J.; Yamada, H.; Kuroda, Y.; Nacionales, D. C.; Reeves, W. H.; Satoh, M. Prostaglandin E2 receptors EP2 and EP4 are up-regulated in peritoneal macrophages and joints of pristane-treated mice and modulate TNF-alpha and IL-6 production. **J Leukoc Biol**. 2004; 76(1): 227-36.

Alpers, C. E.; Hudkins, K. L.; Gown, A. M.; Johnson, R. J. Enhanced expression of "muscle-specific" actin in glomerulonephritis. **Kidney Int**. 1992; 41(5): 1134-42.

Anders, H.-J.; Weening, J. Kidney disease in lupus is not always 'lupus nephritis'. **Arthritis Res Ther**. 2013; 15(2): 108.

Arnason, B. G.; Berkovich, R.; Catania, A.; Lisak, R. P.; Zaidi, M. Mechanisms of action of adrenocorticotrophic hormone and other melanocortins relevant to the clinical management of patients with multiple sclerosis. **Multiple Sclerosis Journal**. 2013; 19(2): 130-136.

Barnett, H. L. Effect of ACTH in children with the nephrotic syndrome. **Pediatrics**. 1952; 9(3): 341.

Becher, E.; Mahnke, K.; Brzoska, T.; Kalden, D. H.; Grabbe, S.; Luger, T. A. Human peripheral blood-derived dendritic cells express functional melanocortin receptor MC-1R. **Ann N Y Acad Sci**. 1999; 885:188-95.

Beck LH, B. A., Beck DM, Bonegio RGB, J SD. Treatment of idiopathic membranous nephropathy with ACTH is associated with a decline in anti-PLA2R antibody. **J Am Soc Nephrol**. 2009; 20:306A.

Beebe, A. M.; Cua, D. J.; de Waal Malefyt, R. The role of interleukin-10 in autoimmune disease: systemic lupus erythematosus (SLE) and multiple sclerosis (MS). **Cytokine Growth Factor Rev**. 2002; 13(4-5): 403-12.

Berberian, V.; Sanchez, S.; Sanchez-Borzone, M.; Attademo, A. M.; Lasaga, M.; Celis, M. E. Effect of alpha-melanotropin hormone on serum levels of luteinizing hormone and progesterone in experimental rat autoimmune oophoritis. **Peptides**. 2006; 27(9): 2295-9.

Berg, A. L.; Arnadottir, M. ACTH-induced improvement in the nephrotic syndrome in patients with a variety of diagnoses. **Nephrol Dial Transplant**. 2004; 19(5): 1305-7.

Berg, A. L.; Nilsson-Ehle, P.; Arnadottir, M. Beneficial effects of ACTH on the serum lipoprotein profile and glomerular function in patients with membranous nephropathy. **Kidney Int**. 1999; 56(4): 1534-43.

Bertolini, A.; Guarini, S.; Rompianesi, E.; Ferrari, W. Alpha-MSH and other ACTH fragments improve cardiovascular function and survival in experimental hemorrhagic shock. **Eur J Pharmacol.** 1986; 130(1-2): 19-26.

Bertolini, A.; Tacchi, R.; Vergoni, A. V. Brain effects of melanocortins. **Pharmacol Res.** 2009; 59(1): 13-47.

Bhardwaj, R.; Becher, E.; Mahnke, K.; Hartmeyer, M.; Schwarz, T.; Scholzen, T.; Luger, T. A. Evidence for the differential expression of the functional alpha-melanocyte-stimulating hormone receptor MC-1 on human monocytes. **J Immunol.** 1997; 158(7): 3378-84.

Bhardwaj, R. S.; Luger, T. A. Proopiomelanocortin production by epidermal cells: evidence for an immune neuroendocrine network in the epidermis. **Archives of dermatological research.** 1994; 287(1): 85-90.

Bhardwaj, R. S.; Schwarz, A.; Becher, E.; Mahnke, K.; Aragane, Y.; Schwarz, T.; Luger, T. A. Pro-opiomelanocortin-derived peptides induce IL-10 production in human monocytes. **J Immunol.** 1996; 156(7): 2517-21.

Bitto, A.; Polito, F.; Altavilla, D.; Irrera, N.; Giuliani, D.; Ottani, A.; Minutoli, L.; Spaccapelo, L.; Galantucci, M.; Lodi, R.; Guzzo, G.; Guarini, S.; Squadrito, F. Melanocortins protect against multiple organ dysfunction syndrome in mice. **Br J Pharmacol.** 2011; 162(4): 917-28.

Bohm, M.; Metze, D.; Schulte, U.; Becher, E.; Luger, T. A.; Brzoska, T. Detection of melanocortin-1 receptor antigenicity on human skin cells in culture and in situ. **Experimental dermatology.** 1999; 8(6): 453-61.

Bohm, M.; Schiller, M.; Luger, T. A. Non-pigmentary actions of alpha-melanocyte-stimulating hormone--lessons from the cutaneous melanocortin system. **Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).** 2006; 52(2): 61-8.

Bomback, A. S.; Canetta, P. A.; Beck, L. H., Jr.; Ayalon, R.; Radhakrishnan, J.; Appel, G. B. Treatment of resistant glomerular diseases with adrenocorticotrophic hormone gel: a prospective trial. **Am J Nephrol.** 2012; 36(1): 58-67.

Bomback, A. S.; Tumlin, J. A.; Baranski, J.; Bourdeau, J. E.; Besarab, A.; Appel, A. S.; Radhakrishnan, J.; Appel, G. B. Treatment of nephrotic syndrome with adrenocorticotrophic hormone (ACTH) gel. **Drug design, development and therapy.** 2011; 5147-53.

Boon, N. A.; Davidson, S. **Davidson's Principles And Practice of Medicine.** Elsevier/Churchill Livingstone, 2006. ISBN 9780443100574.

Borba, E. F.; Latorre, L. C.; Brenol, J. C. T.; Kayser, C.; Silva, N. A. d.; Zimmermann, A. F.; Pádua, P. M. d.; Costallat, L. T. L.; Bonfá, E.; Sato, E. I. Consenso de lúpus eritematoso sistêmico. **Rev Bras Reumatol.** 2008; 48196-207.

Borchers, A. T.; Leibushor, N.; Naguwa, S. M.; Cheema, G. S.; Shoenfeld, Y.; Gershwin, M. E. Lupus nephritis: a critical review. **Autoimmun Rev.** 2012; 12(2): 174-94.

Bracci-Laudiero, L.; Aloe, L.; Stenfors, C.; Theodorsson, E.; Lundberg, T. Development of systemic lupus erythematosus in mice is associated with alteration of neuropeptide concentrations in inflamed kidneys and immunoregulatory organs. **Neuroscience letters.** 1998; 248(2): 97-100.

Brennan, D. C.; Yui, M. A.; Wuthrich, R. P.; Kelley, V. E. Tumor necrosis factor and IL-1 in New Zealand Black/White mice. Enhanced gene expression and acceleration of renal injury. **J Immunol.** 1989; 143(11): 3470-5.

Brzoska, T.; Kalden, D. H.; Scholzen, T.; Luger, T. A. Molecular basis of the alpha-MSH/IL-1 antagonism. **Ann N Y Acad Sci.** 1999; 885230-8.

Brzoska, T.; Luger, T. A.; Maaser, C.; Abels, C.; Bohm, M. Alpha-melanocyte-stimulating hormone and related tripeptides: biochemistry, antiinflammatory and protective effects in vitro and in vivo, and future perspectives for the treatment of immune-mediated inflammatory diseases. **Endocrine reviews**. 2008; 29(5): 581-602.

Buske-Kirschbaum, A. Cortisol responses to stress in allergic children: interaction with the immune response. **Neuroimmunomodulation**. 2009; 16(5): 325-32.

Calvani, N.; Satoh, M.; Croker, B. P.; Reeves, W. H.; Richards, H. B. Nephritogenic autoantibodies but absence of nephritis in IL-12p35-deficient mice with pristane-induced lupus. **Kidney Int**. 2003; 64(3): 897-905.

Canetta, P. A.; Radhakrishnan, J. Impact of the National Institutes of Health Focal Segmental Glomerulosclerosis (NIH FSGS) clinical trial on the treatment of steroid-resistant FSGS. **Nephrol Dial Transplant**. 2013; 28(3): 527-34.

Cannon, J. G.; Tatro, J. B.; Reichlin, S.; Dinarello, C. A. Alpha melanocyte stimulating hormone inhibits immunostimulatory and inflammatory actions of interleukin 1. **J Immunol**. 1986; 137(7): 2232-6.

Caruso, C.; Mohn, C.; Karara, A. L.; Rettori, V.; Watanobe, H.; Schioth, H. B.; Seilicovich, A.; Lasaga, M. Alpha-melanocyte-stimulating hormone through melanocortin-4 receptor inhibits nitric oxide synthase and cyclooxygenase expression in the hypothalamus of male rats. **Neuroendocrinology**. 2004; 79(5): 278-86.

CARVAHO, M. A. P.; LANNA, C. C. D.; BÉRTOLO, M. B. **Reumatologia: Diagnóstico e tratamento**. 3ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

Casalino-Matsuda, S. M.; Durando, P. E.; Celis, M. E. Effects of alpha-MSH on progesterone and nitric oxide release by cultured ovarian granulosa cells in experimental rat autoimmune oophoritis. **Journal of physiology and biochemistry**. 2002; 58(1): 25-31.

Castrucci, A. M.; Almeida, A. L.; al-Obeidi, F. A.; Hadley, M. E.; Hruby, V. J.; Staples, D. J.; Sawyer, T. K. Comparative biological activities of alpha-MSH antagonists in vertebrate pigment cells. **General and comparative endocrinology**. 1997; 105(3): 410-6.

Castrucci, A. M.; Hadley, M. E.; Sawyer, T. K.; Hruby, V. J. Enzymological studies of melanotropins. **Comparative biochemistry and physiology. B, Comparative biochemistry**. 1984; 78(3): 519-24.

Catania, A. **Melanocortins: Multiple Actions and Therapeutic Potential**. Springer Science+Business Media, 2010. ISBN 9781441963543.

Catania, A.; Airaghi, L.; Colombo, G.; Lipton, J. M. Alpha-melanocyte-stimulating hormone in normal human physiology and disease states. **Trends in endocrinology and metabolism: TEM**. 2000; 11(8): 304-8.

Catania, A.; Airaghi, L.; Garofalo, L.; Cutuli, M.; Lipton, J. M. The neuropeptide alpha-MSH in HIV infection and other disorders in humans. **Ann N Y Acad Sci**. 1998; 840:48-56.

Catania, A.; Gatti, S.; Colombo, G.; Lipton, J. M. Targeting melanocortin receptors as a novel strategy to control inflammation. **Pharmacological reviews**. 2004; 56(1): 1-29.

Catania, A.; Gerloni, V.; Procaccia, S.; Airaghi, L.; Manfredi, M. G.; Lomater, C.; Grossi, L.; Lipton, J. M. The anticytokine neuropeptide alpha-melanocyte-stimulating hormone in synovial fluid of patients with rheumatic diseases: comparisons with other anticytokine molecules. **Neuroimmunomodulation**. 1994; 1(5): 321-8.

Catania, A.; Lonati, C.; Sordi, A.; Carlin, A.; Leonardi, P.; Gatti, S. The melanocortin system in control of inflammation. **TheScientificWorldJournal**. 2010; 10:1840-53.

Catania, A.; Lonati, C.; Sordi, A.; Leonardi, P.; Carlin, A.; Gatti, S. The peptide NDP-MSH induces phenotype changes in the heart that resemble ischemic preconditioning. **Peptides**. 2010; 31(1): 116-22.

Cavalcanti, D. M.; Lotufo, C. M.; Borelli, P.; Ferreira, Z. S.; Markus, R. P.; Farsky, S. H. Endogenous glucocorticoids control neutrophil mobilization from bone marrow to blood and tissues in non-inflammatory conditions. **Br J Pharmacol**. 2007; 152(8): 1291-300.

Ceriani, G.; Diaz, J.; Murphree, S.; Catania, A.; Lipton, J. M. The neuropeptide alpha-melanocyte-stimulating hormone inhibits experimental arthritis in rats. **Neuroimmunomodulation**. 1994; 1(1): 28-32.

Chae, B. S.; Shin, T. Y. Immunoregulatory abnormalities of T cells and hyperreactivity of B cells in the in vitro immune response in pristane-induced lupus mice. **Archives of pharmacol research**. 2007; 30(2): 191-8.

Chae, B. S.; Shin, T. Y.; Kim, D. K.; Eun, J. S.; Leem, J. Y.; Yang, J. H. Prostaglandin E2-mediated dysregulation of proinflammatory cytokine production in pristane-induced lupus mice. **Archives of pharmacol research**. 2008; 31(4): 503-10.

Chang, C.; Gershwin, M. E. Drug-induced lupus erythematosus: incidence, management and prevention. **Drug Saf**. 2011; 34(5): 357-74.

Chhajlani, V. Distribution of cDNA for melanocortin receptor subtypes in human tissues. **Biochem. Mol. Biol. Int**. 1996; 38(1): 73-80.

Chiao, H.; Kohda, Y.; McLeroy, P.; Craig, L.; Housini, I.; Star, R. A. Alpha-melanocyte-stimulating hormone protects against renal injury after ischemia in mice and rats. **J Clin Invest**. 1997; 99(6): 1165-72.

Chiao, H.; Kohda, Y.; McLeroy, P.; Craig, L.; Linas, S.; Star, R. A. Alpha-melanocyte-stimulating hormone inhibits renal injury in the absence of neutrophils. **Kidney Int**. 1998; 54(3): 765-74.

Choi, H. J.; Cho, H. Y.; Ro, H.; Lee, S. H.; Han, K. H.; Lee, H.; Kang, H. G.; Ha, I. S.; Choi, Y.; Cheong, H. I. Polymorphisms of the MDR1 and MIF genes in children with nephrotic syndrome. **Pediatr Nephrol**. 2011; 26(11): 1981-8.

Chowdhary, V. R.; Grande, J. P.; Luthra, H. S.; David, C. S. Characterization of haemorrhagic pulmonary capillaritis: another manifestation of Pristane-induced lupus. **Rheumatology (Oxford)**. 2007; 46(9): 1405-10.

Chowdhury, A. R.; Ehara, T.; Higuchi, M.; Hora, K.; Shigematsu, H. Immunohistochemical detection of immunoglobulins and complements in formaldehyde-fixed and paraffin-embedded renal biopsy tissues; an adjunct for diagnosis of glomerulonephritis. **Nephrology (Carlton)**. 2005; 10(3): 298-304.

Christopher-Stine, L.; Petri, M.; Astor, B. C.; Fine, D. Urine protein-to-creatinine ratio is a reliable measure of proteinuria in lupus nephritis. **J Rheumatol**. 2004; 31(8): 1557-9.

Chun, H. Y.; Chung, J. W.; Kim, H. A.; Yun, J. M.; Jeon, J. Y.; Ye, Y. M.; Kim, S. H.; Park, H. S.; Suh, C. H. Cytokine IL-6 and IL-10 as biomarkers in systemic lupus erythematosus. **J Clin Immunol**. 2007; 27(5): 461-6.

Clark, D.; Thody, A. J.; Shuster, S.; Bowers, H. Immunoreactive alpha-MSH in human plasma in pregnancy. **Nature**. 1978; 273(5658): 163-4.

Clark, D. N.; Markham, J. L.; Sloan, C. S.; Poole, B. D. Cytokine inhibition as a strategy for treating systemic lupus erythematosus. **Clin Immunol**. 2012;

Colledge, N. R.; Walker, B. R.; Ralston, S. H. **Davidson's Principles and Practice of Medicine**. Elsevier Health Sciences UK, 2010. ISBN 9780702044267.

Colombo, G.; Gatti, S.; Sordi, A.; Turcatti, F.; Carlin, A.; Rossi, C.; Lonati, C.; Catania, A. Production and effects of alpha-melanocyte-stimulating hormone during acute lung injury. **Shock**. 2007; 27(3): 326-33.

Colquitt, J. L.; Kirby, J.; Green, C.; Cooper, K.; Trompeter, R. S. The clinical effectiveness and cost-effectiveness of treatments for children with idiopathic steroid-resistant nephrotic syndrome: a systematic review. **Health Technol Assess**. 2007; 11(21): iii-iv, ix-xi, 1-93.

Cone, R. D. Anatomy and regulation of the central melanocortin system. **Nature neuroscience**. 2005; 8(5): 571-8.

Cooper, A.; Robinson, S. J.; Pickard, C.; Jackson, C. L.; Friedmann, P. S.; Healy, E. Alpha-melanocyte-stimulating hormone suppresses antigen-induced lymphocyte proliferation in humans independently of melanocortin 1 receptor gene status. **J Immunol**. 2005; 175(7): 4806-13.

Couser, W. G. Basic and translational concepts of immune-mediated glomerular diseases. **J Am Soc Nephrol**. 2012; 23(3): 381-99.

Cragnolini, A. B.; Caruso, C.; Lasaga, M.; Scimonelli, T. N. Alpha-MSH and gamma-MSH modulate early release of hypothalamic PGE2 and NO induced by IL-1beta differently. **Neuroscience letters**. 2006; 409(3): 168-72.

Crispin, J. C.; Liossis, S. N.; Kis-Toth, K.; Lieberman, L. A.; Kyttaris, V. C.; Juang, Y. T.; Tsokos, G. C. Pathogenesis of human systemic lupus erythematosus: recent advances. **Trends Mol Med**. 2010; 16(2): 47-57.

Dahlgren, J.; Takhar, H.; Anderson-Mahoney, P.; Kotlerman, J.; Tarr, J.; Warshaw, R. Cluster of systemic lupus erythematosus (SLE) associated with an oil field waste site: a cross sectional study. **Environmental health : a global access science source**. 2007; 68.

Dai, R.; Streilein, J. W. Ultraviolet B-exposed and soluble factor-pre-incubated epidermal Langerhans cells fail to induce contact hypersensitivity and promote DNP-specific tolerance. **The Journal of investigative dermatology**. 1997; 108(5): 721-6.

Daniels, D.; Patten, C. S.; Roth, J. D.; Yee, D. K.; Fluharty, S. J. Melanocortin receptor signaling through mitogen-activated protein kinase in vitro and in rat hypothalamus. **Brain research**. 2003; 986(1-2): 1-11.

Davidson, A.; Aranow, C. Lupus nephritis: lessons from murine models. **Nature reviews. Rheumatology**. 2010; 6(1): 13-20.

de Zubiria Salgado, A.; Herrera-Diaz, C. Lupus nephritis: an overview of recent findings. **Autoimmune Dis**. 2012; 2012849684.

Delgado, M.; Ganea, D. Anti-inflammatory neuropeptides: A new class of endogenous immunoregulatory agents. **Brain, behavior, and immunity**. 2008;

Deng, J.; Hu, X.; Yuen, P. S.; Star, R. A. Alpha-melanocyte-stimulating hormone inhibits lung injury after renal ischemia/reperfusion. **American journal of respiratory and critical care medicine**. 2004; 169(6): 749-56.

Deng, J.; Kohda, Y.; Chiao, H.; Wang, Y.; Hu, X.; Hewitt, S. M.; Miyaji, T.; McLeroy, P.; Nibhanupudy, B.; Li, S.; Star, R. A. Interleukin-10 inhibits ischemic and cisplatin-induced acute renal injury. **Kidney Int**. 2001; 60(6): 2118-28.

Denko, C. W.; Gabriel, P. Effects of peptide hormones in urate crystal inflammation. **J Rheumatol**. 1985; 12(5): 971-5.

Dimitrova, I.; Gesheva, V.; Nikolova, K.; Mihaylova, N.; Todorov, T.; Nikolova, M.; Tchorbanov, A. Target silencing of disease-associated B-lymphocytes by chimeric molecules in SCID model of pristane-induced autoimmunity. **Lupus**. 2010; 19(11): 1261-71.

Doi, K.; Hu, X.; Yuen, P. S.; Leelahavanichkul, A.; Yasuda, H.; Kim, S. M.; Schnermann, J.; Jonassen, T. E.; Frokiaer, J.; Nielsen, S.; Star, R. A. AP214, an analogue of alpha-melanocyte-stimulating hormone, ameliorates sepsis-induced acute kidney injury and mortality. **Kidney Int**. 2008; 73(11): 1266-74.

Dores, R. M. Adrenocorticotrophic hormone, melanocyte-stimulating hormone, and the melanocortin receptors: revisiting the work of Robert Schwyzer: a thirty-year retrospective. **Ann N Y Acad Sci**. 2009; 116393-100.

Dupont, A.; Kastin, A. J.; Labrie, F.; Pelletier, G.; Puviani, R.; Schally, A. V. Distribution of radioactivity in the organs of the rat and mouse after injection of (125I)alpha-melanocyte-stimulating hormone. **J Endocrinol**. 1975; 64(2): 237-41.

Edling, A. E.; Gomes, D.; Weeden, T.; Dzuris, J.; Stefano, J.; Pan, C.; Williams, J.; Kaplan, J.; Perricone, M. A. Immunosuppressive activity of a novel peptide analog of alpha-melanocyte stimulating hormone (alpha-MSH) in experimental autoimmune uveitis. **J Neuroimmunol**. 2011; 236(1-2): 1-9.

Evans-Brown, M.; Dawson, R. T.; Chandler, M.; McVeigh, J. Use of melanotan I and II in the general population. **BMJ**. 2009; 338b566.

Falaschi, F.; Ravelli, A.; Martignoni, A.; Migliavacca, D.; Sartori, M.; Pistorio, A.; Perani, G.; Martini, A. Nephrotic-range proteinuria, the major risk factor for early atherosclerosis in juvenile-onset systemic lupus erythematosus. **Arthritis and rheumatism**. 2000; 43(6): 1405-9.

Fathi, Z.; Iben, L. G.; Parker, E. M. Cloning, expression, and tissue distribution of a fifth melanocortin receptor subtype. **Neurochemical research**. 1995; 20(1): 107-13.

Ferrari, W. Behavioural changes in animals after intracisternal injection with adrenocorticotrophic hormone and melanocyte-stimulating hormone. **Nature**. 1958; 181(4613): 925-6.

Fervenza, F. C. Membranous Nephropathy: ACTH Shows Promise. **Nephrology Times**. 2012 5(2): 12-14.

Figueiredo, J.; Ferreira, A. E.; Silva, R. L.; Ulloa, L.; Grieco, P.; Cunha, T. M.; Ferreira, S. H.; Cunha, F. D.; Kanashiro, A. NDP-MSH inhibits neutrophil migration through nicotinic and adrenergic receptors in experimental peritonitis. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**. 2013;

Frankel, M.; Groen, J.; Hellinga, G. Observations in a patient with chronic nephritis with nephrotic syndrome, during administration of corticotrophic hormone. **J Clin Endocrinol Metab**. 1950; 10(7): 799-800.

Gatti, S.; Colombo, G.; Buffa, R.; Turcatti, F.; Garofalo, L.; Carboni, N.; Ferla, L.; Fassati, L. R.; Lipton, J. M.; Catania, A. alpha-Melanocyte-stimulating hormone protects the allograft in experimental heart transplantation. **Transplantation**. 2002; 74(12): 1678-84.

Getting, S. J. Targeting melanocortin receptors as potential novel therapeutics. **Pharmacology & therapeutics**. 2006; 111(1): 1-15.

Getting, S. J.; Di Filippo, C.; D'Amico, M.; Perretti, M. The melanocortin peptide HP228 displays protective effects in acute models of inflammation and organ damage. **Eur J Pharmacol**. 2006; 532(1-2): 138-44.

Getting, S. J.; Kaneva, M.; Bhadresa, Y.; Renshaw, D.; Leoni, G.; Patel, H. B.; Kerrigan, P. M.; Locke, I. C. Melanocortin peptide therapy for the treatment of arthritic pathologies. **TheScientificWorldJournal**. 2009; 91394-414.

Gigante, A.; Gasperini, M. L.; Afeltra, A.; Barbano, B.; Margiotta, D.; Cianci, R.; De Francesco, I.; Amoroso, A. Cytokines expression in SLE nephritis. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**. 2011; 15(1): 15-24.

Giuliani, D.; Minutoli, L.; Ottani, A.; Spaccapelo, L.; Bitto, A.; Galantucci, M.; Altavilla, D.; Squadrito, F.; Guarini, S. Melanocortins as potential therapeutic agents in severe hypoxic conditions. **Frontiers in neuroendocrinology**. 2012; 33(2): 179-93.

Gold, S. M.; Mohr, D. C.; Huitinga, I.; Flachenecker, P.; Sternberg, E. M.; Heesen, C. The role of stress-response systems for the pathogenesis and progression of MS. **Trends in immunology**. 2005; 26(12): 644-52.

Gong, H.; Wang, W.; Kwon, T. H.; Jonassen, T.; Li, C.; Ring, T.; Froki, A. J.; Nielsen, S. EPO and alpha-MSH prevent ischemia/reperfusion-induced down-regulation of AQP9 and sodium transporters in rat kidney. **Kidney Int**. 2004; 66(2): 683-95.

Gong, R. The renaissance of corticotropin therapy in proteinuric nephropathies. **Nat Rev Nephrol**. 2012; 8(2): 122-8.

Gonindard, C.; Goigoux, C.; Hollande, E.; D'Hinterland, L. D. The administration of an alpha-MSH analogue reduces the serum release of IL-1 alpha and TNF alpha induced by the injection of a sublethal dose of lipopolysaccharides in the BALB/c mouse. **Pigment cell research / sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society**. 1996; 9(3): 148-53.

Grabbe, S.; Bhardwaj, R. S.; Mahnke, K.; Simon, M. M.; Schwarz, T.; Luger, T. A. alpha-Melanocyte-stimulating hormone induces hapten-specific tolerance in mice. **J Immunol**. 1996; 156(2): 473-8.

Granstein, R. D.; Luger, T. A. **Neuroimmunology of the skin : basic science to clinical practice**. Berlin ; London: Springer, 2009. 251 p. ISBN 9783540359869 (hbk.) : 179.00

Granstein, R. D.; Luger, T. A. **Neuroimmunology of the Skin: Basic Science to Clinical Practice**. Springer Berlin Heidelberg, 2009. ISBN 9783540359890.

Haas, K. M.; Watanabe, R.; Matsushita, T.; Nakashima, H.; Ishiura, N.; Okochi, H.; Fujimoto, M.; Tedder, T. F. Protective and pathogenic roles for B cells during systemic autoimmunity in NZB/W F1 mice. **J Immunol**. 2010; 184(9): 4789-800.

Hahn, B. H.; McMahon, M. A.; Wilkinson, A.; Wallace, W. D.; Daikh, D. I.; FitzGerald, J. D.; Karpouzas, G. A.; Merrill, J. T.; Wallace, D. J.; Yazdany, J.; Ramsey-Goldman, R.; Singh, K.; Khalighi, M.; Choi, S.-I.; Gogia, M.; Kafaja, S.; Kamgar, M.; Lau, C.; Martin, W. J.; Parikh, S.; Peng, J.; Rastogi, A.; Chen, W.; Grossman, J. M. American College of Rheumatology guidelines for screening, treatment, and management of lupus nephritis. **Arthritis care & research**. 2012; 64(6): 797-808.

Hamilton, K. J.; Satoh, M.; Swartz, J.; Richards, H. B.; Reeves, W. H. Influence of microbial stimulation on hypergammaglobulinemia and autoantibody production in pristane-induced lupus. **Clin Immunol Immunopathol**. 1998; 86(3): 271-9.

Han, T. S.; Schwartz, M. M.; Lewis, E. J. Association of glomerular podocytopathy and nephrotic proteinuria in mesangial lupus nephritis. **Lupus**. 2006; 15(2): 71-5.

Hanrotel-Saliou, C.; Segalen, I.; Le Meur, Y.; Youinou, P.; Renaudineau, Y. Glomerular Antibodies in Lupus Nephritis. **Clinical reviews in allergy & immunology**. 2010;

Harle, P.; Straub, R. H.; Wiest, R.; Mayer, A.; Scholmerich, J.; Atzeni, F.; Carrabba, M.; Cutolo, M.; Sarzi-Puttini, P. Increase of sympathetic outflow measured by neuropeptide Y and decrease of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis tone in patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis: another example of uncoupling of response systems. **Ann Rheum Dis**. 2006; 65(1): 51-6.

Hart, D. A. Evidence that LiCl enhancement of the survival of NZB/W lupus mice is not mediated by alpha-melanocyte stimulating hormone. **J Trace Microprobe T.** 1998; 16(1): 111-118.

Hata, K.; Hori, K.; Takahashi, S. Role of p38 MAPK in lupeol-induced B16 2F2 mouse melanoma cell differentiation. **Journal of biochemistry.** 2003; 134(3): 441-5.

Haycock, J. W.; Rowe, S. J.; Cartledge, S.; Wyatt, A.; Ghanem, G.; Morandini, R.; Rennie, I. G.; MacNeil, S. Alpha-melanocyte-stimulating hormone reduces impact of proinflammatory cytokine and peroxide-generated oxidative stress on keratinocyte and melanoma cell lines. **J Biol Chem.** 2000; 275(21): 15629-36.

Hench, P. S.; Kendall, E. C.; et al. The effect of a hormone of the adrenal cortex (17-hydroxy-11-dehydrocorticosterone; compound E) and of pituitary adrenocorticotrophic hormone on rheumatoid arthritis. **Mayo Clin Proc.** 1949; 24(8): 181-97.

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

Hradec, J.; Horky, K. Natriuretic and kaliuretic effect of melanocyte-stimulating hormones in hamsters. **Endocrinologia experimentalis.** 1979; 13(3): 145-52.

Huang, S. T.; Chen, G. Y.; Wu, C. H.; Kuo, C. D. Effect of disease activity and position on autonomic nervous modulation in patients with systemic lupus erythematosus. **Clin Rheumatol.** 2008; 27(3): 295-300.

Hurtado, A.; Asato, C.; Escudero, E.; Stromquist, C. S.; Urcia, J.; Hurtado, M. E.; de La Cruz, S.; Wener, M. H.; Zavala, R.; Johnson, R. J. Clinicopathologic correlations in lupus nephritis in Lima, Peru. **Nephron.** 1999; 83(4): 323-30.

Ito, I.; Nishida, M.; Morioka, S.; Nozaki, T.; Imamura, T.; Morimoto, A.; Akioka, S.; Sugimoto, T.; Hamaoka, K.; Hosoi, H. A case of steroid-resistant nephrotic syndrome associated with systemic lupus erythematosus. **Lupus.** 2011;

Iwata, Y.; Furuichi, K.; Kaneko, S.; Wada, T. The role of cytokine in the lupus nephritis. **J Biomed Biotechnol.** 2011; 2011594809.

Jara, L. J. [Neuroimmunoendocrine interaction in autoimmune rheumatic diseases: a new challenge for the rheumatologist]. **Reumatologia clinica.** 2011; 7(2): 85-7.

Jiang, T.; Liu, S. X.; Tan, M.; Huang, F. X.; Sun, T. L.; Dong, X. Q.; Guan, W. M.; Huang, L. H.; Zhou, F. Y. The phase-shift mutation in the glucocorticoid receptor gene: potential etiologic significance of neuroendocrine mechanisms in lupus nephritis. **Clin. Chim. Acta.** 2001; 313(1-2): 113-117.

Jo, S. K.; Yun, S. Y.; Chang, K. H.; Cha, D. R.; Cho, W. Y.; Kim, H. K.; Won, N. H. alpha-MSH decreases apoptosis in ischaemic acute renal failure in rats: possible mechanism of this beneficial effect. **Nephrol Dial Transplant.** 2001; 16(8): 1583-91.

Kadekaro, A. L.; Kanto, H.; Kavanagh, R.; Abdel-Malek, Z. A. Significance of the melanocortin 1 receptor in regulating human melanocyte pigmentation, proliferation, and survival. **Ann N Y Acad Sci.** 2003; 994359-65.

Kammer, G. M.; Tsokos, G. C. **Lupus : molecular and cellular pathogenesis.** Totowa, N.J.: Humana ; Oxford : Blackwell Science, 1999. xx, 708 p. ISBN 0896035565 : 129.50.

Kammoun, K.; Jarraya, F.; Bouhamed, L.; Kharrat, M.; Makni, S.; Hmida, M. B.; Makni, H.; Kaddour, N.; Boudawara, T.; Bahloul, Z.; Hachicha, J. Poor prognostic factors of lupus nephritis. **Saudi J Kidney Dis Transpl.** 2011; 22(4): 727-32.

Kastin, A. J. **Handbook of biologically active peptides**. Amsterdam ; London: Academic Press, 2006. xliii, 1595 p., [40] p. of col. plates ISBN 9780123694423

0123694426.

KDIGO., K. D. I. G. O. K. G. W. G. KDIGO Clinical Practice Guideline for Glomerulonephritis. **Kidney inter., Suppl.** 2012; 2(2): 139–274.

Kim, H. S.; Cho, D. H.; Kim, H. J.; Lee, J. Y.; Cho, B. K.; Park, H. J. Immunoreactivity of corticotropin-releasing hormone, adrenocorticotrophic hormone and alpha-melanocyte-stimulating hormone in alopecia areata. **Experimental dermatology**. 2006; 15(7): 515-22.

Kim, J. E.; Cho, D. H.; Kim, H. S.; Kim, H. J.; Lee, J. Y.; Cho, B. K.; Park, H. J. Expression of the corticotropin-releasing hormone-proopiomelanocortin axis in the various clinical types of psoriasis. **Experimental dermatology**. 2007; 16(2): 104-9.

Kokot, A.; Sindrilaru, A.; Schiller, M.; Sunderkotter, C.; Kerkhoff, C.; Eckes, B.; Scharffetter-Kochanek, K.; Luger, T. A.; Bohm, M. alpha-melanocyte-stimulating hormone suppresses bleomycin-induced collagen synthesis and reduces tissue fibrosis in a mouse model of scleroderma: melanocortin peptides as a novel treatment strategy for scleroderma? **Arthritis and rheumatism**. 2009; 60(2): 592-603.

Kolgazi, M.; Arbak, S.; Alican, I. The effect of alpha-melanocyte stimulating hormone on gentamicin-induced acute nephrotoxicity in rats. **J Appl Toxicol**. 2007; 27(2): 183-8.

Kuhn, A.; Lehmann, P.; Ruzicka, T. **Cutaneous lupus erythematosus**. Berlin ; New York: Springer, 2005. xvii, 451 p. ISBN 3540442669 (acid-free paper).

Kuroda, Y.; Nacionales, D. C.; Akaogi, J.; Reeves, W. H.; Satoh, M. Autoimmunity induced by adjuvant hydrocarbon oil components of vaccine. **Biomed Pharmacother**. 2004; 58(5): 325-37.

Kuroda, Y.; Ono, N.; Akaogi, J.; Nacionales, D. C.; Yamasaki, Y.; Barker, T. T.; Reeves, W. H.; Satoh, M. Induction of lupus-related specific autoantibodies by non-specific inflammation caused by an intraperitoneal injection of n-hexadecane in BALB/c mice. **Toxicology**. 2006; 218(2-3): 186-96.

Kwon, T. H.; Frokiaer, J.; Fernandez-Llama, P.; Knepper, M. A.; Nielsen, S. Reduced abundance of aquaporins in rats with bilateral ischemia-induced acute renal failure: prevention by alpha-MSH. **Am J Physiol**. 1999; 277(3 Pt 2): F413-27.

Kwon, T. H.; Frokiaer, J.; Han, J. S.; Knepper, M. A.; Nielsen, S. Decreased abundance of major Na(+) transporters in kidneys of rats with ischemia-induced acute renal failure. **Am J Physiol Renal Physiol**. 2000; 278(6): F925-39.

Lahita, R. G. **Systemic lupus erythematosus**. Academic Press, 2004. ISBN 9780124339019.

Lajtha, A.; Tettamanti, G.; Goracci, G. **Handbook of neurochemistry and molecular neurobiology : Behavioral Neurochemistry, Neuroendocrinology and Molecular Neurobiology**. 3rd ed. New York ; London: Springer, 2007. 1 v. ISBN 978-0-387-30362-8 (hbk.) : No price

Lassalle, M. W.; Igarashi, S.; Sasaki, M.; Wakamatsu, K.; Ito, S.; Horikoshi, T. Effects of melanogenesis-inducing nitric oxide and histamine on the production of eumelanin and pheomelanin in cultured human melanocytes. **Pigment cell research / sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society**. 2003; 16(1): 81-4.

Lechner, O.; Dietrich, H.; Oliveira dos Santos, A.; Wieggers, G. J.; Schwarz, S.; Harbutz, M.; Herold, M.; Wick, G. Altered circadian rhythms of the stress hormone and melatonin response in lupus-prone MRL/MP-fas(lpr) mice. **Journal of autoimmunity**. 2000; 14(4): 325-33.

Lechner, O.; Hu, Y.; JafarianTehrani, M.; Dietrich, H.; Schwarz, S.; Herold, M.; Haour, F.; Wick, G. Disturbed immunoendocrine communication via the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in murine lupus. **Brain Behav. Immun.** 1996; 10(4): 337-350.

Lee, P. Y.; Kumagai, Y.; Li, Y.; Takeuchi, O.; Yoshida, H.; Weinstein, J.; Kellner, E. S.; Nacionales, D.; Barker, T.; Kelly-Scumpia, K.; van Rooijen, N.; Kumar, H.; Kawai, T.; Satoh, M.; Akira, S.; Reeves, W. H. TLR7-dependent and FcgammaR-independent production of type I interferon in experimental mouse lupus. **J Exp Med**. 2008; 205(13): 2995-3006.

Lee, S. Y.; Jo, S. K.; Cho, W. Y.; Kim, H. K.; Won, N. H. The effect of alpha-melanocyte-stimulating hormone on renal tubular cell apoptosis and tubulointerstitial fibrosis in cyclosporine A nephrotoxicity. **Transplantation**. 2004; 78(12): 1756-64.

Lee, T. H.; Jawan, B.; Chou, W. Y.; Lu, C. N.; Wu, C. L.; Kuo, H. M.; Concejero, A. M.; Wang, C. H. Alpha-melanocyte-stimulating hormone gene therapy reverses carbon tetrachloride induced liver fibrosis in mice. **The journal of gene medicine**. 2006; 8(6): 764-72.

Lee, Y. S.; Park, J. J.; Chung, K. Y. Change of melanocortin receptor expression in rat kidney ischemia-reperfusion injury. **Transplant Proc**. 2008; 40(7): 2142-4.

Li, C.; Shi, Y.; Wang, W.; Sardeli, C.; Kwon, T. H.; Thomsen, K.; Jonassen, T.; Djurhuus, J. C.; Knepper, M. A.; Nielsen, S.; Frokiaer, J. alpha-MSH prevents impairment in renal function and dysregulation of AQP5 and Na-K-ATPase in rats with bilateral ureteral obstruction. **Am J Physiol Renal Physiol**. 2006; 290(2): F384-96.

Lin, L.; Gerth, A. J.; Peng, S. L. Susceptibility of mast cell-deficient W/W^v mice to pristane-induced experimental lupus nephritis. **Immunology letters**. 2004; 91(2-3): 93-7.

Lindskog, A.; Ebefors, K.; Johansson, M. E.; Stefansson, B.; Granqvist, A.; Arnadottir, M.; Berg, A. L.; Nystrom, J.; Haraldsson, B. Melanocortin 1 receptor agonists reduce proteinuria. **J Am Soc Nephrol**. 2010; 21(8): 1290-8.

Lindskog, J. A. **The role of melanocortin 1 receptor in kidney disease**. Göteborg: Institute of Medicine, Sahlgrenska Academy, University of Gothenburg 2012.

Liu, C.; Chen, X.; Jin, Y.; Qu, R.; Jiang, P. F.; Wen, G. M.; Tang, Z. H. Effects of calcitonin gene-related peptide on apoptosis of peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus. **Clinical and experimental dermatology**. 2007; 32(6): 650-3.

Llorente, L.; Richaud-Patin, Y.; Garcia-Padilla, C.; Claret, E.; Jazek-Ocampo, J.; Cardiel, M. H.; Alcocer-Varela, J.; Grangeot-Keros, L.; Alarcon-Segovia, D.; Wijdenes, J.; Galanaud, P.; Emilie, D. Clinical and biologic effects of anti-interleukin-10 monoclonal antibody administration in systemic lupus erythematosus. **Arthritis and rheumatism**. 2000; 43(8): 1790-800.

Lombel, R. M.; Hodson, E. M.; Gipson, D. S. Treatment of steroid-resistant nephrotic syndrome in children: new guidelines from KDIGO. **Pediatr Nephrol**. 2013; 28(3): 409-14.

Lu, M. C.; Lai, N. S.; Li, K. J.; Hsieh, S. C.; Wu, C. H.; Yu, C. L. Increased multidrug resistance-associated protein activity in mononuclear cells of patients with systemic lupus erythematosus. **Clin Exp Rheumatol**. 2008; 26(4): 638-45.

Ludovico-Martins, H.; Silva, C.; Teodoro, W. R.; Martini Filho, D.; Noronha, I. L. Analysis of different staining techniques for c4d detection in renal allograft biopsies. **Transplant Proc**. 2009; 41(3): 862-5.

Luger, T. A. Immunomodulation by UV light: role of neuropeptides. **European journal of dermatology : EJD**. 1998; 8(3): 198-9.

Luger, T. A. **Cutaneous neuroimmunomodulation : the proopiomelanocortin system**. New York: New York Academy of Sciences, 1999. xiv, 479 p. ISBN 1573312002 (cased)

Luger, T. A.; Brzoska, T. alpha-MSH related peptides: a new class of anti-inflammatory and immunomodulating drugs. **Ann Rheum Dis**. 2007; 66 Suppl 3iii52-5.

Luger, T. A.; Brzoska, T.; Scholzen, T. E.; Kalden, D. H.; Sunderkotter, C.; Armstrong, C.; Ansel, J. The role of alpha-MSH as a modulator of cutaneous inflammation. **Ann N Y Acad Sci**. 2000; 917232-8.

Luger, T. A.; Scholzen, T.; Brzoska, T.; Becher, E.; Slominski, A.; Paus, R. Cutaneous immunomodulation and coordination of skin stress responses by alpha-melanocyte-stimulating hormone. **Ann N Y Acad Sci**. 1998; 840381-94.

Maaser, C.; Kannengiesser, K.; Specht, C.; Luger, T. A.; Brzoska, T.; Luger, T. A.; Domschke, W.; Kucharzik, T. Crucial role of the melanocortin receptor MC1R in experimental colitis. **Gut**. 2006; 55(10): 1415-22.

Makni, K.; Jarraya, F.; Khabir, A.; Hentati, B.; Hmida, M. B.; Makni, H.; Boudawara, T.; Jilidi, R.; Hachicha, J.; Ayadi, H. Renal alpha-smooth muscle actin: a new prognostic factor for lupus nephritis. **Nephrology (Carlton)**. 2009; 14(5): 499-505.

Mandriks, I.; Muceniece, R.; Wikberg, J. E. Effects of melanocortin peptides on lipopolysaccharide/interferon-gamma-induced NF-kappaB DNA binding and nitric oxide production in macrophage-like RAW 264.7 cells: evidence for dual mechanisms of action. **Biochemical pharmacology**. 2001; 61(5): 613-21.

Mandriks, I.; Muceniece, R.; Wikberg, J. E. S. Effects of melanocortin peptides on lipopolysaccharide/interferon-gamma-induced NF-kappaB DNA binding and nitric oxide production in macrophage-like RAW 264.7 cells: Evidence for dual mechanisms of action. **Biochem. Pharmacol**. 2001; 61(5): 613-621.

Manna, S. K.; Sarkar, A.; Sreenivasan, Y. Alpha-melanocyte-stimulating hormone down-regulates CXC receptors through activation of neutrophil elastase. **Eur J Immunol**. 2006; 36(3): 754-69.

Mattos, P.; Santiago, M. B. Disease activity in systemic lupus erythematosus patients with end-stage renal disease: systematic review of the literature. **Clin Rheumatol**. 2012; 31(6): 897-905.

McWhinnie, D. L.; Thompson, J. F.; Taylor, H. M.; Chapman, J. R.; Bolton, E. M.; Carter, N. P.; Wood, R. F.; Morris, P. J. Morphometric analysis of cellular infiltration assessed by monoclonal antibody labeling in sequential human renal allograft biopsies. **Transplantation**. 1986; 42(4): 352-8.

Melmed, S. **The Pituitary: Third Edition**. Elsevier Science, 2010. ISBN 9780123809278.

Migliorini, A.; Anders, H. J. A novel pathogenetic concept-antiviral immunity in lupus nephritis. **Nat Rev Nephrol**. 2012; 8(3): 183-9.

Millington, G. W. Proopiomelanocortin (POMC): the cutaneous roles of its melanocortin products and receptors. **Clinical and experimental dermatology**. 2006; 31(3): 407-12.

Min, Y.; Han, D.; Fu, Z.; Wang, H.; Liu, L.; Tian, Y. alpha-MSH inhibits TNF-alpha-induced maturation of human dendritic cells in vitro through the up-regulation of ANXA1. **Acta biochimica et biophysica Sinica**. 2011; 43(1): 61-8.

Minhas, U.; Minz, R.; Bhatnagar, A. Prophylactic effect of Withania somnifera on inflammation in a non-autoimmune prone murine model of lupus. **Drug discoveries & therapeutics**. 2011; 5(4): 195-201.

Minhas, U.; Minz, R.; Das, P.; Bhatnagar, A. Therapeutic effect of *Withania somnifera* on pristane-induced model of SLE. **Inflammopharmacology**. 2012; 20(4): 195-205.

Mok, C. C.; Lau, C. S. Pathogenesis of systemic lupus erythematosus. **J Clin Pathol**. 2003; 56(7): 481-90.

Mota, L. M. H. d.; Haddad, G. P.; Lima, R. A. C.; Carvalho, J. F. d.; Muniz-Junqueira, M. I.; Santos Neto, L. L. d.; Lima, F. A. C. Lúpus induzido por drogas: da imunologia básica à aplicada. **Rev Bras Reumatol**. 2007; 47431-437.

Muceniece, R.; Krigere, L.; Suli-Vargha, H.; Wikberg, J. E. Effects of alpha-melanotropin C-terminal tripeptide analogues on macrophage NO production. **Peptides**. 2003; 24(5): 701-7.

Muceniece, R.; Zvejniece, L.; Kirjanova, O.; Liepinsh, E.; Krigere, L.; Baumane, L.; Kalvinsh, I.; Wikberg, J. E.; Dambrova, M. Beta- and gamma-melanocortins inhibit lipopolysaccharide induced nitric oxide production in mice brain. **Brain research**. 2004; 995(1): 7-13.

Muceniece, R.; Zvejniece, L.; Liepinsh, E.; Kirjanova, O.; Baumane, L.; Petrovska, R.; Mutulis, F.; Mutule, I.; Kalvinsh, I.; Wikberg, J. E.; Dambrova, M. The MC3 receptor binding affinity of melanocortins correlates with the nitric oxide production inhibition in mice brain inflammation model. **Peptides**. 2006; 27(6): 1443-50.

Murphy, M. T.; Richards, D. B.; Lipton, J. M. Antipyretic potency of centrally administered alpha-melanocyte stimulating hormone. **Science**. 1983; 221(4606): 192-3.

Namba, K.; Kitaichi, N.; Nishida, T.; Taylor, A. W. Induction of regulatory T cells by the immunomodulating cytokines alpha-melanocyte-stimulating hormone and transforming growth factor-beta2. **J Leukoc Biol**. 2002; 72(5): 946-52.

Nelson, M. E.; Bryant, S. M.; Aks, S. E. Melanotan II injection resulting in systemic toxicity and rhabdomyolysis. **Clinical toxicology**. 2012; 50(10): 1169-73.

Nery, L. E.; Castrucci, A. M. Pigment cell signalling for physiological color change. **Comparative biochemistry and physiology. Part A, Physiology**. 1997; 118(4): 1135-44.

Newton, R. A.; Roberts, D. W.; Leonard, J. H.; Sturm, R. A. Human melanocytes expressing MC1R variant alleles show impaired activation of multiple signaling pathways. **Peptides**. 2007; 28(12): 2387-96.

Ni, X. P.; Bhargava, A.; Pearce, D.; Humphreys, M. H. Modulation by dietary sodium intake of melanocortin 3 receptor mRNA and protein abundance in the rat kidney. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**. 2006; 290(3): R560-7.

Nozaki, M.; Takahashi, A.; Amemiya, Y.; Kawauchi, H.; Sower, S. A. Distribution of lamprey adrenocorticotropin and melanotropins in the pituitary of the adult sea lamprey, *Petromyzon marinus*. **General and comparative endocrinology**. 1995; 98(2): 147-56.

Oates, J. C.; Gilkeson, G. S. The biology of nitric oxide and other reactive intermediates in systemic lupus erythematosus. **Clin Immunol**. 2006; 121(3): 243-50.

Ooi, J. D.; Kitching, A. R. CD4+ Th1 cells are effectors in lupus nephritis--but what are their targets? **Kidney Int**. 2012; 82(9): 947-9.

Orias, R.; McCann, S. M. Natriuretic effect of alpha-MSH in the water-loaded rat. **Proc Soc Exp Biol Med**. 1970; 133(2): 469-74.

Orias, R.; McCann, S. M. Natriuresis induced by alpha and beta melanocyte stimulating hormone (MSH) in rats. **Endocrinology**. 1972a; 90(3): 700-6.

Orias, R.; McCann, S. M. Natriuretic effect of alpha melanocyte stimulating hormone (α-MSH) in hypophysectomized or adrenalectomized rats. **Proc Soc Exp Biol Med**. 1972b; 139(3): 872-6.

Ouyang, S.; Gong, B.; Li, J. Z.; Zhao, L. X.; Wu, W.; Zhang, F. S.; Sun, L.; Wang, S. J.; Pan, M.; Li, C.; Liang, W.; Shaw, N.; Zheng, J.; Zhao, G. P.; Wang, Y.; Liu, Z. J.; Liang, M. Structural insights into a human anti-IFN antibody exerting therapeutic potential for systemic lupus erythematosus. **J Mol Med (Berl)**. 2012;

Parker, A. J.; Wessely, S.; Cleare, A. J. The neuroendocrinology of chronic fatigue syndrome and fibromyalgia. **Psychological medicine**. 2001; 31(8): 1331-45.

Patel, H. B.; Bombardieri, M.; Sampaio, A. L. F.; D'Acquisto, F.; Gray, M.; Grieco, P.; Getting, S. J.; Pitzalis, C.; Perretti, M. Anti-inflammatory and antiosteoclastogenesis properties of endogenous melanocortin receptor type 3 in experimental arthritis. **Faseb Journal**. 2010; 24(12): 4835-4843.

Patel, H. B.; Leoni, G.; Melendez, T. M.; Sampaio, A. L. F.; Perretti, M. Melanocortin Control of Cell Trafficking in Vascular Inflammation. **Melanocortins: Multiple Actions and Therapeutic Potential**. 2010; 68188-106.

Patten, C.; Bush, K.; Rioja, I.; Morgan, R.; Wooley, P.; Trill, J.; Life, P. Characterization of pristane-induced arthritis, a murine model of chronic disease: response to antirheumatic agents, expression of joint cytokines, and immunopathology. **Arthritis and rheumatism**. 2004; 50(10): 3334-45.

Perry, D.; Sang, A.; Yin, Y.; Zheng, Y. Y.; Morel, L. Murine models of systemic lupus erythematosus. **J Biomed Biotechnol**. 2011; 2011271694.

Petri, M.; Orbai, A. M.; Alarcon, G. S.; Gordon, C.; Merrill, J. T.; Fortin, P. R.; Bruce, I. N.; Isenberg, D.; Wallace, D. J.; Nived, O.; Sturfelt, G.; Ramsey-Goldman, R.; Bae, S. C.; Hanly, J. G.; Sanchez-Guerrero, J.; Clarke, A.; Aranow, C.; Manzi, S.; Urowitz, M.; Gladman, D.; Kalunian, K.; Costner, M.; Werth, V. P.; Zoma, A.; Bernatsky, S.; Ruiz-Irastorza, G.; Khamashta, M. A.; Jacobsen, S.; Buyon, J. P.; Maddison, P.; Dooley, M. A.; van Vollenhoven, R. F.; Ginzler, E.; Stoll, T.; Peschken, C.; Jorizzo, J. L.; Callen, J. P.; Lim, S. S.; Fessler, B. J.; Inanc, M.; Kamen, D. L.; Rahman, A.; Steinsson, K.; Franks, A. G., Jr.; Sigler, L.; Hameed, S.; Fang, H.; Pham, N.; Brey, R.; Weisman, M. H.; McGwin, G., Jr.; Magder, L. S. Derivation and validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. **Arthritis and rheumatism**. 2012; 64(8): 2677-86.

PicancoDiniz, D. L. W.; RibeiroOliveira, G.; Favaretto, A. L. V.; Gutkowska, J.; McCann, S. M.; AntunesRodrigues, J. Does plasma ANP participate in natriuresis induced by alpha-MSH? **Braz. J. Med. Biol. Res**. 1997; 30(4): 459-463.

Pichler, R.; Sfetsos, K.; Badics, B.; Gutenbrunner, S.; Aubock, J. Vitiligo patients present lower plasma levels of alpha-melanotropin immunoreactivities. **Neuropeptides**. 2006; 40(3): 177-83.

Plantinga, L. C.; Verhaagen, J.; Edwards, P. M.; Schrama, L. H.; Burbach, J. P.; Gispen, W. H. Expression of the pro-opiomelanocortin gene in dorsal root ganglia, spinal cord and sciatic nerve after sciatic nerve crush in the rat. **Brain research. Molecular brain research**. 1992; 16(1-2): 135-42.

Polito, M. G.; de Moura, L. A.; Kirsztajn, G. M. An overview on frequency of renal biopsy diagnosis in Brazil: clinical and pathological patterns based on 9,617 native kidney biopsies. **Nephrol Dial Transplant**. 2010; 25(2): 490-6.

Pollard, K. M. **Autoantibodies and autoimmunity : molecular mechanisms in health and disease**. Weinheim: Wiley-VCH, 2006. xxv, 608 p. ISBN 3527311416

Ponticelli, C.; Passerini, P.; Salvadori, M.; Manno, C.; Viola, B. F.; Pasquali, S.; Mandolfo, S.; Messa, P. A randomized pilot trial comparing methylprednisolone plus a cytotoxic agent versus synthetic adrenocorticotrophic hormone in idiopathic membranous nephropathy. **Am J Kidney Dis.** 2006; 47(2): 233-40.

Raap, U.; Brzoska, T.; Sohl, S.; Path, G.; Emmel, J.; Herz, U.; Braun, A.; Luger, T.; Renz, H. Alpha-melanocyte-stimulating hormone inhibits allergic airway inflammation. **J Immunol.** 2003; 171(1): 353-9.

Rajora, N.; Boccoli, G.; Catania, A.; Lipton, J. M. alpha-MSH modulates experimental inflammatory bowel disease. **Peptides.** 1997; 18(3): 381-5.

Redondo, P.; Garcia-Foncillas, J.; Okroujnov, I.; Bandres, E. Alpha-MSH regulates interleukin-10 expression by human keratinocytes. **Archives of dermatological research.** 1998; 290(8): 425-8.

Reeves, W. H.; Lee, P. Y.; Weinstein, J. S.; Satoh, M.; Lu, L. Induction of autoimmunity by pristane and other naturally occurring hydrocarbons. **Trends in immunology.** 2009; 30(9): 455-64.

Rheins, L. A.; Coteleur, A. L.; Kleier, R. S.; Hoppenjans, W. B.; Saunder, D. N.; Nordlund, J. J. Alpha-melanocyte stimulating hormone modulates contact hypersensitivity responsiveness in C57/BL6 mice. **The Journal of investigative dermatology.** 1989; 93(4): 511-7.

Richards, H. B.; Satoh, M.; Jennette, J. C.; Croker, B. P.; Yoshida, H.; Reeves, W. H. Interferon-gamma is required for lupus nephritis in mice treated with the hydrocarbon oil pristane. **Kidney Int.** 2001; 60(6): 2173-80.

Richards, H. B.; Satoh, M.; Jennette, J. C.; Okano, T.; Kanwar, Y. S.; Reeves, W. H. Disparate T cell requirements of two subsets of lupus-specific autoantibodies in pristane-treated mice. **Clin Exp Immunol.** 1999; 115(3): 547-53.

Richards, H. B.; Satoh, M.; Jennette, J. C.; Reeves, W. H. Nephritis and anti-dsDNA autoantibody production in pristane-induced lupus are IL-6 dependent. **Arthritis Rheum.** 1997; 40(9): 618-618.

Richards, H. B.; Satoh, M.; Shaw, M.; Libert, C.; Poli, V.; Reeves, W. H. Interleukin 6 dependence of anti-DNA antibody production: evidence for two pathways of autoantibody formation in pristane-induced lupus. **J Exp Med.** 1998; 188(5): 985-90.

Rinne, P.; Tikka, S.; Makela, S.; Streng, T.; Savontaus, E. Hemodynamic actions and mechanisms of systemically administered alpha-MSH analogs in mice. **Peptides.** 2012; 38(1): 150-8.

Romick-Rosendale, L. E.; Brunner, H. I.; Bennett, M. R.; Mina, R.; Nelson, S.; Petri, M.; Kiani, A.; Devarajan, P.; Kennedy, M. A. Identification of urinary metabolites that distinguish membranous lupus nephritis from proliferative lupus nephritis and focal segmental glomerulosclerosis. **Arthritis Res Ther.** 2011; 13(6): R199.

Rose, N. R.; Mackay, I. R. **The autoimmune diseases.** 4th ed. Amsterdam ; London: Elsevier Academic Press, 2006. xxv, 1134 p., [28] p. of plates ISBN 9780125959612 (hbk.) : 112.50

Rovensky, J.; Blazickova, S.; Rauova, L.; Jezova, D.; Koska, J.; Lukac, J.; Vigas, M. The hypothalamic-pituitary response in SLE. Regulation of prolactin, growth hormone and cortisol release. **Lupus.** 1998; 7(6): 409-13.

Sandyk, R.; Awerbuch, G. I. Nocturnal plasma melatonin and alpha-melanocyte stimulating hormone levels during exacerbation of multiple sclerosis. **The International journal of neuroscience.** 1992; 67(1-4): 173-86.

Satoh, M.; Hamilton, K. J.; Ajmani, A. K.; Dong, X.; Wang, J.; Kanwar, Y. S.; Reeves, W. H. Autoantibodies to ribosomal P antigens with immune complex glomerulonephritis in SJL mice treated with pristane. **J Immunol.** 1996; 157(7): 3200-6.

- Satoh, M.; Kumar, A.; Kanwar, Y. S.; Reeves, W. H. Antinuclear Antibody-Production and Immune-Complex Glomerulonephritis in Balb/C Mice Treated with Pristane. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 1995; 92(24): 10934-10938.
- Satoh, M.; Richards, H. B.; Shaheen, V. M.; Yoshida, H.; Shaw, M.; Naim, J. O.; Wooley, P. H.; Reeves, W. H. Widespread susceptibility among inbred mouse strains to the induction of lupus autoantibodies by pristane. **Clin Exp Immunol**. 2000; 121(2): 399-405.
- Savarese, E.; Steinberg, C.; Pawar, R. D.; Reindl, W.; Akira, S.; Anders, H. J.; Krug, A. Requirement of Toll-like receptor 7 for pristane-induced production of autoantibodies and development of murine lupus nephritis. **Arthritis and rheumatism**. 2008; 58(4): 1107-15.
- Sawyer, T. K.; Castrucci, A. M.; Staples, D. J.; Affholter, J. A.; De Vaux, A.; Hruby, V. J.; Hadley, M. E. Structure-activity relationships of [Nle4, D-Phe7]alpha-MSH. Discovery of a tripeptidyl agonist exhibiting sustained bioactivity. **Ann N Y Acad Sci**. 1993; 680:597-9.
- Scholzen, T.; Armstrong, C. A.; Bunnett, N. W.; Luger, T. A.; Olerud, J. E.; Ansel, J. C. Neuropeptides in the skin: interactions between the neuroendocrine and the skin immune systems. **Experimental dermatology**. 1998; 7(2-3): 81-96.
- Scholzen, T. E.; Brzoska, T.; Kalden, D. H.; Hartmeyer, M.; Fastrich, M.; Luger, T. A.; Armstrong, C. A.; Ansel, J. C. Expression of functional melanocortin receptors and proopiomelanocortin peptides by human dermal microvascular endothelial cells. **Ann N Y Acad Sci**. 1999; 885:239-53.
- Scholzen, T. E.; Brzoska, T.; Kalden, D. H.; O'Reilly, F.; Armstrong, C. A.; Luger, T. A.; Ansel, J. C. Effect of ultraviolet light on the release of neuropeptides and neuroendocrine hormones in the skin: mediators of photodermatitis and cutaneous inflammation. **The journal of investigative dermatology. Symposium proceedings / the Society for Investigative Dermatology, Inc. [and] European Society for Dermatological Research**. 1999; 4(1): 55-60.
- Scholzen, T. E.; Konig, S.; Fastrich, M.; Bohm, M.; Luger, T. A. Terminating the stress: peripheral peptidolysis of proopiomelanocortin-derived regulatory hormones by the dermal microvascular endothelial cell extracellular peptidases neprilysin and angiotensin-converting enzyme. **Endocrinology**. 2007; 148(6): 2793-805.
- Scholzen, T. E.; Sunderkotter, C.; Kalden, D. H.; Brzoska, T.; Fastrich, M.; Fisbeck, T.; Armstrong, C. A.; Ansel, J. C.; Luger, T. A. Alpha-melanocyte stimulating hormone prevents lipopolysaccharide-induced vasculitis by down-regulating endothelial cell adhesion molecule expression. **Endocrinology**. 2003; 144(1): 360-70.
- Schwartz, M.; Sonne, L. M. [ACTH therapy of lupus erythematosus disseminatus]. **Ugeskr Laeger**. 1950; 112(12): 402-6.
- Schwartz, T. B. Effect of Acth and Cortisone on the Course of Disseminated Lupus Erythematosus. **Am. J. Med**. 1953; 14(6): 759-759.
- Seemayer, C. A.; Gaspert, A.; Nickleit, V.; Mihatsch, M. J. C4d staining of renal allograft biopsies: a comparative analysis of different staining techniques. **Nephrol Dial Transplant**. 2007; 22(2): 568-76.
- Sesso, R. d. C. C.; Lopes, A. A.; Thomé, F. S.; Lugon, J. R.; Watanabe, Y.; Santos, D. R. d. Diálise Crônica no Brasil - Relatório do Censo Brasileiro de Diálise, 2011. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**. 2012; 34:272-277.
- Shaheen, V. M.; Satoh, M.; Richards, H. B.; Yoshida, H.; Shaw, M.; Jennette, J. C.; Reeves, W. H. Immunopathogenesis of environmentally induced lupus in mice. **Environ Health Perspect**. 1999; 107 Suppl 5:723-7.
- Shalimar; Handa, R.; Deepak, K. K.; Bhatia, M.; Aggarwal, P.; Pandey, R. M. Autonomic dysfunction in systemic lupus erythematosus. **Rheumatol Int**. 2006; 26(9): 837-40.

Shirotta, Y.; Yarboro, C.; Fischer, R.; Pham, T. H.; Lipsky, P.; Illei, G. G. Impact of anti-interleukin-6 receptor blockade on circulating T and B cell subsets in patients with systemic lupus erythematosus. **Ann Rheum Dis.** 2013; 72(1): 118-28.

Si, J.; Ge, Y.; Zhuang, S.; Juan Wang, L.; Chen, S.; Gong, R. Adrenocorticotrophic hormone ameliorates acute kidney injury by steroidogenic-dependent and -independent mechanisms. **Kidney Int.** 2013;

Silverman, M. N.; Sternberg, E. M. Neuroendocrine-immune interactions in rheumatoid arthritis: mechanisms of glucocorticoid resistance. **Neuroimmunomodulation.** 2008; 15(1): 19-28.

Silverman, M. N.; Sternberg, E. M. Glucocorticoid regulation of inflammation and its functional correlates: from HPA axis to glucocorticoid receptor dysfunction. **Ann N Y Acad Sci.** 2012; 1261(1): 55-63.

Simmons, M. N.; Subramanian, V.; Crouzet, S.; Haber, G. P.; Colombo, J. R., Jr.; Ukimura, O.; Nielsen, S.; Gill, I. S. Alpha-melanocyte stimulating hormone analogue AP214 protects against ischemia induced acute kidney injury in a porcine surgical model. **J Urol.** 2010; 183(4): 1625-9.

Smalley, K.; Eisen, T. The involvement of p38 mitogen-activated protein kinase in the alpha-melanocyte stimulating hormone (alpha-MSH)-induced melanogenic and anti-proliferative effects in B16 murine melanoma cells. **FEBS letters.** 2000; 476(3): 198-202.

Smalley, K. S.; Eisen, T. G. Differentiation of human melanoma cells through p38 MAP kinase is associated with decreased retinoblastoma protein phosphorylation and cell cycle arrest. **Melanoma research.** 2002; 12(3): 187-92.

Smith, A. G.; Shuster, S.; Comaish, J. S.; Plummer, N. A.; Thody, A. J.; Alvarez-Ude, F.; Kerr, D. N. Plasma immunoreactive beta-melanocyte-stimulating hormone and skin pigmentation in chronic renal failure. **Br Med J.** 1975; 1(5959): 658-9.

Smith, R. M.; Clatworthy, M. R.; Jayne, D. R. Biological therapy for lupus nephritis-tribulations and trials. **Nature reviews. Rheumatology.** 2010; 6(9): 547-52.

Srinivasan, V.; Maestroni, G. J.; Cardinali, D. P.; Esquifino, A. I.; Perumal, S. R.; Miller, S. C. Melatonin, immune function and aging. **Immun Ageing.** 2005; 217.

Star, R. A.; Rajora, N.; Huang, J.; Stock, R. C.; Catania, A.; Lipton, J. M. Evidence of autocrine modulation of macrophage nitric oxide synthase by alpha-melanocyte-stimulating hormone. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 1995; 92(17): 8016-20.

Stasi, C.; Orlandelli, E. Role of the brain-gut axis in the pathophysiology of Crohn's disease. **Digestive diseases.** 2008; 26(2): 156-66.

Sternberg, E. M.; Hill, J. M.; Chrousos, G. P.; Kamilaris, T.; Listwak, S. J.; Gold, P. W.; Wilder, R. L. Inflammatory mediator-induced hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation is defective in streptococcal cell wall arthritis-susceptible Lewis rats. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 1989; 86(7): 2374-8.

Summers, S. A.; Hoi, A.; Steinmetz, O. M.; O'Sullivan, K. M.; Ooi, J. D.; Odobasic, D.; Akira, S.; Kitching, A. R.; Holdsworth, S. R. TLR9 and TLR4 are required for the development of autoimmunity and lupus nephritis in pristane nephropathy. **Journal of autoimmunity.** 2010; 35(4): 291-8.

Sunderkotter, C.; Kalden, H.; Brzoska, T.; Sorg, C.; Luger, T. A. alpha-MSH reduces vasculitis in the local Shwartzman reaction. **Ann N Y Acad Sci.** 1999; 885:414-8.

Szyper-Kravitz, M.; Zandman-Goddard, G.; Lahita, R. G.; Shoenfeld, Y. The Neuroendocrine-Immune Interactions in Systemic Lupus Erythematosus: A Basis for Understanding Disease Pathogenesis and Complexity. **Rheumatic Disease Clinics of North America.** 2005; 31(1): 161-175.

Taherzadeh, S.; Sharma, S.; Chhajlani, V.; Gantz, I.; Rajora, N.; Demitri, M. T.; Kelly, L.; Zhao, H.; Ichiyama, T.; Catania, A.; Lipton, J. M. alpha-MSH and its receptors in regulation of tumor necrosis factor-alpha production by human monocyte/macrophages. **Am J Physiol**. 1999; 276(5 Pt 2): R1289-94.

Takahashi, A.; Amemiya, Y.; Sarashi, M.; Sower, S. A.; Kawauchi, H. Melanotropin and corticotropin are encoded on two distinct genes in the lamprey, the earliest evolved extant vertebrate. **Biochemical and biophysical research communications**. 1995; 213(2): 490-8.

Taraphder, A. Adrenocorticotrophic hormone (ACTH): A forgotten tool in the treatment of proteinuric nephropathies. **Apollo Medicine**. 2013; 10(1): 15-18.

Taylor, A.; Namba, K. In vitro induction of CD25+ CD4+ regulatory T cells by the neuropeptide alpha-melanocyte stimulating hormone (alpha-MSH). **Immunol Cell Biol**. 2001; 79(4): 358-67.

Taylor, A. W. Modulation of regulatory T cell immunity by the neuropeptide alpha-melanocyte stimulating hormone. **Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)**. 2003; 49(2): 143-9.

Taylor, A. W. The immunomodulating neuropeptide alpha-melanocyte-stimulating hormone (alpha-MSH) suppresses LPS-stimulated TLR4 with IRAK-M in macrophages. **J Neuroimmunol**. 2005; 162(1-2): 43-50.

Taylor, A. W.; Kitaichi, N. The diminishment of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) by neuropeptide alpha-melanocyte stimulating hormone (alpha-MSH) therapy. **Brain, behavior, and immunity**. 2008; 22(5): 639-46.

Taylor, A. W.; Lee, D. Applications of the role of alpha-MSH in ocular immune privilege. **Adv Exp Med Biol**. 2010; 681:143-9.

Taylor, A. W.; Lee, D. J. The alpha-melanocyte stimulating hormone induces conversion of effector T cells into treg cells. **J Transplant**. 2011; 2011:246856.

Taylor, A. W.; Streilein, J. W.; Cousins, S. W. Identification of alpha-melanocyte stimulating hormone as a potential immunosuppressive factor in aqueous humor. **Curr Eye Res**. 1992; 11(12): 1199-206.

Taylor, A. W.; Streilein, J. W.; Cousins, S. W. Alpha-melanocyte-stimulating hormone suppresses antigen-stimulated T cell production of gamma-interferon. **Neuroimmunomodulation**. 1994; 1(3): 188-94.

Theofilopoulos, A. N.; Lawson, B. R. Tumour necrosis factor and other cytokines in murine lupus. **Ann Rheum Dis**. 1999; 58 Suppl 1:149-55.

Tsatmali, M.; Graham, A.; Szatkowski, D.; Ancans, J.; Manning, P.; McNeil, C. J.; Graham, A. M.; Thody, A. J. alpha-melanocyte-stimulating hormone modulates nitric oxide production in melanocytes. **The Journal of investigative dermatology**. 2000; 114(3): 520-6.

Ugwu, S. O.; Blanchard, J.; Dorr, R. T.; Levine, N.; Brooks, C.; Hadley, M. E.; Aickin, M.; Hruby, V. J. Skin Pigmentation and Pharmacokinetics of Melanotan-I in Humans. **Biopharm. Drug Disposition**. 1997; 18(3): 259-269.

Urbonaviciute, V.; Starke, C.; Pirschel, W.; Pohle, S.; Frey, S.; Daniel, C.; Amann, K.; Schett, G.; Herrmann, M.; Voll, R. E. Toll-like receptor 2 is required for autoantibody production and development of renal disease in pristane-induced lupus. **Arthritis and rheumatism**. 2013;

Valverde, P.; Benedito, E.; Solano, F.; Oaknin, S.; Lozano, J. A.; Garcia-Borron, J. C. Melatonin antagonizes alpha-melanocyte-stimulating hormone enhancement of melanogenesis in mouse melanoma cells by blocking the hormone-induced accumulation of the c locus tyrosinase. **European journal of biochemistry / FEBS**. 1995; 232(1): 257-63.

van der Kraan, M.; Tatro, J. B.; Entwistle, M. L.; Brakkee, J. H.; Burbach, J. P.; Adan, R. A.; Gispen, W. H. Expression of melanocortin receptors and pro-opiomelanocortin in the rat spinal cord in relation to neurotrophic effects of melanocortins. **Brain research. Molecular brain research**. 1999; 63(2): 276-86.

Vianna, H. R.; Soares, C. M. B. M.; Tavares, M. S.; Teixeira, M. M.; Silva, A. C. S. e. Inflamação na doença renal crônica: papel de citocinas. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**. 2011; 33351-364.

Waldman, M.; Austin, H. A., 3rd. Treatment of idiopathic membranous nephropathy. **J Am Soc Nephrol**. 2012; 23(10): 1617-30.

Wallace, D.; Hahn, B. H. **Dubois' Lupus Erythematosus and Related Syndromes: Expert Consult - Online**. Elsevier Health Sciences, 2012. ISBN 9781455728176.

Wallace, D. J.; Hahn, B.; Dubois, E. L. **Dubois' lupus erythematosus**. 7th. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkin, 2007. xvii, 1414 p. ISBN 0781793947

Wang, C. H.; Jawan, B.; Lee, T. H.; Hung, K. S.; Chou, W. Y.; Lu, C. N.; Liu, J. K.; Chen, Y. J. Single injection of naked plasmid encoding alpha-melanocyte-stimulating hormone protects against thioacetamide-induced acute liver failure in mice. **Biochemical and biophysical research communications**. 2004; 322(1): 153-61.

Wang, J. S.; Tseng, H. H.; Shih, D. F.; Jou, H. S.; Ger, L. P. Expression of inducible nitric oxide synthase and apoptosis in human lupus nephritis. **Nephron**. 1997; 77(4): 404-11.

Weening, J. J.; D'Agati, V. D.; Schwartz, M. M.; Seshan, S. V.; Alpers, C. E.; Appel, G. B.; Balow, J. E.; Bruijn, J. A.; Cook, T.; Ferrario, F.; Fogo, A. B.; Ginzler, E. M.; Hebert, L.; Hill, G.; Hill, P.; Jennette, J. C.; Kong, N. C.; Lesavre, P.; Lockshin, M.; Looi, L. M.; Makino, H.; Moura, L. A.; Nagata, M. The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited. **J Am Soc Nephrol**. 2004; 15(2): 241-50.

Weinberg, J. B.; Granger, D. L.; Pisetsky, D. S.; Seldin, M. F.; Misukonis, M. A.; Mason, S. N.; Phippen, A. M.; Ruiz, P.; Wood, E. R.; Gilkeson, G. S. The role of nitric oxide in the pathogenesis of spontaneous murine autoimmune disease: increased nitric oxide production and nitric oxide synthase expression in MRL-lpr/lpr mice, and reduction of spontaneous glomerulonephritis and arthritis by orally administered NG-monomethyl-L-arginine. **J Exp Med**. 1994; 179(2): 651-60.

Wilder, R. L. Neuroimmunoendocrinology of the rheumatic diseases: past, present, and future. **Ann N Y Acad Sci**. 2002; 96613-9.

Xu, P. B.; Mao, Y. F.; Meng, H. B.; Tian, Y. P.; Deng, X. M. STY39, a novel alpha-melanocyte-stimulating hormone analogue, attenuates bleomycin-induced pulmonary inflammation and fibrosis in mice. **Shock**. 2011; 35(3): 308-14.

Yap, D. Y.; Lai, K. N. The role of Cytokines in the pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus - from bench to bedside. **Nephrology (Carlton)**. 2013;

Yoon, S. W.; Chun, J. S.; Sung, M. H.; Kim, J. Y.; Poo, H. alpha-MSH inhibits TNF-alpha-induced matrix metalloproteinase-13 expression by modulating p38 kinase and nuclear factor kappaB signaling in human chondrosarcoma HTB-94 cells. **Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society**. 2008; 16(1): 115-24.

Yoon, S. W.; Goh, S. H.; Chun, J. S.; Cho, E. W.; Lee, M. K.; Kim, K. L.; Kim, J. J.; Kim, C. J.; Poo, H. alpha-Melanocyte-stimulating hormone inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha production in leukocytes by modulating protein kinase A, p38 kinase, and nuclear factor kappa B signaling pathways. **J Biol Chem**. 2003a; 278(35): 32914-20.

Yoon, S. W.; Goh, S. H.; Chun, J. S.; Cho, E. W.; Lee, M. K.; Kim, K. L.; Kim, J. J.; Kim, C. J.; Poo, H. alpha-Melanocyte-stimulating hormone inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha production in leukocytes by modulating protein kinase A, p38 kinase, and nuclear factor kappa B signaling pathways. **J Biol Chem.** 2003a; 278(35): 32914-20.

Yoshimoto, S.; Nakatani, K.; Iwano, M.; Asai, O.; Samejima, K.; Sakan, H.; Terada, M.; Harada, K.; Akai, Y.; Shiiki, H.; Nose, M.; Saito, Y. Elevated levels of fractalkine expression and accumulation of CD16+ monocytes in glomeruli of active lupus nephritis. **Am J Kidney Dis.** 2007; 50(1): 47-58.

Yoshinari, N. H.; de Oliveira Bonfá, E. S. D. **Reumatologia para o Clínico.** Roca, 2000. ISBN 9788572412940.

Zabriskie, J. B. **Essential clinical immunology.** Cambridge: Cambridge University Press, 2009. x, 362 p. ISBN 9780521516815

Zhou, L. L.; Wei, W.; Si, J. F.; Yuan, D. P. Regulatory effect of melatonin on cytokine disturbances in the pristane-induced lupus mice. **Mediators Inflamm.** 2010