UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

RENATA VALENTE LISBOA

Avaliação sérica da Survivina e do Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) em pacientes com nefrite lúpica

Ribeirão Preto
2022

RENATA VALENTE LISBOA

Avaliação sérica da Survivina e do Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) em pacientes com nefrite lúpica

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Clínica Médica.

Área de Concentração: Clínica Médica

Orientador: Prof. Dr. Paulo Louzada Jr.

Versão corrigida

Ribeirão Preto

2022

FICHA CATALOGRÁFICA

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

Lisboa, Renata Valente

Avaliação sérica da Survivina e do Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) em pacientes com nefrite lúpica. Ribeirão Preto, 2022

84 p. : il

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Clínica Médica

Orientador: Paulo Louzada Júnior

1. Biomarcadores 2. Survivina 3. Nefrite lúpica 4. Fator de crescimento endotelial vascular

Universidade de São Paulo

ATA DE DEFESA

Ata de defesa de Tese do(a) Senhor(a) Renata Valente Lisboa no Programa: Medicina (Clínica Médica), do(a) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Aos 09 dias do mês de dezembro de 2022, no(a) FMRP-USP realizou-se a Defesa da Tese do(a) Senhor(a) Renata Valente Lisboa, apresentada para a obtenção do título de Doutora intitulada:

"Avaliação sérica da Survivina e do Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) em pacientes com nefrite lúpica"

Após declarada aberta a sessão, o(a) Sr(a) Presidente passa a palavra ao candidato para exposição e a seguir aos examinadores para as devidas arguições que se desenvolvem nos termos regimentais. Em seguida, a Comissão Julgadora proclama o resultado:

Nome dos Participantes da Banca	Função	Sigla da CPG	Resultado
Paulo Louzada Júnior	Presidente	FMRP - USP	Não Votante
Luciana Martins de Carvalho	Titular	HCFMRP(FMRP)	APROVADA
Viviane Angelina de Souza	Titular	UFJF - Externo	APROVADA
Marcio Dantas	Suplente	FMRP - USP	APROVADA

Resultado Final: APROVADA

Parecer da Comissão Julgadora *

Eu, Marcia Rita Pessini _____, lavrei a presente ata, que assino juntamente com os(as) Senhores(as). Ribeirão Preto, aos 09 dias do mês de dezembro de 2022.

P/

Luciana Martins de Carvalho

P/

Viviane Angelina de Souza

P/

Marcio Dantas

Paulo Louzada Júnior
Presidente da Comissão Julgadora

* Obs: Se o candidato for reprovado por algum dos membros, o preenchimento do parecer é obrigatório.

A defesa foi homologada pela Comissão de Pós-Graduação em _____ e, portanto, o(a) aluno(a) _____ jus ao título de Doutora em Ciências obtido no Programa Medicina (Clínica Médica) - Área de concentração: Clínica Médica - Opção:Investigação Clínica.

_____

Presidente da Comissão de Pós-Graduação

"Devido à pandemia do COVID-19 e às Diretrizes da Universidade de São Paulo e a Circular CoPGR 12/2020, todos os membros da participaram da arguição da tese por webconferencia e consideraram a aluna Renata Valente Lisboa APROVADA.

Ribeirão Preto, 09 de dezembro de 2022

Prof. Dr. Paulo Lanzada Jr

DEDICATÓRIA

Aos pacientes por depositarem sua esperança e confiança a esta equipe possibilitando o aperfeiçoamento contínuo.

Ao Prof. Dr. Paulo Louzada Jr. Pela oportunidade.

A minha família pela torcida, carinho e paciência diante de tanta ausência. Em especial, a Maria de Fátima Valente Lisboa, meu maior exemplo de ser humano e força além de minha maior incentivadora a realizar este projeto.

AGRADECIMENTOS

Aos colegas de residência Lívia e Caio pelo companheirismo, paciência, risadas e incentivo constante.

A ajuda das colegas de laboratório Muriel e Juliana. Obrigada pela paciência, disponibilidade e boa vontade em participar deste projeto.

Em especial, a Dra. Fabíola. Fabíola, obrigada pelo carinho, esforço, organização, exemplo e pela leveza que você trouxe para este trabalho.

Ao Rafael Moura de Almeida que, apesar de chegar quando tudo já estava em andamento, fez tudo mais bonito além de ter se tornado um companheiro singular.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

Avaliação sérica da Survivina e do Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) em pacientes com nefrite lúpica

Introdução: Lupus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença inflamatória autoimune na qual o acometimento renal (NL) atinge até 50% dos pacientes, tendo aspectos sobre seu desenvolvimento e acompanhamento ainda pouco esclarecidos. A análise clínica tem um importante papel, entretanto, a biópsia renal é o padrão ouro para NL. Novos biomarcadores poderiam auxiliar no diagnóstico e manejo não-invasivo da NL, e dentre os candidatos estudamos a Survivina e o Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF). **Objetivo**: Avaliar se Survivina e VEGF estão associados com atividade de doença, classe histológica e resposta à terapia com ciclofosfamida na NL. Avaliar o comportamento da albumina e do sedimento urinário na NL. **Pacientes e Métodos:** Foram avaliados, em seguimento longitudinal, 97 pacientes com NL ativa antes e após tratamento com pulsoterapia. Outros 200 pacientes lúpicos foram divididos em quatro grupos: com e sem nefrite lúpica, em atividade e em remissão da doença, e comparados entre si e ao grupo de voluntários sadios. A dosagem de Survivina e VEGF foi realizada por método de ELISA em amostras de soro previamente coletadas. Análise estatística feita no IBM SPSS versão 21.0 e o valor de $p \leq 0,05$ foi adotado para significância estatística. **Resultados:** Os pacientes lúpicos apresentaram níveis reduzidos de survivina e níveis aumentados de VEGF quando comparados a indivíduos saudáveis. Após a pulsoterapia ocorreu redução significativa dos níveis de survivina, sem diferença na análise envolvendo VEGF. Não houve poder discriminativo dos pacientes em atividade daqueles em remissão, bem como do acometimento renal ou sua classe histológica, apesar das diferenças. A presença de hematúria e leucocitúria no sedimento urinário foram mais prevalentes naqueles pacientes com classe proliferativa da NL. Os níveis de albumina sérica aumentaram significativamente após pulsoterapia, com comportamento similar às frações do complemento na NL. **Conclusão:** Survivina e VEGF não foram capazes de atuar como biomarcadores de resposta terapêutica nem de evidenciar o acometimento renal nos pacientes com LES.

Palavras-chave: Biomarcadores, Survivina, Nefrite Lúpica, Fator de Crescimento Endotelial Vascular

ABSTRACT

Serum assessment of Survivin and Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in patients with lupus nephritis

Introduction: Systemic lupus erythematosus (SLE) is an autoimmune inflammatory disease in which renal involvement (LN) affects up to 50% of patients, with aspects of its development and follow-up still unclear. Clinical analysis plays an important role, however, renal biopsy is the gold standard for LN. New biomarkers could help in the diagnosis and non-invasive management of LN, and among the candidates we studied Survivin and Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF). **Objective:** To assess whether Survivin and VEGF are associated with disease activity, histological class and response to cyclophosphamide therapy in LN. To evaluate the behavior of albumin and urinary sediment in LN. **Patients and Methods:** In longitudinal follow-up, 97 patients with active LN were evaluated before and after treatment with pulse therapy. Another 200 lupus patients were divided into four groups: with and without lupus nephritis, in activity and in disease remission, and compared with each other and with the group of healthy volunteers. Survivin and VEGF dosage was performed by ELISA method in previously collected serum samples. Statistical analysis performed in IBM SPSS version 21.0 and the value of $p \leq 0.05$ was adopted for statistical significance. **Results:** SLE patients had reduced levels of survivin and increased levels of VEGF when compared to healthy subjects. After pulse therapy, there was a significant reduction in survivin levels, with no difference in the analysis involving VEGF. There was no discriminative power between active patients and those in remission, as well a renal involvement or histological class, despite the differences. The presence of hematuria and leukocyturia in the urinary sediment were more prevalent in those patients with LN proliferative class. Serum albumin levels increased significantly after pulse therapy, with a similar behavior to the complement fractions in LN. **Conclusion:** Survivin and VEGF were not able to act as biomarkers of therapeutic response or to evidence renal involvement in patients with SLE.

Keywords: Biomarkers, Survivin, Lupus Nephritis, Vascular Endothelial Growth Factor.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Modelo para ilustração da complexa interligação que desencadeia o início e progressão do LES.....17
Figura 2 – Papel da Survivina na apoptose e na divisão celular 24
Figura 3 – Impacto da proteína Survivina nas células imunes 25
Figura 4 – Organograma da distribuição dos pacientes portadores de LES que participaram do estudo longitudinal e transversal 29
Figura 5 – Percentual de remissão e falha terapêutica na amostra estudada (n=97) 39
Figura 6 – Percentual de remissão e falha terapêutica por classe histológica 40
Figura 7 – Dosagem de Survivina sérica no grupo RC-RP pré e pós-tratamento 43
Figura 8 – Dosagem de Survivina sérica do grupo FT pré pós-tratamento 43
Figura 9 – Dosagem de Survivina sérica pós-tratamento: RC-RPxFT 44
Figura 10 – Albumina sérica do grupo RC-RP pré e pós ciclofosfamida.....45
Figura 11 – Albumina sérica pós-tratamento: RC-RPxFT 46
Figura 12 – Curva ROC: Albumina X complemento 46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação histológica da nefrite lupica somado aos seus possíveis achados clínico-laboratoriais e indicação terapêutica.....19
Tabela 2 – Aspectos demográficos, clínicos e laboratoriais do grupo total de pacientes portadores de LES 36
Tabela 3 – Aspectos demográficos, clínicos, laboratoriais e histopatológicos do grupo LES com nefrite ativa 38
Tabela 4 – Dosagem sérica de survivina e VEGF nos pacientes com NL divididos por classe histológica da nefrite lúpica (NL) 40
Tabela 5 – Caraterísticas de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico antes e após tratamento medicamentoso (n= 97).....41
Tabela 6 – Caraterísticas de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico antes e após tratamento medicamentoso comparando com comportamento da albumina (n= 97).....44
Tabela 7 – Ocorrência de manifestações laboratoriais séricas e urinárias nos pacientes com NL, de acordo com as classes histológicas, segundo a Sociedade Internacional de Nefrologia/Sociedade de Patologia Renal (ISN/RPS) 2003 47
Tabela 8 – Comparação de parâmetros laboratoriais entre NL proliferativa (classe III, IV e IV/V) e nefrite lúpica não-proliferativa (classe II e classe V). Dados foram analisados pelo teste t student e teste exato de Fisher.....48
Tabela 9 – Dosagem sérica de Survivina e VEGF nos pacientes lúpicos comparados ao grupo controle: análise geral 49
Tabela 10 – Aspectos clínicos, demográficos, laboratoriais, e avaliação do nível sérico de survivina e de VEGF dos quatro subgrupos lúpicos (lupus eritematoso sistêmico ativo e inativo, com e sem nefrite) comparando-os com grupo controle. Para análise do estudo transversal foi usado teste de ANOVA de Kruskal-Wallis 51
Tabela 11 – Mediana (1º quartil – 3º quartil) da dosagem de albumina e percentual de pacientes com dosagem do complemento sérico consumido, nos quatro subgrupos dos pacientes lúpicos (lúpus eritematoso sistêmico ativo e inativo, com e sem nefrite), comparados entre si e com grupo controle 53

Tabela 12 – Mediana (1ºquartil – 3ºquartil) dos biomarcadores survinina e VEGF em pacientes com nefrite lúpica ativa, divididos em 3 grupos, de acordo com os achados histopatológicos obtidos por biópsia renal (n= 163) 54

LISTA DE SIGLAS

APL	Anti-fosfolípide
AR	Artrite reumatoide
BILAG	Index de avaliação lúpica das ilhas britânicas
CFM	Ciclofosfamida
DCR	Doença renal crônica
ELISA	Ensaio imunoenzimático
FAN	Fator anti-nuclear
FTI	Fibrose túbulo intersticial
FTI	Falha Terapêutica
GC	Grupo controle
GNP	Glomerulonefrite proliferativa
HIF-1a	Fator Induzido por hipóxia-1 alfa
IAP	Proteína inibidora de apoptose
IFN-gama	Interferon gama
IL-6R	Receptor para interleucina 6
LB	Linfócitos B
LES	Lúpus Eritematoso Sistêmico
LESa	Lúpus eritematoso sistêmico ativo sem NL
LESr	Lúpus eritematoso sistêmico em remissão sem NL
LT	Linfócitos T
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MMF	Micofenolato de mofetil
NET	Armadilha extracelular de neutrófilos
NL	Nefrite lúpica
NLa	Nefrite lúpica em atividade
NLr	Nefrite lúpica em remissão
NTI	Nefrite túbulo intersticial
PAI	Proteínas de fase aguda da inflamação
RC	Remissão completa

RP	Resposta parcial
SLEDAI	Index atividade de doença lúpus eritematoso sistêmico
STAT3	Sinalizador de transdução e ativador da transcrição 3
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 17
1.1 LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO 17
1.1.1 Definição 17
1.1.2 Fisiopatologia do lúpus eritematoso sistêmico 18
1.2 NEFRITE LÚPICA (NL) 19
1.3 BIOMARCADORES NA NEFRITE LÚPICA 23
1.4 NOVOS POSSÍVEIS BIOMARCADORES 24
1.4.1 - Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) 24
1.4.2 Survivina 25
2 JUSTIFICATIVA 29
3 OBJETIVOS 30
3.1 PRINCIPAL 30
3.2 SECUNDÁRIOS 30
4 PACIENTES E MÉTODOS 31
4.1 DESENHO DO ESTUDO 31
4.2 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE SURVIVINA E VEGF DE PACIENTES COM NEFRITE LÚPICA, ANTES E APÓS O TRATAMENTO COM PULSOTERAPIA MENSAL DE CICLOFOSFAMIDA – AVALIAÇÃO LONGITUDINAL 32
4.2.1 Critérios de inclusão 32
4.2.2 Critérios de exclusão 33
4.2.3 Caracterização clínico-laboratorial dos pacientes 33
4.3 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE SURVIVINA E VEGF DE INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS E DE PACIENTES COM LES DE ACORDO COM A PRESENÇA OU NÃO DE NEFRITE LÚPICA E DE ATIVIDADE DA DOENÇA: AVALIAÇÃO TRANSVERSAL 34
4.4 DETECÇÃO DE SURVIVINA E VEGF 34
4.5 ANÁLISE HISTOLÓGICA 35
4.6 ASPECTOS ÉTICOS 35
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA 36
5 RESULTADOS 37
5.1 AVALIAÇÃO GERAL DOS PACIENTES LÚPICOS 37
5.2 ESTUDO LONGITUDINAL (ANÁLISES ANTES E APÓS TRATAMENTO DA NEFRITE LÚPICA) 39

5.2.1 Taxa de remissão geral e por classe histológica 41
5.2.2 Avaliação do nível sérico de survivina e VEGF dos pacientes portadores de NL, pré-tratamento, divididos por classe histológica..... 42
5.2.3 Avaliação dos níveis séricos de survivina e VEGF dos pacientes portadores de NL tratados com pulsoterapia de metilprednisolona e ciclofosfamida, antes e após o tratamento 43
5.2.4 Avaliação do nível sérico de albumina dos pacientes portadores de NL tratados com pulsoterapia de metilprednisolona e ciclofosfamida 46
5.2.5 Avaliação laboratorial sérica e urinária de acordo com as classes histológicas da nefrite lúpica 48
5.3 ESTUDO TRANSVERSAL 50
5.3.1 Avaliação dos níveis séricos de survivina e VEGF de pacientes portadores de LES51
5.3.2 Avaliação do nível sérico de albumina dos pacientes portadores de LES 55
5.4 CORRELAÇÃO ENTRE OS ACHADOS HISTOPATOLÓGICOS (ALTERAÇÃO GLOMERULAR, ACOMETIMENTO TÚBULO-INTERSTICIAL E VASCULAR) E O NÍVEL SÉRICO DE SURVIVINA E VEGF DOS PACIENTES PORTADORES DE NL ATIVA 55
6 DISCUSSÃO 57
7 CONCLUSÃO..... 64
8 REFERÊNCIAS 65
APÊNDICE 1 72
APÊNDICE 2: SLEDAI 73
APÊNDICE 3: BULAS..... 74
ANEXO 1..... 81
ANEXO 2..... 82

1 INTRODUÇÃO

1.1 LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO

1.1.1 Definição

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença inflamatória crônica autoimune cuja etiopatogenia envolve múltiplos fatores genéticos, hormonais e ambientais (Klumb et al., 2015; Tsokos, Lo, Costa Reis, & Sullivan, 2016). Trata-se de uma doença pleomórfica com ampla variabilidade fenotípica, comportamento clínico e gravidade distintos entre seus portadores, com períodos de atividade e de remissão (Klumb et al., 2015).

A prevalência varia de 3-200/100.000 habitantes dependendo da idade, sexo, etnia e região geográfica (Arkema & Simard, 2015). Predomina em mulheres jovens com média de idade de 30 anos (Klumb et al., 2015). A morbimortalidade dos pacientes com LES é mais elevada quando comparada com a população geral, sendo as principais causas suas complicações cardiovasculares, infecções e atividade de doença (Azizoddin, Jolly, Arora, Yelin, & Katz, 2019; Ingvarsson, Landgren, Bengtsson, & Jonsen, 2019). O acometimento renal ocorre em cerca de 60% dos doentes (Souza, Santo, & Sato, 2012; Telles et al., 2013) aumentando significativamente os índices de morbimortalidade.

O diagnóstico de LES é estabelecido através dos critérios de classificação do Colégio Americano de Reumatologia e o tratamento é determinado de acordo com o conjunto de achados clínicos, laboratoriais e histológicos de cada indivíduo.

Não existe um padrão ouro para mensuração da atividade de doença, sendo o quadro clínico e os marcadores laboratoriais que orientam o diagnóstico e a escolha terapêutica (Yip et al., 2010). Durante anos, diversos índices têm sido estudados e validados a fim de orientar quanto à atividade e evolução da doença, como, por exemplo, o *Systemic Lupus Erythematisus Disease Activity Index* (SLEDAI), SLEDAI modificado 2000 e o *British Isles Lupus Assessment Group* (BILAG) (Idborg et al., 2018). Muitos desses índices usados na prática clínica têm um componente subjetivo, bem como utilizam marcadores séricos, trazendo limitações na análise e na avaliação no momento da consulta (IDBORG et al, 2018).

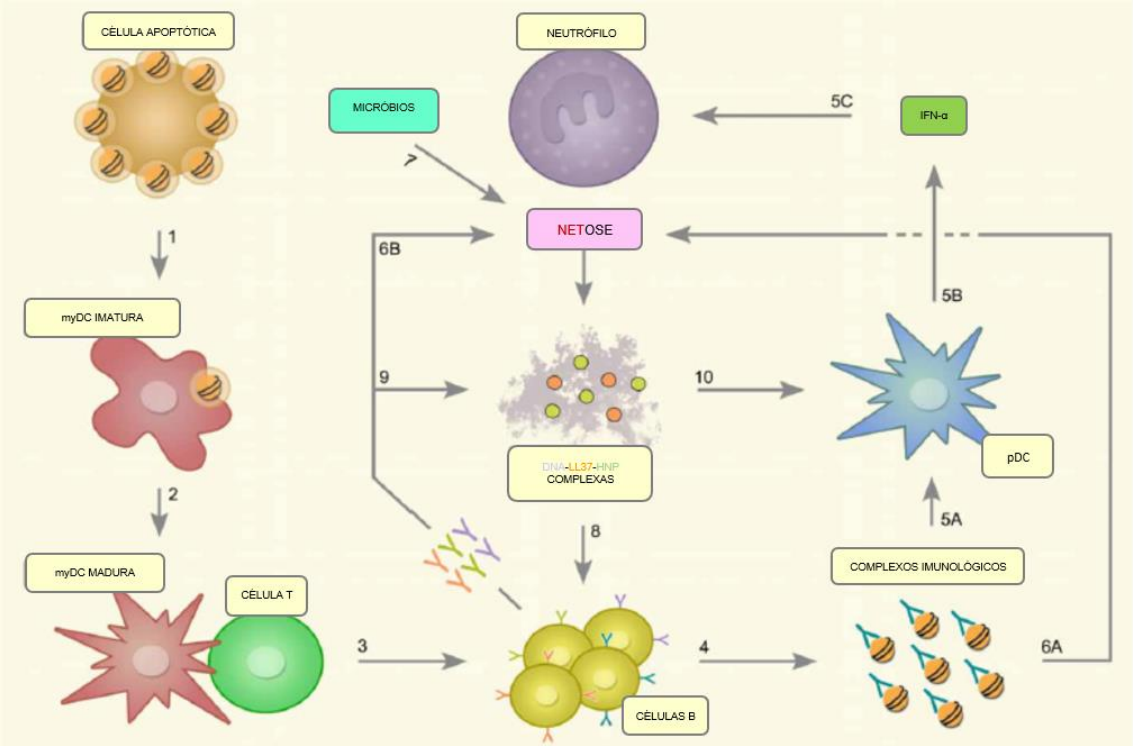
1.1.2 Fisiopatologia do lúpus eritematoso sistêmico

Similar a outras doenças autoimunes, a etiologia e o mecanismo fisiopatológico relacionada a resposta imune no LES permanecem desconhecidos (Delfani et al., 2017; Fortuna & Brennan, 2013). Trata-se de um mecanismo fisiopatológico complexo, composto por múltiplos fatores como as lesões teciduais advindas de fatores genéticos e epigenéticos, produção de células dendríticas autorreativas, armadilhas extracelular de neutrófilos (NETs), células T e B autorreativas com produção de autoanticorpos, citocinas inflamatórias, além de fatores hormonais e ambientais (Fortuna & Brennan, 2013).

As NETs são pontes extracelulares derivadas de cromatina de neutrófilos, em resposta a infecção ou agentes estéreis como citocinas e produtos microbiológicos (Kazzaz, Sule, & Knight, 2016). A desregulação desse sistema é uma importante chave na patogênese do LES, pois a modificação do sistema histona que ocorre em tecidos inflamados pode ativá-los gerando a apoptose em um processo chamado NETosis (Bouts et al., 2012; Brinkmann et al., 2004; Flores-Mendoza, Sanson, Rodriguez-Castro, Crispin, & Rosetti, 2018). Como consequência há a liberação de uma grande quantidade de DNA, estrutura base para formação de autoantígeno, o que pode influenciar inúmeras doenças, dentre elas o LES (Figura 1) (Bouts et al., 2012; Brinkmann et al., 2004; Fortuna & Brennan, 2013; Hamam & Palaniyar, 2019).

A formação de autoanticorpos pode resultar da apoptose aberrante, insuficiente *clearance* de células apoptóticas, disfunção da supressão celular pelos linfócitos T reguladores (LT reg), mudança no sistema complemento ou aumento de linfócitos B (LB) autorreativos. Células apoptóticas são consideradas importantes na formação de autoantígenos, podendo estimular células dendríticas e consequentemente induzir resposta imune tanto via LT quanto LB (Bouts et al., 2012; Devarapu, Lorenz, Kulkarni, Anders, & Mulay, 2017).

Figura 1 – Modelo para ilustração da complexa interligação que desencadeia o início e progressão do LES



Legenda: Redução do clearence do material apoptótico leva a uma internalização de vesículas de cromatina modificada pelas células dendríticas mieloides (myDC) imaturos (passo 1). Após ingestão, myDC desenvolve um fenótipo maduro capaz de ativar células T (passo 2) que incita células B (passo3) a produzir autoanticorpos (passo 4) contra a cromatina que foi ingerida pela myDC. O agora formado complexo imune entra no pDC através de endocitose receptor-mediado (passo 5A) e leva a produção de interferon-alfa (INF-a) (passo 5B). INF-a estimula neutrófilos (passo 5C) e então permite autoanticorpos induzir NEToses (passo 6A e 6B), um processo usualmente deflagrado por microorganismos (passo 7). Complexos peptídeos de DNA-antimicrobiano espalham-se pelo espaço extracelular funcionando como autoantígeno para as células B (passo 8), aumentando a produção de autoanticorpos anti-LL37, anti-HNP e anticromatina que podem formar complexos imunes com NET (passo 9), facilitando a captura deles pelo pDC (passo 10). Isso estabelece uma associação entre pDC e neutrófilos que cronifica e exacerba a doença.
Fonte: (Bouts et al., 2012).

O LES apresenta uma aparente relação com aumento da apoptose bem como ineficiente *clearance* desse material celular, entretanto, a falta de um biomarcador elucidando tal relação prejudica o entendimento do processo como um todo (Delfani et al., 2017).

1.2 NEFRITE LÚPICA (NL)

A morbimortalidade em pacientes com LES é elevada naqueles com acometimento renal (nefrite lúpica), o que ocorre em cerca de 60% dos doentes (Rabbani

et al., 2009; Souza et al., 2012; Telles et al., 2013; Yap, Yung, & Chan, 2018). O acometimento glomerular pode ocorrer de diversas formas, que são classificadas de acordo com a Sociedade Internacional de Nefrologia/Sociedade de Patologia Renal (ISN/RPS) em classes de I a VI e diferem entre si no quadro clínico, nas alterações laboratoriais e no tratamento (Bajema et al., 2018; Bertsias et al., 2012; Faurschou, Dreyer, Kamper, Starklint, & Jacobsen, 2010; Hiramatsu et al., 2008; Klumb et al., 2015; Weening et al., 2004) (Apêndice 1). A avaliação de pressão arterial sistêmica, do sedimento urinário, da dosagem de proteinúria em 24 horas e da relação proteína-creatinina, da função renal e de alguns biomarcadores, como o anticorpo anti-dsDNA e as frações do complemento, auxiliam no diagnóstico e no acompanhamento dos pacientes com NL (Moroni et al., 2015). O padrão ouro, no entanto, continua sendo a biópsia renal, que possibilita tanto o diagnóstico quanto a classificação histológica, fornece índices de atividade e de cronicidade da doença e identifica comorbidades e diagnósticos diferenciais (Moroni et al., 2015).

Na prática clínica nem sempre é possível realizar a biópsia renal para classificação da nefrite, pois para tal é necessário um serviço com condições para a realização dessa com segurança e efetividade, equipamentos adequados e patologista bem treinado para a sua análise. Por esse motivo, é importante uma caracterização clínica e laboratorial detalhada, na tentativa de obter a melhor correlação entre o diagnóstico baseado em manifestações clínicas, achados de sedimentoscopia urinária e biomarcadores e o diagnostico histológico após biópsia renal (Tabela 1) (Martinez-Martinez et al., 2017)

O quadro clínico e os marcadores laboratoriais ditam a escolha terapêutica e aprovisionam importantes elementos a respeito do prognóstico (Caster & Powell, 2019; Klumb et al., 2015; Mavragani et al., 2015), além de serem capazes de discriminar quadros proliferativos de outras classes de nefrite lúpica, refletindo sua histologia (Martinez-Martinez et al., 2017) (Tabela 1). Sendo assim, o estabelecimento de marcadores laboratoriais mais específicos poderia beneficiar a condução clínica e escolha terapêutica desses pacientes de maneira mais apropriada e eficaz (Ayoub, Cassol, Almaani, Rovin, & Parikh, 2019).

Tabela 1 – Classificação histológica da nefrite lúpica somado aos seus possíveis achados clínico-laboratoriais e indicação terapêutica

Classe histológica	Achados clínicos/laboratoriais	Tratamento
Complexos imunes mesangiais pela imunofluorescência	Nenhum achado relevante e raramente diagnosticado ou biopsiado	Indução e manutenção de remissão considerar AZA ou MMF
Complexos imunes mesangiais e proliferação mesangial	Hematúria, proteinúria < 1g. Não esperado hipertensão arterial, achados nefróticos ou insuficiência renal	Indução e manutenção de remissão considerar AZA ou MMF
Complexos imunes mesangiais e subendoteliais, proliferação endocapilar segmentar em < 50% dos glomérulos	Hematúria, proteinúria e hipertensão arterial recente visto na maioria dos pacientes. Achados nefróticos ou insuficiência renal são usuais	Indução: Pulsoterapia com MP [0,5 a 1 g i.v., durante três dias] somado a CFM i.v. 0,5 a 1 g/m2 SC mensalmente durante seis meses ou CFM i.v. 0,5 g a cada 15 dias durante três meses ou MMF (2 a 3 g/dia) e seguido de prednisona (0,5 a 1 mg/Kg/dia) por três a quatro semanas, com redução subsequente Manutenção: A AZA ou o MMF estão indicados para os pacientes que tenham alcançado RC ou RP na fase de indução
Complexos imunes mesangiais e subendoteliais, proliferação endocapilar global ou segmentar em > 50% dos glomérulos	Hematúria, proteinúria e hipertensão arterial recente visto na maioria dos pacientes. Achados nefróticos ou insuficiência renal são usuais	Indução: Pulsoterapia com MP [0,5 a 1 g i.v., durante três dias] somado a CFM i.v. 0,5 a 1 g/m2 SC mensalmente durante seis meses ou CFM i.v. 0,5 g a cada 15 dias durante três meses ou MMF (2 a 3 g/dia) e seguido de prednisona (0,5 a 1 mg/Kg/dia) por três a quatro semanas, com redução subsequente Manutenção: A AZA ou o MMF estão indicados para os pacientes que tenham alcançado RC ou RP na fase de indução
Complexos imunes subepiteliais em > 50% dos capilares glomerulares	Proteinúria frequentemente nefrótica, sedimento urinário sem atividade, hematúria é possível, usualmente sem insuficiência renal ou hipertensão arterial	Pulsoterapia com MP [0,5 a 1 g i.v., durante três dias], seguido de prednisona (0,5 a 1 mg/Kg/dia) por três a quatro semanas, com redução subsequente, somando a CFM i.v. 0,5 a 1 g/m2 SC mensalmente durante seis meses ou CFM i.v. 0,5

Tabela 1 – Classificação histológica da nefrite lúpica somado aos seus possíveis achados clínico-laboratoriais e indicação terapêutica

		g a cada 15 dias durante três meses ou MMF (2 a 3 g/dia) ou AZA (2 mg/dia) Manutenção: A AZA ou o MMF estão indicados para os pacientes que tenham alcançado RC ou RP na fase de indução
Glomeruloesclerose em > 90% dos glomérulos	Insuficiência renal, proteinúria e hematúria frequentemente presentes.	Se DRCe manter tratamento com reumatologista mesmo após TRS, incluindo uso da HCLQ com ajuste de suas doses. Considerar transplante renal nos pacientes com DRCe

Legenda: AZA: azatioprina, MMF: micofenolato de mofetila, MP: metilprednisolona. CFM: ciclofosfamida, RC: resposta completa, RP: resposta parcial, DRCe: doença renal crônica estabelecida.
Fonte: KLUMB et al., 2015.

Referente ao tratamento da NL, apesar de haver variações entre alguns estudos, a recomendação da Liga Europeia contra Reumatismo (EULAR) é de que o mesmo seja indicado de acordo com o padrão determinado pela classificação histológica da biópsia renal (Ayoub et al., 2019; Klumb et al., 2015). Tal recomendação propõe para tratamento das classes I e II o uso de corticosteroides e de azatioprina, para classes III e IV a pulsoterapia com metilprednisolona e ciclofosfamida ou o uso de micofenolato mofetil (MMF) visando o desfecho de remissão completa após 6 meses do tratamento e, para a classe V, o uso de azatioprina, micofenolato mofetil ou ciclofosfamida (Bertsias et al., 2012; Klumb et al., 2015; Yap et al., 2018) (Tabela 1).

Na ausência de biópsia renal disponível para a análise histológica, o diagnóstico provável da classe de nefrite é feito através da análise conjunta do quadro clínico, urinário e de biomarcadores séricos (Klumb et al., 2015), o que direciona a melhor escolha terapêutica. O objetivo principal do tratamento é alcançar a remissão completa (RC) que está associada a bom prognóstico em longo prazo (Klumb et al., 2015). RC consiste quando a proteinúria fica <0,5 g/24 h ou relação proteína/creatinina (R P/C) <0,5 e taxa de filtração glomerular (TFG) normal ou redução ≤ 10% do valor prévio do paciente ou limite superior da normalidade (LSN) do método (se o primeiro não for disponível) e urinálise normal. Já remissão parcial consiste na redução >50% da proteinúria inicial com

valor <3 g/24 h ou relação proteína-creatinina <3 e TFG normal ou redução ≤ 10% do valor prévio do paciente ou LSN do método (se o primeiro não for disponível) e urinálise normal (Klumb et al., 2015).

A progressão para insuficiência renal crônica terminal e necessidade de terapia renal substitutiva ocorre em 10-30% dos pacientes, principalmente nos que apresentam glomerulonefrite proliferativa (GNP) (Klumb et al., 2015; Nived et al., 2013). O acometimento glomerular no LES determina a maior parte dos sinais e sintomas da NL e, à semelhança das outras manifestações não renais, a NL também apresenta períodos de atividade e remissão (Bomback & Appel, 2010; Klumb et al., 2015; Markowitz & D'Agati, 2009).

1.3 BIOMARCADORES NA NEFRITE LÚPICA

A avaliação dos autoanticorpos e biomarcadores dos pacientes lúpicos é essencial para o manejo clínico, pois proveem dados de importância diagnóstica, informações a respeito de atividade de doença sintomática ou não, e orienta o uso de agentes imunomoduladores ou imunossupressores (Klumb et al., 2015; Zhang et al., 2012).

Estudos anteriores já testaram diversos autoanticorpos e biomarcadores para fins prognósticos, predição de reagudizações e evolução da lesão renal no LES (Caster & Powell, 2019).

É estabelecido que anticorpos anti-dsDNA e frações do complemento (C3, C4, CH50) são úteis para avaliar atividade da NL (Kavanaugh, Solomon, & American College of Rheumatology Ad Hoc Committee on Immunologic Testing, 2002; Soliman & Mohan, 2017; Walport, 2001). A frequência do anti-dsDNA detectado pelo método de ELISA é de 60% nos pacientes com LES e sua especificidade é de 97% (Kavanaugh et al., 2002).

A NL é caracterizada por depósito de complexos imunes e acredita-se que o sistema complemento atue de modo significante nessa patogênese (Sterner, Hartono, & Grande, 2014). Níveis séricos das frações C3 e C4 do sistema complemento têm sido usados há décadas para monitorização de atividade de doença em pacientes lúpicos (Ahearn, Liu, & Manzi, 2017). O uso do sistema complemento para avaliação de atividade de doença no LES possui limitações visto que não é específico, sendo que a redução dos níveis séricos pode ser devido tanto à produção reduzida quanto pelo consumo

excessivo desse marcador (Ahearn et al., 2017). Outra fração do complemento analisada é o C1q, cuja deficiência genética pode ser um fator de risco para desenvolver LES, principalmente devido a diminuição da capacidade do sistema imune de promover o *clearance* de imunocomplexos (Sterner et al., 2014).

Outro anticorpo estudado é o antinucleossomo que demonstrou forte correlação com a positividade do anti-dsDNA, com sensibilidade e especificidade comparáveis, principalmente em casos de atividade da doença moderada e elevada (Jesus et al., 2012; Yang et al., 2015). Logo, antinucleossomo tem valor diagnóstico e é um marcador de atividade de doença renal em pacientes lúpicos (Bizzaro, Villalta, Giavarina, & Tozzoli, 2012; Jesus et al., 2012; Pradhan, Patwardhan, & Ghosh, 2010).

1.4 NOVOS POSSÍVEIS BIOMARCADORES

1.4.1 - Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF)

O fator de crescimento endotelial (VEGF) trata-se de um regulador dos episódios de disfunção endotelial com consequente aumento da proliferação endotelial, aumento da permealibilidade capilar e da angiogênese, além agir sobre do remodelamento da matriz intersticial vascular (Ghazali, Iberahim, & Ashari, 2017; Zhan et al., 2021)

O processo inflamatório existente na NL desencadeia desequilíbrio de fatores vasoativos, perda de capilares intersticiais, redução da difusão de oxigênio e aumento da demanda de oxigênio devido a hiperfiltração (Ma et al., 2012). A somatória de todos os eventos culmina em hipóxia tecidual renal (Ma et al., 2012). Evidências mostram que a hipóxia pode acelerar a progressão da DRC através da ativação dos fatores induzidos por hipóxia, que são reguladores centrais de resposta à lesão hipoxêmica (Henze & Acker, 2010; Ma et al., 2012). Eles agem sobre eventos relacionados ao metabolismo energético renal, regulação vasomotora, angiogênese, apoptose e sobrevida celular (Ma et al., 2012).

A lesão do compartimento glomerular é a mais proeminente na NL, porém o mecanismo que leva a ocorrência de fibrose túbulo-intersticial (FTI) concomitante permanece obscuro (Ma et al., 2012). Em pacientes com DRC, a extensão da FTI está mais relacionada com piora da função renal do que a lesão glomerular, além de pior

resposta à terapia (Ma et al., 2012). Entre as substâncias envolvidas neste processo de fibrose estão o HIF-1a e o VEGF (Ma et al., 2012).

A hipóxia também relaciona-se com a angiogênese promovendo a ativação de vários marcadores, dentre eles o VEGF (Deng, Feng, Li, Wang, & Sun, 2016; Zimna & Kurpisz, 2015). Donderski e colaboradores avaliaram a expressão de VEGF e HIF-1a no tecido renal associando-as à variáveis clínicas apresentadas por pacientes com glomerulonefrites (Donderski et al., 2013). O estudo mostrou que a excessiva expressão de VEGF em indivíduos com proteinúria acima de 3,5g por dia está associada ao aporte insuficiente de oxigênio no tecido renal, o que contribui para fibrose túbulo-intersticial, bem como para piora da função renal (Donderski et al., 2013).

Outros estudos mostraram que o nível de VEGF em pacientes com LES correlacionou-se positivamente com elevações das proteínas de fase aguda da inflamação (PAIs) e com escores de atividade da doença (SLEDAI) (Zhou, Lu, Shen, Wang, & Wang, 2014). Logo, níveis séricos elevados de VEGF podem ter relevância na patogênese do LES bem como ser um marcador de atividade de doença e de prognóstico (Ghazali et al., 2017; Zhou et al., 2014). Avihingsanon et al. (2009) descreveram que a diminuição da expressão renal de VEGF pode ser um mecanismo protetor contra lesão na NL (Feliers, 2009). Para isso, os autores avaliaram pacientes com NL classe III e IV (ISN/RPS) e rins de pacientes com NL no momento do transplante renal (Avihingsanon et al., 2009). Aqueles com glomérulonefrite proliferativa (GNP) possuíam níveis mais baixos de expressão de VEGF do que os pacientes transplantados. Tais achados podem ajudar a entender mecanismos da NL, podendo inclusive predizer evolução renal desfavorável, o que seria de extrema importância para a tomada de decisões no tratamento.

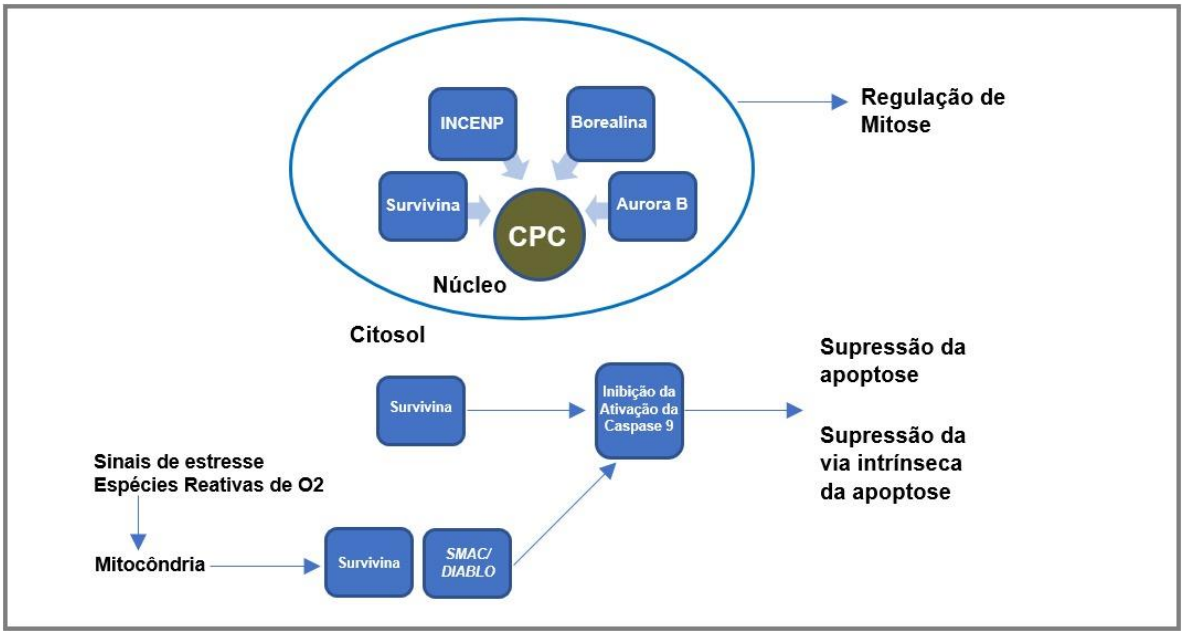
1.4.2 Survivina

Survivina é uma proteina multifatorial que pertence à família dos inibidores de apoptose (IAPs), tem a capacidade de anular os sinais de apoptose sendo amplamente estudada como marcador de terapia anti-neoplásica e mais recentemente teve avaliado seu papel entre as doenças autoimunes (Gravina et al., 2017; Koike et al., 2010; Mita,

Mita, Nawrocki, & Giles, 2008). Trata-se de uma substância estruturalmente única, composta por 142 aminoácidos sendo a menor IAP (Altieri, 2015).

Sobre seu mecanismo de ação, essa proteína tem a capacidade de inibir e bloquear o ciclo das caspases com consequente modulação do ciclo celular, regulando os processos de mitose bem como inibição da apoptose (Ebrahimiyan, Aslani, Rezaei, Jamshidi, & Mahmoudi, 2018; Pahlavan et al., 2019). Survivina possui atuação tanto nuclear quanto citoplasmática e inibe apoptose através da interação direta entre survivina e caspases 3 e 9, desencadeando a supressão dessas (Ebrahimiyan et al., 2018) (Figura 2).

Figura 2 – Papel da Survivina na apoptose e na divisão celular



Legenda: A expressão da survivina no citosol ou mitocondrial pode suprimir tanto as vias extrinsecas quanto intrinsecas da apoptose. A expressão da survivina no núcleo atua como importante via de regulação da divisão celular atuando como importante componente do complexo cromossômico de passagem (CPC). SMAC/DIABLO: segundo ativador mitocondrial de caspase. Fonte:(Garg, Suri, Gupta, Talwar, & Dubey, 2016).

Survivina no contexto neoplásico tem sido considerada peça indispensável visto sua atuação na proliferação celular e na inibição da apoptose de células malignas. Muitos tumores super expressam survivina e essa proteina vem sendo utilizada como marcador correlacionado com progressão tumoral, resistência medicamentosa e mau prognóstico (Ebrahimiyan et al., 2018; Garg et al., 2016; Sah, Khan, Khan, & Bisen, 2006).

No cenário da auto-imunidade, numerosas pesquisas têm atentado à maior expressão e função da survivina em linfócitos autorreativos, em células teciduais e em neutrófilos sob condições inflamatórias, que desempenha possivelmente um papel importante na patogênese de doenças autoimunes, visto sua possível contribuição na redução dos índices de apoptose de células autorreativas e até mesmo como possível alvo terapêutico para medicamentos anti-inflamatórios (Figura 3) (Altznauer et al., 2004; Ebrahimiyan et al., 2018; Koike et al., 2010; Pahlavan et al., 2019; Zafari, Rafiei, Esmaeili, Moonesi, & Taghadosi, 2019). Koike Y, et al (2010) mostraram que níveis de survivina estão aumentados no plasma e no fluido sinovial de pacientes com artrite reumatoide (AR) possuindo potencial valor prognóstico nesses pacientes.

Figura 3 – Impacto da proteína Survivina nas células imunes

Legenda: A Survivina induz TH17 e a diferenciação de células T virgens em TH1, e promove a maturação de timócitos no timo. Ela sustenta a produção de anticorpos e a hipermutação das células B podendo aumentar a resposta inflamatória dos monócitos. A survivina contribui na maturação das células dendríticas através da expressão de marcadores de superfície como MHC II e CD80/86, além de maior limiar apoptótico de neutrófilos. Observação: de baixo para cima: neutrófilos, timócitos, células T, monócitos, células B, células dendríticas. Fonte: Zafari et al, 2019.

Como os autoanticorpos no LES são dirigidos contra material nuclear, é fundamental entender os mecanismos anômalos de morte celular que conduzem à exposição e ao processamento aberrante de antígenos nucleicos próprios, além de discernir o papel da survivina na patogênese do LES (Colonna, Lood, & Elkon, 2014). Pacientes com LES mostram anormalidades na morte celular em vários níveis, incluindo aumento das taxas de apoptose, necrose, autofagia e reduzida depuração de material apoptótico (Colonna et al., 2014).

Até o momento, há limitados dados sobre a expressão da survivina no LES em atividade (Tao et al., 2005). O estudo de tal proteína é ainda discreto, bem como suas correlações clínicas, funcionais e prognósticas na doença, sendo ainda necessário avaliar seu comportamento e potencial como biomarcador de resposta terapêutica e de prognóstico nos pacientes portadores de LES.

2 JUSTIFICATIVA

A NL apresenta-se com diferente comportamento clínico, laboratorial e terapêutico de acordo com cada paciente, sendo sua condução ainda um desafio para a prática clínica.

A não consonância entre achados clínicos e histopatológicos ou entre achados clínicos e achados laboratoriais trazem dificuldades para tomada de decisões para esses pacientes.

Atualmente ainda há lacunas no entendimento do lúpus eritematoso sistêmico e da nefrite lúpica sendo necessário novos estudos que contribuam para seu esclarecimento.

Tanto alguns marcadores relacionados à NL quanto a biópsia renal são de acesso limitados em alguns cenários, sendo necessário avaliar biomarcadores de maior disponibilidade para facilitar o acompanhamento desses pacientes.

Desta forma, torna-se preemente a busca de novos elementos envolvidos na NL, no intuito de estabelecer candidatos a biomarcadores de atividade e de resposta terapêutica, bem como beneficiar os pacientes com um acompanhamento mais eficiente e menos invasivo.

3 OBJETIVOS

3.1 PRINCIPAL

- Avaliar se novos biomarcadores (VEGF e survivina) estão associados com atividade de doença e resposta ao tratamento com ciclofosfamida na NL.

3.2 SECUNDÁRIOS

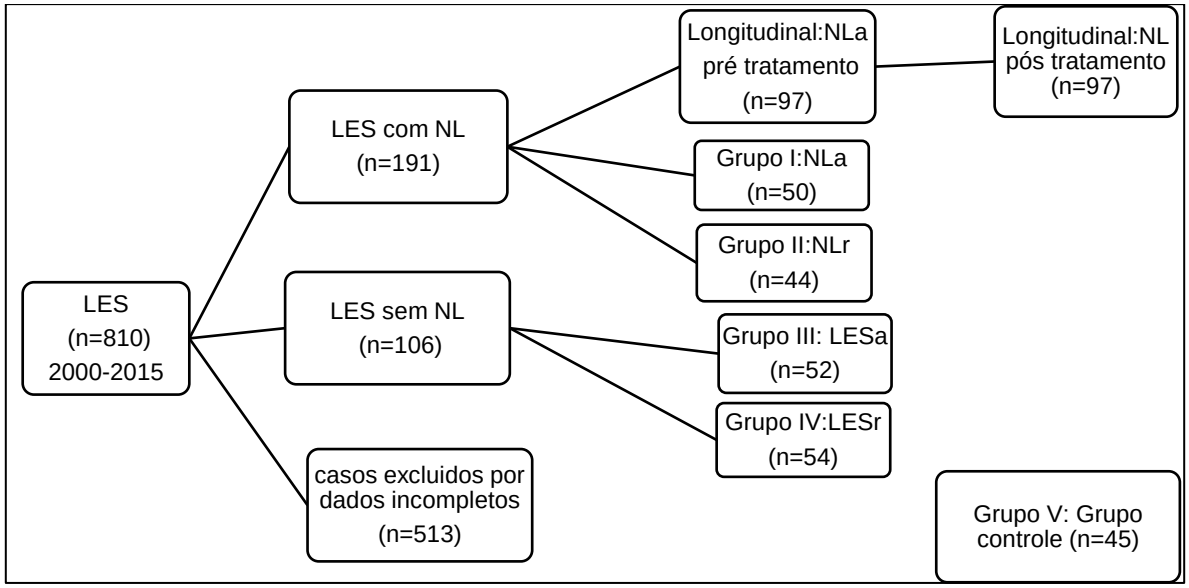
- Descrever as características clínicas e laboratoriais dos pacientes portadores de nefrite lúpica tratados com pulsoterapia de ciclofosfamida e metilprednisolona por período de seis meses no HCFMRP-USP, entre os anos 2000 a 2015;
- Avaliar o percentual de resposta terapêutica à pulsoterapia de metilprednisolona e ciclofosfamida dos pacientes portadores de NL acompanhados nesse serviço;
- Avaliar o comportamento da albumina nos pacientes avaliados refletindo sobre seu papel nessa determinada população; e
- Avaliar a correlação entre as avaliações do sedimento urinário e os resultados de biópsia renal.

4 PACIENTES E MÉTODOS

4.1 DESENHO DO ESTUDO

Para a condução desse trabalho foram planejados dois delineamentos de estudo distintos. O primeiro é um estudo longitudinal descritivo que avalia o comportamento dos biomarcadores (survivina e VEGF) nos pacientes com nefrite lúpica ativa em dois momentos diferentes da doença: antes e após o tratamento com pulsoterapia de ciclofosfamida e metilprednisolona. O segundo é um estudo transversal do tipo caso-controle, que avalia o comportamento dos biomarcadores (survivina e VEGF) em outro grande grupo de pacientes lúpicos, divididos em quatro subgrupos: com nefrite (ativos e inativos) e sem nefrite (ativo e inativos) e comparados a um grupo de voluntários sadios (Figura 4).

Figura 4 – Organograma da distribuição dos pacientes portadores de LES que participaram do estudo longitudinal e transversal



Fonte: elaboração própria. NLa: nefrite lúpica ativa. NLr: nefrite lúpica em remissão. LESa: Lupus sem nefrite em atividade. LESr: Lupus sem nefrite em remissão.

4.2 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE SURVIVINA E VEGF DE PACIENTES COM NEFRITE LÚPICA, ANTES E APÓS O TRATAMENTO COM PULSOTERAPIA MENSAL DE CICLOFOSFAMIDA – AVALIAÇÃO LONGITUDINAL

Trata-se de um estudo retrospectivo, longitudinal, no qual foram analisados os níveis séricos de survivina e VEGF de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e acometimento renal ativo (NL confirmadas por biópsia renal) e que foram submetidos ao tratamento com ciclofosfamida endovenosa, por período mínimo de seis meses. Os pacientes foram acompanhados pelo serviço de reumatologia do hospital das clínicas de Ribeirão Preto entre os anos de 2000 e 2015. Neste estudo também foi avaliada a eficácia da resposta terapêutica à ciclofosfamida apresentada pelos pacientes.

4.2.1 Critérios de inclusão

1. Todos os pacientes preencheram os critérios de classificação diagnóstica para lúpus eritematoso sistêmico do Colégio Americano de Reumatologia (1997- ACR)
2. Todos os pacientes apresentavam-se com acometimento renal (nefrite lúpica ativa).
3. Faixa etária: 18 a 60 anos, sem distinção de gênero.
4. Todos os pacientes tinham avaliação histológica através de biópsia renal.
5. Tratamento com ciclofosfamida endovenosa por no mínimo 6 meses.
6. Possuir amostras de soros armazenadas no biorrepositório do laboratório de Imunologia Clínica – HC-FMRP-USP antes e após 6 meses do tratamento com ciclofosfamida entre 2000 e 2015.
7. Acompanhamento nos ambulatórios do hospital das clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HC-FMRP-USP) no período de 2000 a 2015.
8. Concordância em participar do estudo após leitura e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

4.2.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo os pacientes com nefrite lúpica que apresentaram outras condições que pudessem interferir diretamente no prognóstico da doença renal, como diabetes mellitus, cardiopatias, hipertensão arterial primária, hepatopatia crônica e cirrose hepática, doença renal policística, gestantes e lactantes.

4.2.3 Caracterização clínico-laboratorial dos pacientes

A caracterização demográfica, clínica e histológica foi realizada pela revisão de prontuários e foram coletados os dados apresentados no Apêndice 1. Foram também catalogadas informações sobre critérios de classificação diagnóstica de cada paciente, comorbidades e tratamentos já realizados previamente. Para dados sobre a atividade do LES foi utilizado o *Systemic lupus erythematosus disease activity index* (SLEDAI). O instrumento SLEDAI visa quantificar a atividade da doença nos últimos 10 dias através de critérios clínicos e laboratoriais (Apêndice 2). A escala varia de 0 a 105, sendo definido como doença inativa SLEDAI ≤ 4 e doença ativa SLEDAI >4 (Ceccarelli et al., 2015).

A caracterização laboratorial foi realizada por análise retrospectiva dos exames de rotina para avaliação da NL (ureia e creatinina, níveis séricos de albumina, sedimento urinário, proteinúria de 24 horas, titulação do anticorpo anti-dsDNA e das frações do complemento C3 e C4). Esses exames foram realizados antes e logo após os seis meses de tratamento com a pulsoterapia de ciclofosfamida e metilprednisolona.

Foi considerado em remissão completa após 6 meses de tratamento o paciente que apresentou os seguintes critérios: níveis normais da taxa de filtração glomerular, proteinúria <0,5g/24h e sedimento urinário inativo. Foi considerado em remissão parcial o paciente que apresentou proteinúria <3g/24h (se proteinúria inicial >3g/24h) ou redução de 50% da proteinúria, se proteinúria <3g/24h associado à melhora da taxa de filtração glomerular em aproximadamente 25%. A análise da albumina sérica foi por método calorimétrico que estabelece valores normais entre 3,5 e 5,0 g/dl.

4.3 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE SURVIVINA E VEGF DE INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS E DE PACIENTES COM LES DE ACORDO COM A PRESENÇA OU NÃO DE NEFRITE LÚPICA E DE ATIVIDADE DA DOENÇA: AVALIAÇÃO TRANSVERSAL

Trata-se de um estudo transversal, no qual foram analisados os níveis séricos de survivina, VEGF e HIF-1α de indivíduos voluntários saudáveis, de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e acometimento renal ativo (NLa) e inativo (NLr), bem como de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico sem doença renal, com lupus ativo (LESa) e inativo (LESr).

Definição dos grupos:

- Grupo I: pacientes com LES com nefrite e doença ativa, definida como SLEDAI >5;
- Grupo II: pacientes com LES com nefrite e doença inativa, definida como SLEDAI <2;
- Grupo III: pacientes com LES sem nefrite e doença ativa, definida como SLEDAI >5;
- Grupo IV: pacientes com LES sem nefrite e doença inativa, definida como SLEDAI<2; e
- Grupo V: indivíduos saudáveis, pareados de acordo com sexo e idade.

4.4 DETECÇÃO DE SURVIVINA E VEGF

A quantificação da survivina e VEGF foi feita no laboratório de Imunologia da Divisão de Imunologia Clínica da FMRP – USP, através da técnica de imunoensaio enzimático quantitativo (ELISA), usando respectivamente o Kit ELISA Survivin Quantikine da marca R&DSystems e Kit ELISA RayBiotech. Para tal avaliação foram respeitadas todas as especificações do fabricante (Apêndice 3).

Para a avaliação sérica da survivina e VEGF foram utilizadas amostras de soro congelado e armazenado a - 80° no biorreservatório do hospital e que foram coletadas durante o acompanhamento da doença.

4.5 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Foi realizada revisão dos prontuários para catálogo dos dados referentes às biópsias renais de cada paciente. Foram documentadas avaliação histológica e imunohistoquímica. Foram analisadas separadamente as diferentes classes de nefrite lúpica, de acordo com a classificação de nefrite lúpica estabelecida pela Sociedade Internacional de Nefrologia/Sociedade de Patologia Renal (ISN/RPS) 2003.

4.6 ASPECTOS ÉTICOS

O presente projeto foi submetido à aprovação pela Comissão de Normas Éticas Regulamentares do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. O estudo foi aprovado pelo comitê de Ética em pesquisa do HC-FMRP (n° 146/2011 e Parecer n° 2789973) e seguido o *guideline* da Conferência de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (ICH-GCP).

Os pacientes que preencheram os critérios necessários para constituir a amostra do presente estudo foram convidados a participar da pesquisa, permitindo voluntariamente o uso das amostras de soro previamente coletadas. Foi assegurado ao voluntário no momento do convite que, caso ele não quisesse participar, tal decisão não traria nenhum tipo de prejuízo para ele, bem como haveria total liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento no transcorrer da pesquisa e deixar de participar do estudo.

Para os voluntários foi lido o termo de consentimento, fornecendo-lhes informações sobre a justificativa, objetivos, procedimentos, riscos e benefícios do estudo ao qual foram convidados a participar. No caso de pacientes cujo juízo crítico da realidade estivesse prejudicado, foi solicitado o consentimento de um familiar. A todos os voluntários foi garantido o direito de receber informações e esclarecimentos quanto a qualquer dúvida que surja no transcorrer do procedimento e informação atualizada sobre o estudo, ainda que isso pudesse afetar sua vontade de continuar participando, além da garantia de que não seriam identificados e que suas informações seriam mantidas em caráter confidencial.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A estatística descritiva foi apresentada através de frequência absoluta e relativa, de média (desvio padrão - DP) para dados paramétricos e de mediana (1º quartil – 3º quartil - IQR) para dados não paramétricos. O pressuposto de normalidade dos dados foi avaliado pela inspeção visual do histograma, pelos valores de assimetria e curtose e pelo teste Komolgorov-Smirnov. A igualdade de variâncias foi avaliada pelo teste de Levene. Uma vez não atendidos os pressupostos paramétricos de normalidade e igualdade de variâncias, optou-se pela utilização de testes não paramétricos. No estudo longitudinal, para avaliar a eficácia do tratamento, utilizou-se o teste Qui-Quadrado, considerando a probabilidade a priori de 50% de remissão na amostra (Klumb et al., 2015). Para investigar a resposta ao tratamento, utilizou-se o teste de Wilcoxon (variáveis quantitativas) e o teste de McNemar (variáveis qualitativas). Por fim, para testar diferenças entre os grupos e possíveis variáveis associadas à remissão da doença, utilizou-se o teste U de Mann-Whitney e o teste Qui-Quadrado, respectivamente. O tamanho do efeito foi avaliado pelo V de Cramer (COHEN, 1992). Para avaliação entre os grupos nefrite lúpica foi usado teste t-student e teste exato de fisher. Para comparação entre albumina e fração do complemento foi usado curva ROC. No estudo transversal, para testar diferenças nos biomarcadores entre os grupos de pacientes e controles saudáveis, utilizou-se ANOVA de Kruskal-Wallis. Quando encontrada diferença significante, foram realizadas comparações múltiplas, através do teste U de Mann-Whitney, com correção de Bonferroni. Todas as análises foram feitas no IBM SPSS versão 21.0 (IBM Corp., Armonk, NY). O valor de $p \leq 0,05$ foi adotado para significância estatística.

5 RESULTADOS

No período de junho a setembro de 2015 foi realizada revisão de prontuários de pacientes portadores de NL que fizeram acompanhamento no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto entre 2000 e 2015, e receberam tratamento com pulsoterapia de ciclofosfamida e metilprednisolona endovenosa. Através de tal revisão, foi estabelecido o perfil demográfico, clínico e laboratorial desses pacientes, e obtidos os dados referentes à resposta terapêutica e padrão histológico renal apresentado.

Para a análise longitudinal foi obtida uma amostra de 205 pacientes com NL, sendo 80 pacientes excluídos devido a não realização de biópsia renal. Desses 125 restantes, 28 pacientes foram excluídos por não completarem o tratamento com ciclofosfamida por 6 meses ou por limitação da análise laboratorial adequada. Por fim, foi obtido uma amostra de 97 pacientes com nefrite lúpica que realizaram biópsia renal e avaliação laboratorial completa, pré e pós 6 meses de tratamento com ciclofosfamida (Figura 6).

Para o estudo transversal foi obtido uma amostra de 200 pacientes lúpicos distribuídos de acordo com os subgrupos abaixo:

- Nefrite lúpica ativo (NLa) = 50 indivíduos;
- Nefrite lúpica em remissão (NLr) = 44 indivíduos;
- Lupus ativo, sem nefrite (LESa) = 52 indivíduos;
- Lupus em remissão, sem nefrite (LESr) = 54 indivíduos; e
- Grupo controle (GC) = 45 indivíduos.

Para grupo controle obteve-se 45 indivíduos saudáveis, pareados por sexo e idade.

5.1 AVALIAÇÃO GERAL DOS PACIENTES LÚPICOS

Foram analisados retrospectivamente um total de 810 prontuários médicos de pacientes portadores de LES acompanhados pelo departamento de Reumatologia no período de 2000 a 2015, totalizando uma amostra final de 297 pacientes para o estudo. Entre esses pacientes, 191 (64.3%) foram diagnosticados com nefrite lúpica e 106

(35.7%) com LES sem nefrite. Considerando a amostragem total (n= 297), 91.6% eram mulheres e a média de idade foi 33.5 ± 12.6 (18- 69) anos.

As características clínicas e demográficas da amostra em estudo estão descritas na Tabela 2. As manifestações clínicas mais comuns, dentre as previstas nos critérios de classificação ACR, foram o acometimento cutâneo (68.6%) e articular (62.6%), seguidos das citopenias (48.4%) e serosites (28.9%). Foi revelada uma alta frequência de positividade do FAN (96%) e do anti-dsDNA (69%), enquanto que a positividade do anti-SM (27,6%) e do anti-APL (36%) foram similares ao encontrado na literatura.

A taxa de realização de biópsia renal foi 64.3% (n= 191/297) na amostra total e de 100% nos pacientes incluídos nos grupos NL, com critério para acometimento renal. Os achados histológicos predominantes foram das classes proliferativa e membranoproliferativa. Alguns poucos indivíduos (n= 10) foram tratados com pulsoterapia de ciclofosfamida e metilprednisolona a despeito dos achados histológicos compatíveis com nefrite mesangial (classe II). Tal conduta foi devido ao grave comportamento clínico e laboratorial de síndrome nefrítica-nefrótica apresentado por esses pacientes.

No tocante aos novos possíveis biomarcadores, foi realizada comparação global dos pacientes portadores de LES com os indivíduos que compuseram o grupo controle. Os pacientes lúpicos apresentaram níveis reduzidos de survivina comparativamente aos controles (p=0,0079), enquanto apresentaram níveis aumentados de VEGF (p= 0,0143), ambos com significância estatística através do teste de Mann Whitney (Tabela 2).

Tabela 2 – Aspectos demográficos, clínicos e laboratoriais do grupo total de pacientes portadores de LES

Características do grupo LES	**n= 297 (%)**	**Grupo controle n= 45 (%)**
Idade (anos), média ± DP	33 ± 12,5	41,2 ± 8,4
Gênero M/F	1:13	1:1,5
Feminino (%)	276/297 (92,9)	28 (62,5)
Etnia		
Branco (%)	224/297 (75,4)	38(84,4)
SLEDAI score, mediana (IQR)	14,0 (12 – 20)	NA

Tabela 2 – Aspectos demográficos, clínicos e laboratoriais do grupo total de pacientes portadores de LES

Classificação Biópsia renal (%)		NA
Class II	35/191 (18,32)	
Class III	20/191 (10,47)	
Class IV	82/191(42,9)	
Class IV and V	15/191(7,8)	
Class V	39/191 (20,41)	
Achados Clínicos (%)		NA
Lesões cutâneas	203/297(68,35)	
Artrites	186/297(62,62)	
Hematológica	144/297(48,48)	
Serosites	86/297(28,95)	
Manifestações neurológica ou psiquiátrica	32/297(10,77)	
Parâmetros laboratoriais (% de positividade)		NA
ANA	287/297 (96,6)	
anti-dsDNA	206/297 (69,3)	
anti-APL	107/297 (36)	
anti-SM	82 (27,6)	
Survivina levels (pg/ml) mediana (IQR)	42,83 (41,18 – 46,95)	46.95 (42,8 – 51,1) p= 0,0079
VEGF (pg/ml) mediana (IQR)	30,04 (15,39 – 46,06)	20,47 (8,115 – 35,23) p= 0,0143

Legenda: ANA= anticorpo antinúcleo, anti-APL= anticorpo antifosfolipides.

5.2 ESTUDO LONGITUDINAL (ANÁLISES ANTES E APÓS TRATAMENTO DA NEFRITE LÚPICA)

Considerando a amostragem (n= 97), 89% eram mulheres e a média de idade foi 29 ± 11,13 (18-69) anos. As principais características clínicas e demográficas encontram-se descrita na tabela 3. As manifestações clínicas mais comuns, dentre as previstas nos critérios de classificação ACR, foram o acometimento cutâneo (71%) e articular (60.8%), seguido das citopenias (46.4%) e serosites (31.9%). Foi revelada uma alta frequência da positividade do FAN (96%) e anti-dsDNA (74%), enquanto a positividade do anti SM e anti-APL foram similares ao encontrado na literatura. A taxa de realização de biópsia renal foi 100% dos pacientes, tendo o predomínio das classes proliferativa e

membranosa. Poucos indivíduos (n= 10) foram tratados com pulsoterapia a despeito dos achados compatíveis com nefrite mesangial, devido ao comportamento clínico e laboratorial nefrítico-nefrótico, como já dito.

Tabela 3 – Aspectos demográficos, clínicos, laboratoriais e histopatológicos do grupo LES com nefrite ativa

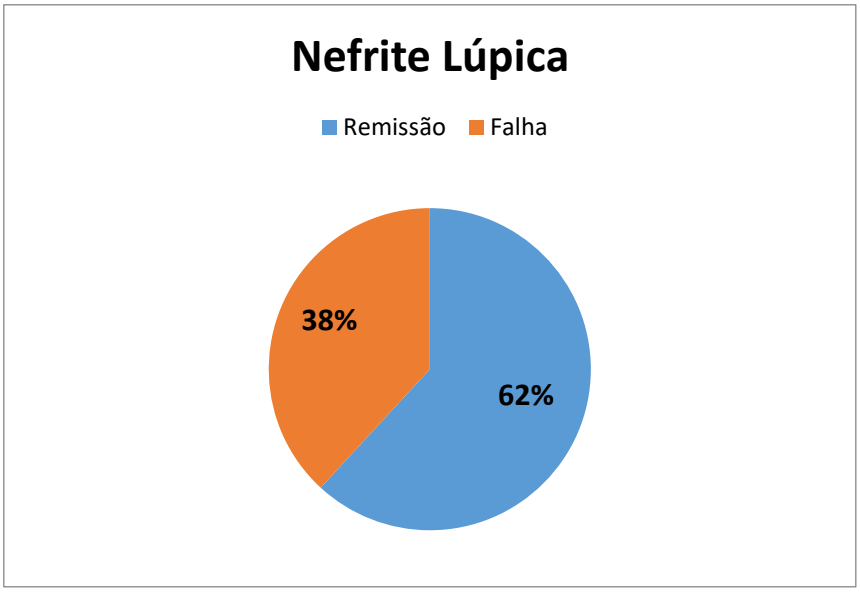
Características do grupo NL ativo	**n= 97**
Idade (anos), media ± DP	29 ± 11,13
Gênero M/F	1:11.5
Feminino (%)	82 (89)
Etnia	
Branco (%)	65 (67)
Idade do diagnostico (anos), média ± DP	26 ± 10,46
Classificação Histopatológica* (%)	
Classe II	10 (10,3)
Classe III	11 (11,3)
Classe IV	44 (45,4)
Classe IV and V	11 (11,3)
Classe V	21 (21,6)
Achados Clínicos (%)	
Lesões cutâneas	69 (71,1)
Artrites	59 (60,8)
Hematológica	45 (46,4)
Serosites	31 (31,9)
Manifestação Neurológica ou psiquiátrica	10 (10,3)
Parâmetros Laboratoriais (% de positividade)	
ANA	94 (96,9)
anti-dsDNA	72 (74,2)
anti-APL	30 (30,9)
anti-SM	31 (21,9)

Legenda: Aspectos demográficos, clínicos, laboratoriais e histopatológicos do grupo LES com nefrite ativa (n=97) que receberam terapia com ciclofosfamida e metilprednisolona (estudo longitudinal). Class II: nefrite proliferative mesangial, Class III: nefrite Lupica focal, Class IV: nefrite difusa segmentar ou global, Class V: nefrite Lupica membranosa, Class IV and V: combinação de membranosa e glomerulonfrite proliferative, Class VI: nefrite esclerosante avançada (Based na Sociedade International de Nefrologia/Sociedade Patologia Renal 2003 – Classificaçao de Nefrite Lupica). ANA= anticorpo antinuclear, anti-dsDNA= anticorpo anti-DNA dupla hélice, anti-SM =anti-smith anticorpo, anti-APL =anticorpos antifosfolipides. *Todos os casos de NL foram confirmados por biópsia renal (HE e imunofluorescência).

5.2.1 Taxa de remissão geral e por classe histológica

Nesse grupo de 97 pacientes com nefrite lúpica ativa, tratados com pulsoterapia de ciclofosfamida e metilprednisolona por 6 meses, obteve-se que 62% (n= 60) dos pacientes remitiram, sendo 29% de pacientes com remissão completa (RC) e 33% com remissão parcial (RP) de acordo com os critérios estabelecidos. O grupo falha terapêutica (FT) foi composto por pacientes que mantiveram atividade de doença (38%, n= 37/97) após 6 meses de pulsoterapia com ciclofosfamida e metilprednisolona (Figura 5).

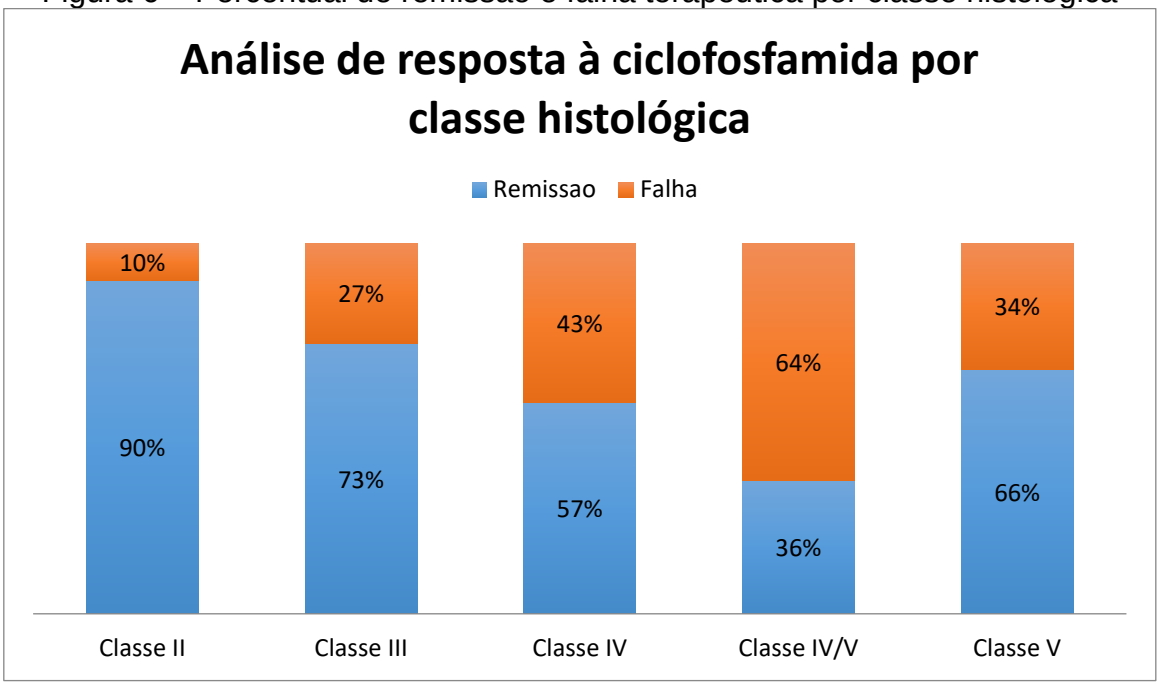
Figura 5 – percentual de remissão e falha terapêutica na amostra estudada (n=97)



Fonte: Elaboração própria.

Ao realizar essa análise por classe histológica, observou-se que as classes histológicas II e III obtiveram maior percentual de remissão comparativamente às demais classes analisadas (x^2= 7.617,4; p<0.1067) (Figura 6).

Figura 6 – Percentual de remissão e falha terapêutica por classe histológica



Fonte: Elaboração própria.

5.2.2 Avaliação do nível sérico de survivina e VEGF dos pacientes portadores de NL, pré-tratamento, divididos por classe histológica

Foi realizada a dosagem sérica de survivina e VEGF nos pacientes com NL no estudo longitudinal e proposta uma análise por classe histológica. As comparações entre classes foram realizadas com as dosagens séricas de survivina e VEGF obtidas pré-tratamento. Não foram observadas diferenças com significância estatística entre as dosagens em cada classe de nefrite, nem para survivina (p=0,756) nem para VEGF (p= 0,49) (Tabela 4).

Tabela 4 – Dosagem sérica de survivina e VEGF nos pacientes com NL divididos por classe histológica da nefrite lúpica (NL)

Classe histológica da NL	**II (n= 10)**	**III (n= 11)**	**IV (n= 44)**	**IV/V (n= 11)**	**V (n= 21)**	**p**
Survivina (pg/ml) Mediana	45,30	46,95	46,54	45,30	44,48	0,75

Tabela 4 – Dosagem sérica de survivina e VEGF nos pacientes com NL divididos por classe histológica da nefrite lúpica (NL)

IQR	43,4-54,6	43,6-56,0	42,8-64,2	41,1-72,1	40,3-66,4	
VEGF (pg/ml) Mediana	31,83	27,42	28,15	20,80	40,0	0,49
IQR	22,4-45,1	19,2-36,9	19,2-37,7	0-30,62	27,3-50,17	

5.2.3 Avaliação dos níveis séricos de survivina e VEGF dos pacientes portadores de NL tratados com pulsoterapia de metilprednisolona e ciclofosfamida, antes e após o tratamento

Foram realizadas as dosagens séricas de survivina e de VEGF antes e após tratamento com ciclofosfamida e, ao analisá-las comparativamente, foi observada redução dos níveis de survivina com significância estatística pós-tratamento (p<0,0001). Não foi observada alteração significativa para os níveis séricos de VEGF (Tabela 5). Também foram observadas a melhora da função renal (p=0,0023), redução do SLEDAI e da proteinúria (p<0,0001), caracteres esses usados como critérios de remissão da doença (Tabela 5).

Tabela 5 – Caraterísticas de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico antes e após tratamento medicamentoso (n= 97)

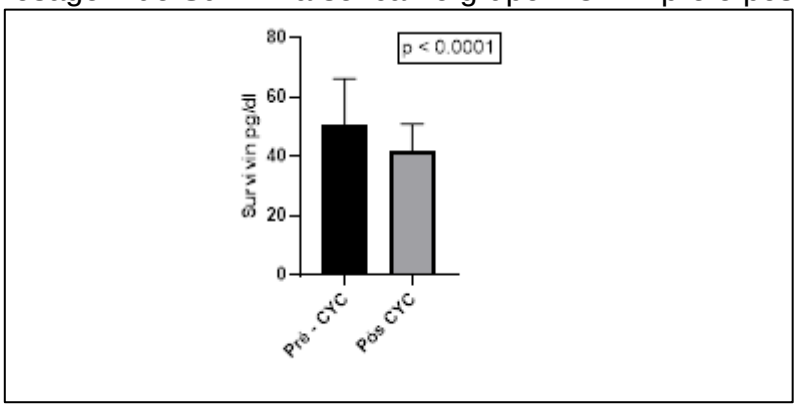
	Pacientes NL ativa		
	Pré-tratamento	Pós-tratamento	p-valor
Survivina (pg/ml)			<0.0001*
mediana (IQR)	45,30 (43,8 – 65,0)	43,66 (40,3 – 46,1)	
média ± DP	52,32 ± 14,89	43,75 ± 4,72	
VEGF (pg/ml)	29,25	30,70	0,82
Mediana (IQR)	(19,93 – 42,01)	(18,8 – 46,3)	
SLEDAI score			<0.0001*
mediana (IQR)	14 (12 - 20)	4 (2 - 8)	
media ± DP	15,69 ± 5,4	5,58 ± 4,7	

Tabela 5 – Caraterísticas de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico antes e após tratamento medicamentoso (n= 97)

CrCl (ml/min)			0.0023*
<90 ml/min	57,8%	36,1%	
≥90 ml/min	42,2%	63,9%	
C3 and C4 (g/l)			<0.0001*
Normal	22.1%	67%	
Baixo	77,9%	33%	
Anti-dsDNA			<0.0001*
Negativo	18 %	66.3%	
Positivo	82 %	33,7%	
Proteinúria 24-h (mg)			<0.0001*
média ± DP	3,045 ± 2,540	1,326 ± 1,490	
mediana (IQR)	1,980 (1,262 - 4,111)	787 (288 - 1,780)	

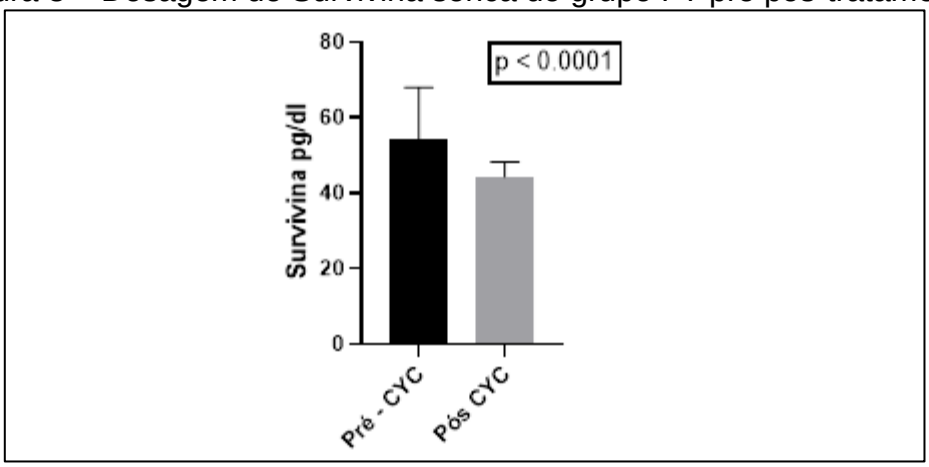
Ao analisarmos separadamente o grupo que apresentou remissão da nefrite, completa ou parcialmente (RC e RP, n= 60), houve redução significante dos níveis séricos da survivina após uso de ciclofosfamida (p=0,0001) (Figura 7). O mesmo foi observado com o grupo que apresentou falha terapêutica (FT, n= 37) à pulsoterapia (p =0,0001), não sendo possível distingui-los com base nesse critério (Figura 8).

Figura 7 – Dosagem de Survivina sérica no grupo RC-RP pré e pós-tratamento



Fonte: Elaboração própria.

Figura 8 – Dosagem de Survivina sérica do grupo FT pré pós-tratamento



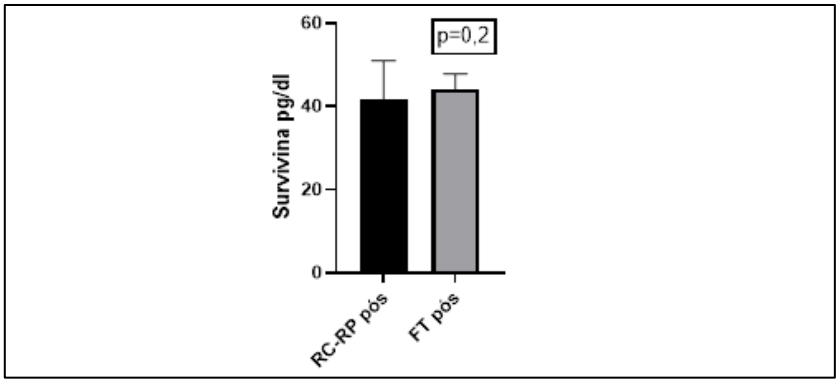
Fonte: Elaboração própria.

A análise do VEGF sérico no grupo remissão da nefrite (RC e RP, n= 60) e no grupo falha terapêutica (FT, n= 37) não mostrou diferença estatística pré ou pós uso de ciclofosfamida, p= 0,90 e p= 0,70 respectivamente.

Ao comparar os níveis séricos de survivina e VEGF pré-ciclofosfamida do grupo RC-RP com o grupo FT, não houve significância estatística para qualquer um dos marcadores (Survivina: p= 0,18 e VEGF: p= 0,70).

Ao analisarmos comparativamente os níveis séricos de survivina do grupo que obteve remissão da nefrite (RC-RP) com o grupo falha terapêutica (FT), no momento pós-ciclofosfamida, não foi possível demonstrar diferença significativa entre eles (p= 0.2) (Figura 9). A avaliação envolvendo os níveis de VEGF pós-tratamento (p= 0,52) também não apresentou diferença com significância estatística.

Figura 9 – Dosagem de Survivina sérica pós-tratamento: RC-RP x FT



Fonte: Elaboração própria.

5.2.4 Avaliação do nível sérico de albumina dos pacientes portadores de NL tratados com pulsoterapia de metilprednisolona e ciclofosfamida

No estudo longitudinal, foi evidenciado aumento da albumina sérica com significância estatística (p<0,0001) após o tratamento com metilprednisolona e ciclofosfamida, sendo seu comportamento similar às frações do complemento, além de ter sido observado correlação inversa moderada entre os níveis de albumina e SLEDAI, [r= -0,64 (-0,72 a - 0,54), p<0,0001] (Tabela 6).

Tabela 6 – Caraterísticas de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico antes e após tratamento medicamentoso comparando com comportamento da albumina (n= 97)

	Pré-tratamento	**Pós-tratamento**	**p-valor**
SLEDAI	14,0 (12,0 – 20,0)	4,0 (2,0 – 8,0)	<0,0001*
ClCr			0,003*
<90ml/min	57,8%	36,1%	
>90ml/min	42,2%	63,9%	
C3-C4			<0,0001*
Normal	22,1%	67,0%	
Baixo	77,9%	33,0%	
Anti-DNA			<0,0001*
Negativo	18,0%	66,3%	

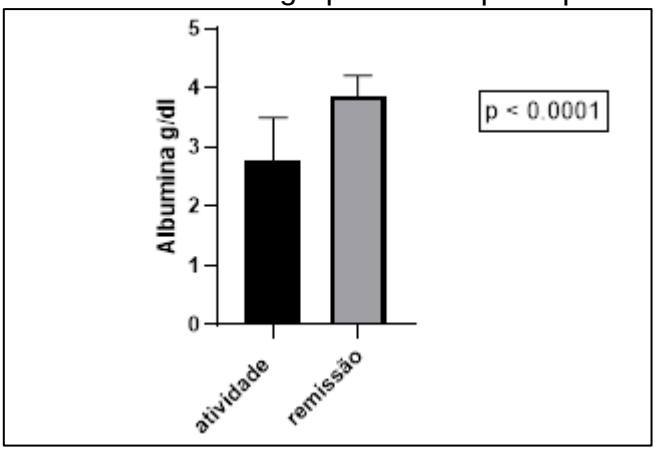
Tabela 6 – Caraterísticas de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico antes e após tratamento medicamentoso comparando com comportamento da albumina (n= 97)

Positivo	82,0%	33,7%	
Proteinúria (g/24h)	1,98 (1,26 – 4,11)	0,91 (0,27 – 1,79)	<0,0001*
Albumina (g/dL)	3,00 (2,26 – 3,30)	3,80 (3,40 – 4,00)	<0,0001*
Baixa	79,6%	30,7%	
Normal	20,4%	69,3%	

Legenda: Porcentagens (%) para variáveis qualitativas; mediana (1ºquartil – 3ºquartil) para variáveis quantitativas; *diferença significativa, p<0,05.

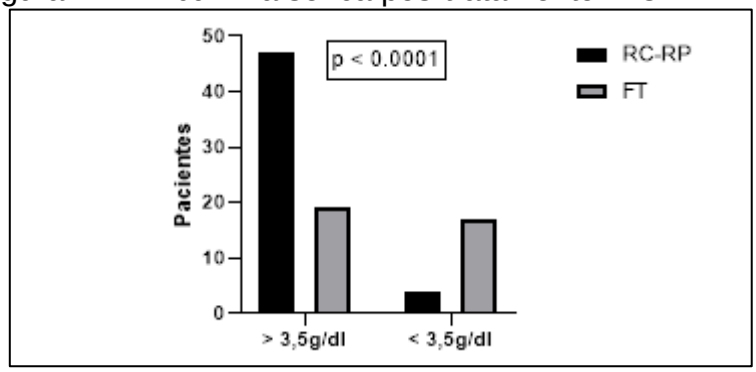
O grupo com resposta ao tratamento, RC-RP (n= 60), apresentou aumento de albumina, com significância estatística (p= 0,0001) (Figura 10), sendo que 92% (n= 55) desse grupo apresentou nível sérico superior a 3,5 g/dL, enquanto no grupo FT (n= 37), apenas 52,7% (n= 19) apresentou nível sérico superior a 3,5 g/dL (p=0,0001) (Figura 11). Na nossa casuística, o paciente que normalizou os níveis séricos de albumina após o tratamento apresentou uma chance dez vezes maior de remissão da doença em comparação com aqueles que continuaram com níveis reduzidos de albumina [OR = 10.5 (IC95%= 3.0-30.84)].

Figura 10 – Albumina sérica do grupo RC-RP pré e pós ciclofosfamida



Fonte: Elaboração própria.

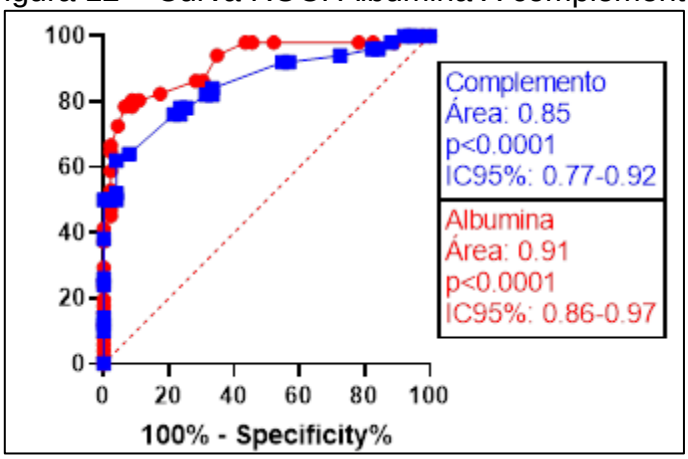
Figura 11 – Albumina sérica pós-tratamento: RC-RP x FT



Fonte: Elaboração própria.

Foi realizada a curva ROC da albumina comparando-a à fração do complemento C3, proteína já estabelecida como biomarcador de atividade nos pacientes com nefrite lúpica. Abaixo apresentamos os resultados similares, com significância estatística (p<0,0001) (Figura 12):

Figura 12 – Curva ROC: Albumina X complemento



Fonte: Elaboração própria.

5.2.5 Avaliação laboratorial sérica e urinária de acordo com as classes histológicas da nefrite lúpica

Foram descritos os achados séricos e urinários discriminados por classe histológica estabelecida pela Sociedade Internacional de Nefrologia/Sociedade de Patologia Renal (ISN/RPS) 2003 (Tabela 7). Em seguida, foi realizada uma análise

comparativa entre os grupos com nefrite lúpica proliferativa (NLP, composto pela classe III, classe IV e classe IV/V) e o grupo nefrite lúpica não-proliferativa (NLNP, composto pela classe II e classe V).

Tabela 7 – Descrição das manifestações laboratoriais séricas e urinárias nos pacientes com NL, de acordo com as classes histológicas, segundo a Sociedade Internacional de Nefrologia/Sociedade de Patologia Renal (ISN/RPS) 2003

Manifestação laboratorial por classe (NL)	n	II (n=10)	III (n=11)	IV (n=44)	IV/V (n=11)	V (n=21)
Proteinúria <3,5g	66	10 (100%)	10 (90%)	32 (72,7%)	6 (54,5%)	8 (38%)
Proteinúria nefrótica (≥3,5g)	31	0	1 (9%)	12 (27,2%)	5 (45,4%)	13 (61,9%)
Hematúria	63	5 (50%)	6 (54,5%)	34 (77,2%)	9 (81,8%)	9 (42,8)
Leucocitúria	30	0	6 (54,5%)	18 (40,9%)	2 (18,1%)	4 (19%)
Cilindrúria	47	6 (60%)	4 (36,3%)	21 (47,7%)	5 (45,4%)	11 (52,3%)
Insuficiência Renal (Clcr< 90%)	58	1 (10%)	7 (63,6%)	30 (68,1%)	6 (54,5%)	11 (52,3%)
Anti-dsDNA	77	7 (70%)	11 (100%)	41 (93,1%)	6 (54,5%)	12 (57,1%)
Consumo Complemento	75	8 (80%)	10 (90%)	38 (86,3%)	7 (63,6%)	12 (57,1%)
Albumina <3,5g/dL	87	7 (70%)	7 (63,6%)	36 (81,8%)	8 (72,7%)	19 (90,4%)

Nesta casuística, a análise de classes histológicas agrupadas em nefrite proliferativa (NLP, n= 66) e não-proliferativa (NLNP, n= 31) pela histologia renal mostrou que hematúria, leucocitúria, anti-DNA e ocorrência de insuficiência renal prevalece no grupo das nefrites proliferativas. Por outro lado, a proteinúria, a presença de cilindros granulosos, a redução sérica das frações do complemento e albumina não mostraram diferença significativa entre esses dois grupos (tabela 8). Isso deveu-se a um viés de seleção desses pacientes, pelo fato de que mereceram tratamento da nefrite com pulsoterapia de ciclofosfamida e metilprednisolona, à semelhança daquele oferecido tradicionalmente às classes III, IV e IV/V. A despeito de terem classificação histológica não-proliferativa pela biópsia renal (classes II e V), o comportamento da nefrite lúpica, com base na apresentação clínica e laboratorial, era de síndrome nefrítico-nefrótica.

Tabela 8 – Comparação de parâmetros laboratoriais entre NL proliferativa (classe III, IV e IV/V) e nefrite lúpica não-proliferativa (classe II e classe V). Dados foram analisados pelo teste t *student* e teste exato de Fisher

Manifestações Laboratoriais na NL	**NLP (n= 66)**	**NLNP (31)**	**p**
Proteinúria (mg/24h)	2859 (±2419)	3440 (±2805)	0,150
Hematúria	49 (74,24%)	14 (45,16%)	0,006
Leucocitúria	26 (39,39%)	4 (12,9%)	0,0095
Cilindrúria	30 (45,45%)	17 (54,84%)	0,510
Insuficiência Renal (< 90%)	43 (65,15%)	12 (38,71%)	0,0169
Anti-DNA	58 (87,88%)	19 (61,29%)	0,0058
Consumo complemento	55 (83,33%)	20 (64,52%)	0,066
Albumina (g/dL)	2,83 (±0,73)	2,86 (±0,68)	0,83

5.3 ESTUDO TRANSVERSAL

O estudo transversal contou com uma amostra de 200 pacientes lúpicos distribuídos de acordo com os seguintes subgrupos: NLa (nefrite lúpica ativa, n= 50), NLr (nefrite lúpica em remissão, n= 44), LESa (lupus ativo sem nefrite, n= 52) e LESr (lupus

em remissão sem nefrite, n= 54) e um grupo de indivíduos sadios para controle (GC, n= 45 indivíduos).

5.3.1 Avaliação dos níveis séricos de survivina e VEGF de pacientes portadores de LES

Com base na inspeção visual dos histogramas, nos valores de assimetria e curtose e na rejeição da hipótese nula pelo teste de normalidade, constatou-se que os biomarcadores não apresentaram distribuição normal.

Quando realizada análise dos níveis séricos de survivina e VEGF no total dos pacientes lúpicos (com ou sem nefrite, em atividade ou remissão, n=200), comparando-os aos indivíduos saudáveis, tanto survivina quanto VEGF mostraram resultados diferentes, estatisticamente significativos. Pacientes portadores de LES apresentaram níveis séricos reduzidos de survivina e níveis aumentados de VEGF quando comparados aos indivíduos saudáveis (Tabela 9).

Tabela 9 – Dosagem sérica de Survivina e VEGF nos pacientes lúpicos comparados ao grupo controle: análise geral

Biomarcador	LES (n= 200)	Controles (n= 45)	p
Survivina pg/mL Mediana (IIQ)	42,83 (41,18 – 46,95)	46,95 (42,83 – 51,07)	0,0079
VEGF pg/mL Mediana (IIQ)	29,18 (13,64 – 45,96)	20,47 (8,115 – 35,23)	0,0369

.

Em seguida, foi realizada uma análise comparativa dos pacientes lúpicos divididos nos grupos nefrite ativa, nefrite inativa, lúpus em atividade e lúpus em remissão, sendo os 2 últimos grupos não portadores de NL. A comparação foi realizada entre os grupos lupicos e deles com o grupo controle. Os níveis séricos da survivina foram significativamente menores nos indivíduos portadores de LES, quando comparado ao grupo controle, não havendo, entretanto, diferença entre os grupos lupicos (ANOVA de Kruskal-Wallis, (p= 0,019)). A avaliação de VEGF não apresentou diferença significativa entre os grupos lupicos e nem deles comparados com o grupo controle separadamente

(Tabela 10). Portanto, não foi possível discriminar o grupo de pacientes lúpicos com ou sem nefrite, ativos ou inativos através dos níveis séricos da survivina ou VEGF.

Tabela 10 – Aspectos clínicos, demográficos, laboratoriais, e avaliação do nível sérico de survivina e de VEGF dos quatro subgrupos lúpicos (lupus eritematoso sistêmico ativo e inativo, com e sem nefrite) comparando-os com grupo controle. Para análise do estudo tudo transversal foi usado teste de ANOVA de Kruskal-Wallis

	NLa	**NLr**	**LESa**	**LESr**	**Controles**	**p-valor**
	n= 50	**n= 44**	**n= 52**	**n= 54**	**n= 45**	
Idade (anos)						
média ± DP	30,1 ± 10,9	35,1 ± 13,2	36,5 ± 13,15	39,4 ± 11,9	41,2 ± 12,1	**0,0019***
Gênero						
Feminino (%)	46 (92)	40 (90,9)	51 (94,4)	53 (96,3)	28 (62,2)	**0,127**
Etnia						
Branco (%)	35 (70,0)	35 (79,5)	47 (87)	41 (74,5)	38 (84,4)	**0,157**
SLEDAI score mediana ± IQR	16 (12 - 18)	0 (0 - 2)	7,5 (6 – 10)	0 (0 - 2)	NA	**0,0001***
Sinais clínicos (%)					NA	
Lesões cutâneas	32 (64)	29 (66)	38 (73)	37 (68)		**0,617**
Artrite	22 (44)	31 (70)	41 (79)	34 (63)		**0,004**
Serosite	13 (26)	18 (41)	17 (33)	8 (15)		**0,064**
Hematológica	19 (38)	18 (41)	35 (67)	28 (52)		**0,019**
Neurológico	8 (16)	2 (4.5)	13 (25)	3 (5)		**0,012**

Tabela 10 – Aspectos clínicos, demográficos, laboratoriais, e avaliação do nível sérico de survivina e de VEGF dos quatro subgrupos lúpicos (lupus eritematoso sistêmico ativo e inativo, com e sem nefrite) comparando-os com grupo controle. Para análise do estudo tudo transversal foi usado teste de ANOVA de Kruskal-Wallis

Laboratório						
(% de positividade)					NA	
ANA	50 (100)	43 (98)	52 (100)	54 (100)		**0,335**
anti-dsDNA	47 (94)	33 (75)	31 (60)	21 (39)		**<0,0001**
anti-SM	14 (28)	11 (25)	11 (21)	13 (24)		**0,987**
anti-APL	14 (28)	16 (36)	16 (30)	24 (44)		**0,173**
Survivina						
(pg/mL)	42,83	42,83	42,01	42,83	46,95	
mediana (IQR)	(40,3 – 47,5)	(40,3 –46,1)	(40,3 – 44,4)	(41,1-46,1)	(42,8 –51,0)	**0,019***
VEGF						
(pg/dl)	28,54	28,29	26,41	29,98	20,47	**0,255**
mediana (IQR)	(7,9-43,1)	(12,8- 49,1)	(0 - 46,0)	(18,5-49,1)	(8,1 – 35,2)	

Legenda: Os dados que tiveram distribuição normal foram apresentados com média ± desvio padrão, enquanto os dados que não tiveram a distribuição normal foram apresentados com mediana (1º - 3º quartil). Foram usados ANOVA, Kruskal– Wallis, x2 test e acordo com o apropriado. Significância estatística p<0.05. LES = lupus eritematoso sistêmico, LN = nefrite Lupica, SLEDAI Index de atividade de doença Lupus eritematoso sistêmico, ANA = anticorpo antinuclear, anti- DNAds = anticorpo anti-DNA dupla, anti-Sm = anticorpo anti-smith, APL = anticorpo antifosfolipide, NA = não aplicável. A frequência dos critérios de classificação (ACR, 1997) clínicos e laboratoriais listados foram acumulativos até o momento do estudo.

5.3.2 Avaliação do nível sérico de albumina dos pacientes portadores de LES

Observamos diferença estatisticamente significativa entre os grupos de pacientes lúpicos em relação ao comportamento da albumina sérica. Os pacientes do grupo NL ativa apresentaram menores valores de albumina em comparação aos demais pacientes lúpicos e ao grupo controle. Foi realizado análise similar entre os subgrupos de pacientes lúpicos para avaliação do consumo das frações do complemento, e os grupos com doença ativa (NLa e LESa) apresentaram menores valores de C3 e C4 que os com doença inativa e os controles (X^2= 53,040; p<0,001) (Tabela 11).

Tabela 11 – Mediana (1º quartil – 3º quartil) da dosagem de albumina e percentual de pacientes com dosagem do complemento sérico consumido, nos quatro subgrupos dos pacientes lúpicos (lúpus eritematoso sistêmico ativo e inativo, com e sem nefrite), comparados entre si e com grupo controle

	Nefrite em Atividade (NLa) (n= 50)	**Nefrite em Remissão (NLr) (n= 44)**	**Sem Nefrite Atividade (LESa) (n= 52)**	**Sem Nefrite Remissão (LESr) (n= 54)**	**Controles Saudáveis (n= 45)**	**p**
Albumina (g/dl)	2,850 [a] (2,2 – 3,5)	3,890 [b] (3,5 – 4,1)	3,770 [b] (3,5 – 4,1)	3,740 [b] (3,3 – 3,8)	3,90 (3,7 – 4,1)	<0,001
C3 e C4 Consumidos	84% [a]	18,6% [b]	73,1% [a]	34,3% [b]	-	<0,001

Legenda: diferença significativa, p<0,05 pela ANOVA de Kruskal-Wallis; a e b: letras diferentes na mesma linha indicam diferenças entre os grupos, no teste post-hoc Mann-Whitney, com correção de Bonferroni.

5.4 CORRELAÇÃO ENTRE OS ACHADOS HISTOPATOLÓGICOS (ALTERAÇÃO GLOMERULAR, ACOMETIMENTO TÚBULO-INTERSTICIAL E VASCULAR) E O NÍVEL SÉRICO DE SURVIVINA E VEGF DOS PACIENTES PORTADORES DE NL ATIVA

Foi realizada uma análise entre o nível sérico de survivina e VEGF e os achados histopatológicos obtidos das biópsias renais. Obteve-se uma amostra de 191 biópsias de pacientes com NL em atividade, contendo descrição pormenorizada do acometimento

intersticial ou vascular associados ao acometimento glomerular. Para a análise, foram determinados três grupos sendo o primeiro com acometimento glomerular exclusivo, o segundo grupo com componentes glomerular e túbulo-intersticial e o terceiro grupo com comprometimento vascular associado à lesão glomerular. Dessa amostra foram retirados 28 casos por conterem achados histológicos compatíveis com alteração vascular, intersticial e glomerular concomitantes, perfazendo uma amostragem final de 163 biópsias renais. Não houve diferenças quanto à dosagem de survivina ou VEGF entre os três grupos com diferentes achados histopatológicos, p= 0,84 para survivina e p= 0,317 para VEGF (Tabela 12).

Tabela 12 – Mediana (1ºquartil – 3ºquartil) dos biomarcadores survinina e VEGF em pacientes com nefrite lúpica ativa, divididos em 3 grupos, de acordo com os achados histopatológicos obtidos por biópsia renal (n= 163)

	Glomerulonefrite (GN) (n=92)	**Nefrite Tubulo intersticial + GN (n=60)**	**Alteração vascular + GN (n=11)**	**p**
Survivina (pg/ml)	44,07 (41,39 – 57,86)	45,30 (42,01 – 66,02)	45,30 (42,01 - 48,60)	0,840
VEGF (pg/ml)	30,34 (17,48 – 43,6)	26,36 (13,78 – 42,38)	34,92 (26,52 – 48,32)	0,317

Diferença significativa, p<0,05 pela ANOVA de Kruskal-Wallis.

6 DISCUSSÃO

A expressão aumentada de survivina já foi demonstrada em muitas doenças autoimunes como artrite reumatoide, artrite idiopática juvenil, miastenia gravis, esclerose múltipla, psoríase e esclerose sistêmica (Bokarewa, Brink, Erlandsson, & Dahlqvist, 2014; Galeotti et al., 2008; Gravina et al., 2017; Lipinska, Kaszkowiak, Malachowska, Swidrowska-Jaros, & Smolewska, 2021; Sharief, Noori, Douglas, & Semra, 2002; Wang, Zhang, Xia, Zhang, & Zhang, 2016; Zafari et al., 2019) e essa regulação tem sido utilizada como marcador de inibição da apoptose de células imunes e resposta para o tratamento (Ebrahimiyan et al., 2018; Gravina et al., 2017; Mokuda et al., 2015; Zafari et al., 2019). Apoptose é um mecanismo essencial na deleção de linfócitos auto reativos durante o processo de seleção negativa no timo e na medula óssea, bem como no controle da maturação das células dendríticas e expressão de moléculas MHC II. Baseado no conhecimento prévio sobre a processo de apoptose anárquico que envolve a patogênese do LES, nós assumimos que o nível de survivina poderia estar alterado nesse perfil de pacientes (Ebrahimiyan et al., 2018; Gravina et al., 2017; Koike et al., 2010; Mita et al., 2008; Pahlavan et al., 2019). Então, a proliferação de células auto reativas poderiam explicar o papel da survivina na doença (Zafari et al., 2019).

De fato, nós encontramos níveis séricos de survivina mais baixos nos pacientes com LES do que em indivíduos saudáveis, independente da presença de glomerulonefrite ou da atividade de doença. Tal situação foi diferente de outras condições autoimunes mediadas por células T já descritas, em que a expressão da proteína está aumentada (Bokarewa et al., 2014; Ebrahimiyan et al., 2018; Galeotti et al., 2008; Gravina et al., 2017; Mokuda et al., 2015; Sharief et al., 2002; Wang et al., 2016). Consistente com nossos resultados, Ebrahimian et al. (2020) descreveu a presença de níveis séricos de survivina mais baixos em pacientes portadores de LES, independente de atividade de doença, apresentação clínica ou resposta terapêutica (Ebrahimian et al., 2020; Mahajan, Herrmann, & Muñoz, 2016), trazendo luz para um possível mecanismo efetor distinto na patogênese do LES (Ebrahimian et al., 2020). Recentemente, vários microRNAs tem sido implicados na regulação da survivina, o que pode desencadear uma regulação negativa da expressão anti-apoptotica sobre as células ou contrariamente, contribuir para

regulação positiva da survivina reforçando a ativação sustentada e autorreatividade das células autoimunes (Shomali et al., 2022).

O uso da survivina como marcador de progressão tumoral, fator de resistência terapêutica e maior agressividade das doenças neoplásicas já é bem estabelecido (Garg et al., 2016; Li, 2003). Na artrite reumatoide essa proteína pode refletir um efeito prognóstico, sinalizando pior evolução radiográfica e pior resposta terapêutica (Zafari et al., 2019). Essa ideia enfatiza outro relevante achado desse presente estudo, que foi a redução dos níveis séricos após o tratamento com ciclofosfamida. Entretanto, a redução ocorre independente do resultado terapêutico (remissão completa, remissão parcial ou falha terapêutica). Quando comparamos o nível de survivina entre os grupos remissão e falha terapêutica, não foi estabelecido diferença significante, e a survivina não teve capacidade de diferenciá-los. Nossos dados sugerem que a survivina não distingue grupos de pacientes lúpicos ativos daqueles com doença em remissão, não reflete resposta terapêutica nem sinais de prognóstico da nefrite, além de não permitir diferenciação entre as classes histológicas da nefrite lúpica, obtidas por biópsia renal. Portanto, a survivina parece não possuir características que possibilitaria sua atuação como biomarcador de NL.

Algumas drogas usadas no tratamento de doenças autoimunes afetam a expressão da survivina com inibição indireta (Groner & Weiss, 2014). A redução do nível de survivina após o tratamento, comparado com o valor antes da pulsoterapia, parece envolver o mecanismo de ação da ciclofosfamida. Essa droga bloqueia o DNA de células de alto *turnover* e o seu metabolito fosforamida atua como um agente alquilante do DNA, limitando a replicação e auxiliando na apoptose linfocitária, tendo como consequência a redução do número dessas células (Emadi, Jones, & Brodsky, 2009; Iqubal et al., 2019). Nós assumimos que isso poderia desencadear uma resposta negativa sobre a regulação da survivina, reduzindo assim seus níveis séricos. O efeito do tratamento predominaria sobre os linfócitos, devido esse grupo celular ter menor atividade da enzima aldeído desidrogenase, que confere resistência a ciclofosfamida (Emadi et al., 2009).

Além disso, o sinalizador de transdução e ativador da transcrição 3 (STAT3) é sabidamente superexpressado e hiperativado nos linfócitos dos pacientes portadores de LES (Edwards, Mizui, & Kyttaris, 2015). A via de STAT3 é ativada pela presença de

citocinas inflamatórias sobre receptores como IL-6R e IFN-gama e pela expressão aumentada de survivina. Terapia imunossupressora como ciclofosfamida, micofenolato de mofetil, inibidores de calcineurina, usualmente recomentados para o tratamento da NL, pode suprimir a fosforilação de STAT3 induzida pela IL-6 e levar à apoptose através da redução da transcrição de survivina (Aoki, Feldman, & Tosato, 2003; Fu et al., 2018).

Destacou-se entre nossos dados uma discreta diferença quantitativa entre os valores séricos de survivina entre os grupos de doença ativa e inativa, porém a variação pré e pós-tratamento com ciclofosfamida foi significante. O pequeno tamanho da amostra somado ao caráter retrospectivo do estudo expõe algumas das limitações. Futuras tentativas de avaliação sobre o comportamento da survivina, suas variantes transcricionais no subgrupo de linfócitos, bem como o eixo RNAm poderão esclarecer sua correlação com a patogênese do LES.

A angiogênese é um importante marco da ativação inflamatória das doenças auto-imunes, e o VEGF, através da proliferação e migração de células endoteliais, neoangiogênese e remodelação intersticial, tem mostrado sua participação nessas comorbidades (Ghazali et al., 2017). A presença de lesão e disfunção endotelial são considerados importantes gatilhos da doença de Kawasaki, lupus eritematoso sistêmico, doença inflamatória intestinal, doença de Behçet, esclerose sistêmica e psoríase (Zhan et al., 2021).

Estudos anteriores mostraram que níveis séricos de VEGF foram significativamente mais altos em pacientes portadores de LES comparados com indivíduos saudáveis, especialmente naqueles com atividade de doença e nos portadores de NL (Carvalho, Blank, & Shoenfeld, 2007; Ding, Liao, Yi, Xiang, & He, 2015; Ghazali et al., 2017; Zhan et al., 2021). Ao analisar indivíduos portadores de LES, incluindo pacientes com acometimento renal ou não, em atividade ou em remissão, e compará-los com indivíduos saudáveis, nosso estudo corrobora que os pacientes lúpicos possuem níveis de VEGF aumentados. Entretanto, os níveis de VEGF não foram capazes de diferenciar os pacientes portadores de NL, nem os pacientes em atividade de doença nesse estudo.

De modo similar, ADHYA et al. (2019), ao realizar avaliação sérica do VEGF entre pacientes com NL em remissão e NL em atividade, também não obteve resultado

significativo para diferenciar esses grupos (Adhya et al., 2019). Outros estudos prévios não observaram diferença significativa do VEGF sérico entre os pacientes em atividade daqueles em remissão, apesar de mostrarem níveis aumentados de VEGF nos portadores de LES (Tokarska, Bogaczewicz, Robak, & Wozniacka, 2020; Zhou et al., 2014).

Em 2006, foi avaliado o comportamento do RNAm VEGF urinário dos pacientes com NL mostrando que poderia predizer a presença de classe IV da NL, bem como demonstrou redução dos seus níveis nos pacientes que responderam à terapia (Avihingsanon et al., 2006). Já em nosso estudo, ao avaliar VEGF sérico, ele não foi capaz de diferenciar o tipo histológico bem como não se correlacionou com resposta terapêutica. O mesmo ocorreu em um estudo feito por Ghazali et al. (2017) onde, apesar de níveis diferentes de VEGF séricos, não houve diferença significativa nem mesmo com uma análise das classes proliferativas (Ghazali et al., 2017).

Outra avaliação feita foi quanto a possibilidade do VEGF comportar-se como um sinalizador de prognóstico, predizendo os possíveis bons respondedores ao tratamento. Entretanto, pacientes respondedores ao tratamento e os que falharam apresentaram dosagens similares do marcador.

Nossa avaliação utilizando VEGF sérico não refletiu correlação com os achados vasculares ou de fibrose intersticial na amostra estudada, como proposto anteriormente por BPBKOVA et al. (2007), que ponderaram a possível correlação entre a dosagem de VEGF urinário e a presença de fibrose intersticial nos pacientes com glomerulonefrite (Bobkova, Kozlovskaia, Rameeva, Varshavskii, & Golitsyna, 2007).

Portanto, nossos achados corroboram a participação do VEGF no desenvolvimento do LES, sem, entretanto, evidências para definir sua atuação como biomarcador para refletir atividade de doença ou diferenciar os pacientes portadores de NL.

Diversos processos inflamatórios podem exercer influência negativa na produção de albumina pelo fígado como resposta de fase aguda e indicando gravidade da doença (Kim, McClave, Martindale, Miller, & Hurt, 2017; Soeters, Wolfe, & Shenkin, 2019). A perda renal de albumina por dano glomerular, entretanto, é o mais importante fator de redução da albumina sérica, especialmente nos pacientes com NL (Aringer, 2020).

Quando comparamos pacientes portadores de LES, com ou sem NL, em atividade ou em remissão da doença, com indivíduos saudáveis, mostramos níveis reduzidos de albumina somente nos pacientes portadores de NL ativa. Tal informação divergiu de outros estudos onde hipoalbuminemia ocorreu em pacientes sem nefrite, diferenciando atividade e remissão da doença (Aringer, 2020; Idborg et al., 2018). O observado no estudo longitudinal, após tratamento da nefrite lúpica com ciclofosfamida, foi um aumento significativo dos níveis de albumina, a correlação inversa entre os níveis séricos de albumina e SLEDAI, e o aumento proporcional da fração C3 do complemento.

Em concordância ao encontrado por Yip et al, a albumina mostrou-se um marcador inespecífico e útil no rastreio de atividade de doença na NL, onde aparece com níveis séricos reduzidos (Yip et al., 2010). Baseado nesse achado inicial, ao compararmos a albumina nos grupos RC-RP e FT, podemos afirmar que a normalização dos níveis de albumina foi um forte preditor de resposta terapêutica nos pacientes tratados como CFM. Tais achados estão em consonância com estudos prévios, onde a normalização dos níveis de albumina até o terceiro mês do tratamento foi um importante preditor de resposta terapêutica (Liu et al., 2019).

A avaliação paralela entre albumina sérica e fração C3 do complemento foi outro ponto importante quando olhamos para o paciente portador de NL. Albumina mostrou um comportamento similar a esse consagrado marcador de atividade de doença nessa população (Ahearn et al., 2017), e ressaltando questões de custos e maior rapidez para o resultado, pode vir a ser estudado como um bom biomarcador de atividade de doença nos pacientes com NL (Idborg et al., 2018). Apesar de já estabelecido o comprometimento dos níveis séricos da albumina nos pacientes portadores de NL, até o momento não há uma efetiva aplicabilidade na avaliação clínica dessa população. Considerando as múltiplas interpretações envolvendo a hipoalbuminemia nos pacientes com NL, incluindo o comportamento como fator de risco para doença renal crônica, nosso estudo reforça a importância de maior atenção e ação efetiva sobre esse marcador para os indivíduos portadores de NL (Park et al., 2017).

As manifestações clinicas da NL são muitas vezes tardias, sendo utilizado para sua identificação sedimentoscopia urinária e quantificação da proteinúria, sendo a presença de proteinúria, hematúria e cilindrúria importantes elementos para suspeição

diagnóstica e evidência de atividade de doença de maneira prática e não invasiva, apesar da ausência da precisão trazido pela biopsia renal (Almaani, Meara, & Rovin, 2017); (Anders & Rovin, 2016; Bomback, 2018; Caster & Powell, 2019; Soliman & Mohan, 2017).

Nosso estudo visou demonstrar uma forma de identificar e ressaltar precocemente aqueles pacientes com quadro proliferativo e com maior probabilidade de necessitar de imunossupressão agressiva. Visto a invasão e o potencial de complicação da biópsia renal, somado a ausência desse recurso em diversos serviços de saúde, a busca por novas formas de identificação das formas proliferativas da NL são fundamentais a fim de garantir uma adequada assistência a esses pacientes (Qi, Chen, Xu, Xie, & Dai, 2018).

Na análise urinária foi observado que hematúria, leucocitúria e ocorrência de insuficiência renal são significativamente mais prevalentes no grupo NLP, comportamento esse não presente na avaliação da proteinúria e cilindros granulosos. Associando exames séricos, o consumo do complemento e albumina não tiveram diferenças entre os grupos, ao contrário do anti-DNAn que foi mais prevalente no grupo NLP.

Soliman e Mohan (2017) exposuseram em estudos prévios a limitação presente em tais marcadores quanto a correlação com tipo de classe histológica bem como quanto a gravidade da doença (Soliman & Mohan, 2017). Os cilindros granulosos, que sabidamente correlacionam-se com o acometimento renal, não apresentaram a capacidade de diferenciar as classes proliferativas, achado similar ao estudo envolvendo cilindros cereos os quais correlacionavam-se com cilindros granulosos e também não foram capazes de diferenciar quadros renais proliferativos e outros quadros de glomerulonefrite em geral (Spinelli, Consonni, Garigali, & Fogazzi, 2013). Também consistentes com outros estudos, o grau de proteinúria não se mostra capaz de correlacionar-se com gravidade histológica na NL (Wen, 2011).

Tanto o EULAR/ERA-EDTA quanto o ACR recomendam o uso de agentes imunossupressores para as classes proliferativas, associadas ou não ao perfil membranoso, como orienta também que classe V com proteinúria subnefrótica possa receber inicialmente medidas não imunossupressoras ou de menor potência (Almaani & Parikh, 2019; Bomback, 2018; Chedid et al., 2020). A importância de determinar de modo não invasivo o padrão histológico proliferativo é a indicação precoce de terapia

imunossupressora mais agressiva, melhorando a evolução renal desses pacientes e prevenindo danos renais como os que acontecem em muitos locais, devido à ausência de análise histológica ou mesmo o atraso para realização da biópsia.

Compatível ao encontrado em nosso estudo, em 2005 foi realizada uma análise que também mostrou que pacientes com quadros renais proliferativos tiveram níveis significativos mais altos de hematúria microscópica, leucocitúria e células epiteliais tubulares, corroborando assim para ser uma possível alternativa não invasiva para suspeição e conduta inicial daqueles pacientes com quadros mais agressivos da NL (Fogazzi et al., 2005).

Os dados desse trabalho mostram que os achados em um paciente portador de NL podem ser dúbios e a biópsia renal continua sendo fundamental para classificação desses pacientes. Entretanto, a análise urinária somada aos achados séricos e dados clínicos podem ser de grande respaldo para a precoce intervenção terapêutica para esses pacientes.

O percentual de pacientes lúpicos com apresentação clínica configurando quadros mais graves, justifica-se uma vez que foram provenientes de um hospital terciário. Além disso, necessita-se justificar a presença da classe II entre os pacientes pulsados com MP e CFM, fato esse ocorrido devido a apresentação clínica desses pacientes que eram compatíveis com classe III e IV. Limitações encontradas nesse trabalho, além dos já descritos consistem nas características do grupo controle, tamanho da amostra além de tratar-se de um desejo retrospectivo.

7 CONCLUSÃO

Pacientes portadores de Lupus possivelmente apresentam níveis séricos reduzidos de survivina independente da apresentação clínica da doença. Apesar de sofrer redução dos seus níveis após o uso da CYC, tal proteína apresenta limitações como biomarcador de resposta terapêutica na NL, não é capaz de diferenciar entre as classes histológicas, além de não refletir prognóstico como em outros contextos clínicos. O VEGF encontra-se elevado nos pacientes lúpicos, entretanto não foi capaz de distinguir aqueles pacientes portadores de NL nem aqueles em atividade de doença. A albumina sérica, por sua vez mostrou-se como um possível sinalizador de boa resposta terapêutica da NL, assim como frações do complemento.

Visando ofertar o melhor tratamento para os pacientes portadores de NL e em nada retardá-lo aguardando a biópsia renal, a análise do sedimento urinário e proteinúria, associado a função renal e dosagem de albumina, constituem um importante arsenal para diferenciação entre perfil histológico proliferativo do não-proliferativo.

8 REFERÊNCIAS

Adhya, Z., El Anbari, M., Anwar, S., Mortimer, A., Marr, N., & Karim, M. Y. (2019). Soluble TNF-R1, VEGF and other cytokines as markers of disease activity in systemic lupus erythematosus and lupus nephritis. *Lupus, 28*(6), 713-721. doi:10.1177/0961203319845487

Ahearn, J. M., Liu, C. C., & Manzi, S. (2017). Cell-bound complement activation products as lupus biomarkers: diagnosis, monitoring and stratification. *Expert Rev Clin Immunol, 13*(12), 1133-1142. doi:10.1080/1744666X.2017.1392238

Almaani, S., Meara, A., & Rovin, B. H. (2017). Update on Lupus Nephritis. *Clin J Am Soc Nephrol, 12*(5), 825-835. doi:10.2215/CJN.05780616

Almaani, S., & Parikh, S. V. (2019). Membranous Lupus Nephritis: A Clinical Review. *Adv Chronic Kidney Dis, 26*(5), 393-403. doi:10.1053/j.ackd.2019.08.009

Altieri, D. C. (2015). Survivin - The inconvenient IAP. *Semin Cell Dev Biol, 39*, 91-96. doi:10.1016/j.semcdb.2014.12.007

Altznauer, F., Martinelli, S., Yousefi, S., Thurig, C., Schmid, I., Conway, E. M., . . . Simon, H. U. (2004). Inflammation-associated cell cycle-independent block of apoptosis by survivin in terminally differentiated neutrophils. *J Exp Med, 199*(10), 1343-1354. doi:10.1084/jem.20032033

Anders, H. J., & Rovin, B. (2016). A pathophysiology-based approach to the diagnosis and treatment of lupus nephritis. *Kidney Int, 90*(3), 493-501. doi:10.1016/j.kint.2016.05.017

Aoki, Y., Feldman, G. M., & Tosato, G. (2003). Inhibition of STAT3 signaling induces apoptosis and decreases survivin expression in primary effusion lymphoma. *Blood, 101*(4), 1535-1542. doi:10.1182/blood-2002-07-2130

Aringer, M. (2020). Inflammatory markers in systemic lupus erythematosus. *J Autoimmun, 110*, 102374. doi:10.1016/j.jaut.2019.102374

Arkema, E. V., & Simard, J. F. (2015). Cohort profile: systemic lupus erythematosus in Sweden: the Swedish Lupus Linkage (SLINK) cohort. *BMJ Open, 5*(8), e008259. doi:10.1136/bmjopen-2015-008259

Avihingsanon, Y., Benjachat, T., Tassanarong, A., Sodsai, P., Kittikovit, V., & Hirankarn, N. (2009). Decreased renal expression of vascular endothelial growth factor in lupus nephritis is associated with worse prognosis. *Kidney Int, 75*(12), 1340-1348. doi:10.1038/ki.2009.75

Avihingsanon, Y., Phumesin, P., Benjachat, T., Akkasilpa, S., Kittikowit, V., Praditpornsilpa, K., . . . Hirankarn, N. (2006). Measurement of urinary chemokine and growth factor messenger RNAs: a noninvasive monitoring in lupus nephritis. *Kidney Int, 69*(4), 747-753. doi:10.1038/sj.ki.5000132

Ayoub, I., Cassol, C., Almaani, S., Rovin, B., & Parikh, S. V. (2019). The Kidney Biopsy in Systemic Lupus Erythematosus: A View of the Past and a Vision of the Future. *Adv Chronic Kidney Dis, 26*(5), 360-368. doi:10.1053/j.ackd.2019.08.015

Azizoddin, D. R., Jolly, M., Arora, S., Yelin, E., & Katz, P. (2019). Patient-Reported Outcomes Predict Mortality in Lupus. *Arthritis Care Res (Hoboken), 71*(8), 1028-1035. doi:10.1002/acr.23734

Bajema, I. M., Wilhelmus, S., Alpers, C. E., Bruijn, J. A., Colvin, R. B., Cook, H. T., . . . Fogo, A. B. (2018). Revision of the International Society of Nephrology/Renal Pathology Society classification for lupus nephritis: clarification of definitions, and modified National Institutes of Health activity and chronicity indices. *Kidney Int, 93*(4), 789-796. doi:10.1016/j.kint.2017.11.023

Bertsias, G. K., Tektonidou, M., Amoura, Z., Aringer, M., Bajema, I., Berden, J. H., . . . Transplant, A. (2012). Joint European League Against Rheumatism and European Renal Association-European Dialysis and Transplant Association (EULAR/ERA-EDTA) recommendations for the management of adult and paediatric lupus nephritis. *Ann Rheum Dis, 71*(11), 1771-1782. doi:10.1136/annrheumdis-2012-201940

Bizzaro, N., Villalta, D., Giavarina, D., & Tozzoli, R. (2012). Are anti-nucleosome antibodies a better diagnostic marker than anti-dsDNA antibodies for systemic lupus erythematosus? A systematic review and a study of metanalysis. *Autoimmunity reviews, 12*. doi:10.1016/j.autrev.2012.07.002

Bobkova, I. N., Kozlovskaia, L. V., Rameeva, A. S., Varshavskii, V. A., & Golitsyna, E. P. (2007). [Clinical implication of urine test for markers of endothelial dysfunction and angiogenesis factors in assessment of tubulointerstitial fibrosis in chronic glomerulonephritis]. *Ter Arkh, 79*(6), 10-15. Retrieved from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17684960

Bokarewa, M., Brink, M., Erlandsson, M., & Dahlqvist, S. R. (2014). Survivin but not Fms-like tyrosine kinase 3 ligand is up-regulated before the onset of rheumatoid arthritis: a pilot study. *Arthritis research & therapy, 16*(1), 1-7.

Bomback, A. S. (2018). Nonproliferative Forms of Lupus Nephritis: An Overview. *Rheum Dis Clin North Am, 44*(4), 561-569. doi:10.1016/j.rdc.2018.06.003

Bomback, A. S., & Appel, G. B. (2010). Updates on the treatment of lupus nephritis. *J Am Soc Nephrol, 21*(12), 2028-2035. doi:10.1681/ASN.2010050472

Bouts, Y. M., Wolthuis, D. F., Dirkx, M. F., Pieterse, E., Simons, E. M., van Boekel, A. M., . . . van der Vlag, J. (2012). Apoptosis and NET formation in the pathogenesis of SLE. *Autoimmunity, 45*(8), 597-601. doi:10.3109/08916934.2012.719953

Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D. S., . . . Zychlinsky, A. (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science, 303*(5663), 1532-1535. doi:10.1126/science.1092385

Carvalho, J. F., Blank, M., & Shoenfeld, Y. (2007). Vascular endothelial growth factor (VEGF) in autoimmune diseases. *J Clin Immunol, 27*(3), 246-256. doi:10.1007/s10875-007-9083-1

Caster, D. J., & Powell, D. W. (2019). Utilization of Biomarkers in Lupus Nephritis. *Adv Chronic Kidney Dis, 26*(5), 351-359. doi:10.1053/j.ackd.2019.09.001

Ceccarelli, F., Perricone, C., Massaro, L., Cipriano, E., Alessandri, C., Spinelli, F. R., . . . Conti, F. (2015). Assessment of disease activity in Systemic Lupus Erythematosus: Lights and shadows. *Autoimmun Rev, 14*(7), 601-608. doi:10.1016/j.autrev.2015.02.008

Chedid, A., Rossi, G. M., Peyronel, F., Menez, S., Atta, M. G., Bagnasco, S. M., . . . Fine, D. M. (2020). Low-Level Proteinuria in Systemic Lupus Erythematosus. *Kidney Int Rep, 5*(12), 2333-2340. doi:10.1016/j.ekir.2020.09.007

Colonna, L., Lood, C., & Elkon, K. B. (2014). Beyond apoptosis in lupus. *Curr Opin Rheumatol, 26*(5), 459-466. doi:10.1097/BOR.0000000000000083

Delfani, P., Sturfelt, G., Gullstrand, B., Carlsson, A., Kassandra, M., Borrebaeck, C. A., . . . Wingren, C. (2017). Deciphering systemic lupus erythematosus-associated serum biomarkers reflecting apoptosis and disease activity. *Lupus, 26*(4), 373-387. doi:10.1177/0961203316669240

Deng, W., Feng, X., Li, X., Wang, D., & Sun, L. (2016). Hypoxia-inducible factor 1 in autoimmune diseases. *Cell Immunol, 303*, 7-15. doi:10.1016/j.cellimm.2016.04.001

Devarapu, S. K., Lorenz, G., Kulkarni, O. P., Anders, H. J., & Mulay, S. R. (2017). Cellular and Molecular Mechanisms of Autoimmunity and Lupus Nephritis. *Int Rev Cell Mol Biol, 332*, 43-154. doi:10.1016/bs.ircmb.2016.12.001

Ding, Y., Liao, W., Yi, Z., Xiang, W., & He, X. (2015). Association of miRNA-145 expression in vascular smooth muscle cells with vascular damages in patients with lupus nephritis. *Int J Clin Exp Pathol, 8*(10), 12646-12656. Retrieved from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26722454

Donderski, R., Szczepanek, J., Domagalski, K., Tretyn, A., Korenkiewicz, J., Marszalek, A., . . . Manitius, J. (2013). Analysis of relative expression level of VEGF (vascular endothelial growth factor), HIF-1alpha (hypoxia inducible factor 1alpha) and CTGF (connective tissue growth factor) genes in chronic glomerulonephritis (CGN) patients. *Kidney Blood Press Res, 38*(1), 83-91. doi:10.1159/000355754

Ebrahimian, S., Rashtchizadeh, N., Ghorbanihaghjo, A., Malek Mahdavi, A., Hajialilo, M., & Khabbazi, A. (2020). Association between serum levels of survivin and systemic lupus erythematosus. *Int J Clin Pract*, e13706. doi:10.1111/ijcp.13706

Ebrahimiyan, H., Aslani, S., Rezaei, N., Jamshidi, A., & Mahmoudi, M. (2018). Survivin and autoimmunity; the ins and outs. *Immunol Lett, 193*, 14-24. doi:10.1016/j.imlet.2017.11.004

Edwards, L. J., Mizui, M., & Kyttaris, V. (2015). Signal transducer and activator of transcription (STAT) 3 inhibition delays the onset of lupus nephritis in MRL/lpr mice. *Clin Immunol, 158*(2), 221-230. doi:10.1016/j.clim.2015.04.004

Emadi, A., Jones, R. J., & Brodsky, R. A. (2009). Cyclophosphamide and cancer: golden anniversary. *Nat Rev Clin Oncol, 6*(11), 638-647. doi:10.1038/nrclinonc.2009.146

Faurschou, M., Dreyer, L., Kamper, A. L., Starklint, H., & Jacobsen, S. (2010). Long-term mortality and renal outcome in a cohort of 100 patients with lupus nephritis. *Arthritis Care Res (Hoboken), 62*(6), 873-880. doi:10.1002/acr.20116

Feliers, D. (2009). Vascular endothelial growth factor as a prognostic marker of lupus nephritis. *Kidney Int, 75*(12), 1251-1253. doi:10.1038/ki.2009.101

Flores-Mendoza, G., Sanson, S. P., Rodriguez-Castro, S., Crispin, J. C., & Rosetti, F. (2018). Mechanisms of Tissue Injury in Lupus Nephritis. *Trends Mol Med, 24*(4), 364-378. doi:10.1016/j.molmed.2018.02.003

Fogazzi, G. B., Saglimbeni, L., Banfi, G., Cantu, M., Moroni, G., Garigali, G., & Cesana, B. M. (2005). Urinary sediment features in proliferative and non-proliferative glomerular diseases. *J Nephrol, 18*(6), 703-710. Retrieved from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16358228

Fortuna, G., & Brennan, M. T. (2013). Systemic lupus erythematosus: epidemiology, pathophysiology, manifestations, and management. *Dent Clin North Am, 57*(4), 631-655. doi:10.1016/j.cden.2013.06.003

Fu, J., Wang, Z., Lee, K., Wei, C., Liu, Z., Zhang, M., . . . Liu, Z. (2018). Transcriptomic analysis uncovers novel synergistic mechanisms in combination therapy for lupus nephritis. *Kidney Int, 93*(2), 416-429. doi:10.1016/j.kint.2017.08.031

Galeotti, L., Adrian, K., Berg, S., Tarkowski, A., Bokarewa, M., & Silvia, Q. (2008). Pediatric rheumatology. Circulating survivin indicates severe course of juvenile idiopathic arthritis. *Clin Exp Rheumatol, 26*(2), 373-378.

Garg, H., Suri, P., Gupta, J. C., Talwar, G. P., & Dubey, S. (2016). Survivin: a unique target for tumor therapy. *Cancer Cell Int, 16*, 49. doi:10.1186/s12935-016-0326-1

Ghazali, W. S. W., Iberahim, R., & Ashari, N. S. M. (2017). Serum Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) as a Biomarker for Disease Activity in Lupus Nephritis. *Malays J Med Sci, 24*(5), 62-72. doi:10.21315/mjms2017.24.5.7

Gravina, G., Wasen, C., Garcia-Bonete, M. J., Turkkila, M., Erlandsson, M. C., Toyra Silfversward, S., . . . Bokarewa, M. I. (2017). Survivin in autoimmune diseases. *Autoimmun Rev, 16*(8), 845-855. doi:10.1016/j.autrev.2017.05.016

Groner, B., & Weiss, A. (2014). Targeting survivin in cancer: novel drug development approaches. *BioDrugs, 28*(1), 27-39. doi:10.1007/s40259-013-0058-x

Hamam, H. J., & Palaniyar, N. (2019). Post-Translational Modifications in NETosis and NETs-Mediated Diseases. *Biomolecules, 9*(8). doi:10.3390/biom9080369

Henze, A. T., & Acker, T. (2010). Feedback regulators of hypoxia-inducible factors and their role in cancer biology. *Cell Cycle, 9*(14), 2749-2763. doi:10.4161/cc.9.14.12591

Hiramatsu, N., Kuroiwa, T., Ikeuchi, H., Maeshima, A., Kaneko, Y., Hiromura, K., . . . Nojima, Y. (2008). Revised classification of lupus nephritis is valuable in predicting renal outcome with an indication of the proportion of glomeruli affected by chronic lesions. *Rheumatology (Oxford), 47*(5), 702-707. doi:10.1093/rheumatology/ken019

Idborg, H., Eketjall, S., Pettersson, S., Gustafsson, J. T., Zickert, A., Kvarnstrom, M., . . . Svenungsson, E. (2018). TNF-alpha and plasma albumin as biomarkers of disease activity in systemic lupus erythematosus. *Lupus Sci Med, 5*(1), e000260. doi:10.1136/lupus-2018-000260

Ingvarsson, R. F., Landgren, A. J., Bengtsson, A. A., & Jonsen, A. (2019). Good survival rates in systemic lupus erythematosus in southern Sweden, while the mortality rate remains increased compared with the population. *Lupus, 28*(12), 1488-1494. doi:10.1177/0961203319877947

Iqubal, A., Iqubal, M. K., Sharma, S., Ansari, M. A., Najmi, A. K., Ali, S. M., . . . Haque, S. E. (2019). Molecular mechanism involved in cyclophosphamide-induced cardiotoxicity: Old drug with a new vision. *Life Sci, 218*, 112-131. doi:10.1016/j.lfs.2018.12.018

Jesus, A., Campos, L., Liphaus, B., Carneiro-Sampaio, M., Mangueira, C., Rosseto, E., . . . Scheinberg, M. (2012). Anti-C1q, anti-chromatin/nucleosome, and anti-dsDNA antibodies in juvenile systemic lupus erythematosus patients. *Revista Brasileira de Reumatologia, 52*, 976-981. doi:10.1590/S0482-50042012000600015

Kavanaugh, A. F., Solomon, D. H., & American College of Rheumatology Ad Hoc Committee on Immunologic Testing, G. (2002). Guidelines for immunologic laboratory testing in the rheumatic diseases: anti-DNA antibody tests. *Arthritis Rheum, 47*(5), 546-555. doi:10.1002/art.10558

Kazzaz, N. M., Sule, G., & Knight, J. S. (2016). Intercellular Interactions as Regulators of NETosis. *Front Immunol, 7*, 453. doi:10.3389/fimmu.2016.00453

Kim, S., McClave, S. A., Martindale, R. G., Miller, K. R., & Hurt, R. T. (2017). Hypoalbuminemia and Clinical Outcomes: What is the Mechanism behind the Relationship? *Am Surg, 83*(11), 1220-1227. doi:10.1177/000313481708301123

Klumb, E. M., Silva, C. A. A., Lanna, C. C. D., Sato, E. I., Borba, E. F., Brenol, J. C. T., . . . Latorre, L. C. (2015). Consenso da Sociedade Brasileira de Reumatologia para o diagnóstico, manejo e tratamento da nefrite lúpica. *Revista Brasileira de Reumatologia, 55*(1), 1-21. Retrieved from https://ac.els-cdn.com/S0482500414002307/1-s2.0-S0482500414002307-main.pdf?_tid=f48d016a-e2b0-4c82-b0a3-08ab12b72470&acdnat=1551734153_1242272d1262dc32b10fa0bac3c6e292

Koike, Y., Muroi, E., Yoshizaki, A., Ogawa, F., Yanaba, K., Takenaka, M., . . . Sato, S. (2010). Autoantibody against survivin in patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol, 37*(9), 1864-1870. doi:10.3899/jrheum.091087

Li, F. (2003). Survivin study: what is the next wave? *Journal of cellular physiology, 197*(1), 8-29.

Lipinska, J., Kaszkowiak, M., Malachowska, B., Swidrowska-Jaros, J., & Smolewska, E. (2021). Concentration of survivin in children with oligo-and polyarticular juvenile idiopathic arthritis (JIA): diagnostic and prognostic value—a single-center study. *Arthritis research & therapy, 23*(1), 1-10.

Liu, G., Wang, H., Le, J., Lan, L., Xu, Y., Yang, Y., . . . Han, F. (2019). Early-stage predictors for treatment responses in patients with active lupus nephritis. *Lupus, 28*(3), 283-289. doi:10.1177/0961203319826703

Ma, C., Wei, J., Zhan, F., Wang, R., Fu, K., Wan, X., & Li, Z. (2012). Urinary hypoxia-inducible factor-1alpha levels are associated with histologic chronicity changes and renal function in patients with lupus nephritis. *Yonsei Med J, 53*(3), 587-592. doi:10.3349/ymj.2012.53.3.587

Mahajan, A., Herrmann, M., & Muñoz, L. E. (2016). Clearance deficiency and cell death pathways: a model for the pathogenesis of SLE. *Frontiers in immunology, 7*, 35.

Markowitz, G. S., & D'Agati, V. D. (2009). Classification of lupus nephritis. *Curr Opin Nephrol Hypertens, 18*(3), 220-225. doi:10.1097/mnh.0b013e328327b379

Martinez-Martinez, M. U., Llamazares-Azuara, L. M., Martinez-Galla, D., Mandeville, P. B., Valadez-Castillo, F., Roman-Acosta, S., . . . Abud-Mendoza, C. (2017). Urinary sediment suggests lupus nephritis histology. *Lupus, 26*(6), 580-587. doi:10.1177/0961203316669241

Mavragani, C. P., Fragoulis, G. E., Somarakis, G., Drosos, A., Tzioufas, A. G., & Moutsopoulos, H. M. (2015). Clinical and laboratory predictors of distinct histopathogical features of lupus nephritis. *Medicine (Baltimore), 94*(21), e829. doi:10.1097/MD.0000000000000829

Mita, A. C., Mita, M. M., Nawrocki, S. T., & Giles, F. J. (2008). Survivin: key regulator of mitosis and apoptosis and novel target for cancer therapeutics. *Clin Cancer Res, 14*(16), 5000-5005. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-0746

Mokuda, S., Miyazaki, T., Ubara, Y., Kanno, M., Sugiyama, E., Takasugi, K., & Masumoto, J. (2015). CD1a+ survivin+ dendritic cell infiltration in dermal lesions of systemic sclerosis. *Arthritis research & therapy, 17*(1), 1-10.

Moroni, G., Quaglini, S., Radice, A., Trezzi, B., Raffiotta, F., Messa, P., & Sinico, R. A. (2015). The value of a panel of autoantibodies for predicting the activity of lupus nephritis at time of renal biopsy. *J Immunol Res, 2015*, 106904. doi:10.1155/2015/106904

Nived, O., Hallengren, C. S., Alm, P., Jonsen, A., Sturfelt, G., & Bengtsson, A. A. (2013). An observational study of outcome in SLE patients with biopsy-verified glomerulonephritis between 1986 and 2004 in a defined area of southern Sweden: the clinical utility of the ACR renal response criteria and predictors for renal outcome. *Scand J Rheumatol, 42*(5), 383-389. doi:10.3109/03009742.2013.799224

Pahlavan, Y., Kahroba, H., Samadi, N., Karimi, A., Ansarin, K., & Khabbazi, A. (2019). Survivin modulatory role in autoimmune and autoinflammatory diseases. *J Cell Physiol, 234*(11), 19440-19450. doi:10.1002/jcp.28725

Park, D. J., Kang, J. H., Lee, J. W., Lee, K. E., Kim, T. J., Park, Y. W., . . . Lee, S. S. (2017). Risk factors to predict the development of chronic kidney disease in patients with lupus nephritis. *Lupus, 26*(11), 1139-1148. doi:10.1177/0961203317694257

Pradhan, V. D., Patwardhan, M. M., & Ghosh, K. (2010). Anti-nucleosome antibodies as a disease marker in systemic lupus erythematosus and its correlation with disease activity and other autoantibodies. *Indian J Dermatol Venereol Leprol, 76*(2), 145-149. doi:10.4103/0378-6323.60558

Qi, S., Chen, Q., Xu, D., Xie, N., & Dai, Y. (2018). Clinical application of protein biomarkers in lupus erythematosus and lupus nephritis. *Lupus, 27*(10), 1582-1590. doi:10.1177/0961203318773643

Rabbani, M. A., Habib, H. B., Islam, M., Ahmad, B., Majid, S., Saeed, W., . . . Ahmad, A. (2009). Survival analysis and prognostic indicators of systemic lupus erythematosus in Pakistani patients. *Lupus, 18*(9), 848-855. doi:10.1177/0961203309103410

Sah, N. K., Khan, Z., Khan, G. J., & Bisen, P. S. (2006). Structural, functional and therapeutic biology of survivin. *Cancer Lett, 244*(2), 164-171. doi:10.1016/j.canlet.2006.03.007

Sharief, M., Noori, M., Douglas, M., & Semra, Y. (2002). Upregulated survivin expression in activated T lymphocytes correlates with disease activity in multiple sclerosis. *European journal of neurology, 9*(5), 503-510.

Shomali, N., Baradaran, B., Sarkesh, A., Mohammadi, H., Hemmatzadeh, M., Marofi, F., & Jarahian, M. (2022). Dysregulation of Survivin-Targeting microRNAs in Autoimmune Diseases: New Perspectives for Novel Therapies. *Frontiers in immunology, 13*.

Soeters, P. B., Wolfe, R. R., & Shenkin, A. (2019). Hypoalbuminemia: Pathogenesis and Clinical Significance. *JPEN J Parenter Enteral Nutr, 43*(2), 181-193. doi:10.1002/jpen.1451

Soliman, S., & Mohan, C. (2017). Lupus nephritis biomarkers. *Clin Immunol, 185*, 10-20. doi:10.1016/j.clim.2016.08.001

Souza, D. C., Santo, A. H., & Sato, E. I. (2012). Mortality profile related to systemic lupus erythematosus: a multiple cause-of-death analysis. *J Rheumatol, 39*(3), 496-503. doi:10.3899/jrheum.110241

Spinelli, D., Consonni, D., Garigali, G., & Fogazzi, G. B. (2013). Waxy casts in the urinary sediment of patients with different types of glomerular diseases: results of a prospective study. *Clin Chim Acta, 424*, 47-52. doi:10.1016/j.cca.2013.05.009

Sterner, R. M., Hartono, S. P., & Grande, J. P. (2014). The Pathogenesis of Lupus Nephritis. *J Clin Cell Immunol, 5*(2). doi:10.4172/2155-9899.1000205

Tao, D., Shangwu, L., Qun, W., Yan, L., Wei, J., Junyan, L., . . . Jinquan, T. (2005). CD226 Expression Deficiency Causes High Sensitivity to Apoptosis in NK T Cells from Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950), 174*, 1281-1290. doi:10.4049/jimmunol.174.3.1281

Telles, R. W., Lanna, C. C., Souza, F. L., Rodrigues, L. A., Reis, R. C., & Ribeiro, A. L. (2013). Causes and predictors of death in Brazilian lupus patients. *Rheumatol Int, 33*(2), 467-473. doi:10.1007/s00296-012-2372-x

Tokarska, K., Bogaczewicz, J., Robak, E., & Wozniacka, A. (2020). The role of endocan and selected pro-inflammatory cytokines in systemic lupus erythematosus. *Postepy Dermatol Alergol, 37*(6), 898-903. doi:10.5114/ada.2019.90060

Tsokos, G. C., Lo, M. S., Costa Reis, P., & Sullivan, K. E. (2016). New insights into the immunopathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Nat Rev Rheumatol, 12*(12), 716-730. doi:10.1038/nrrheum.2016.186

Walport, M. J. (2001). Complement. First of two parts. *N Engl J Med, 344*(14), 1058-1066. doi:10.1056/NEJM200104053441406

Wang, F., Zhang, X., Xia, P., Zhang, L., & Zhang, Z. (2016). Enhancement of mRNA expression of survivin and human beta-defensin-3 in lesions of psoriasis vulgaris. *European Journal of Dermatology, 26*(1), 28-33.

Weening, J. J., D'Agati, V. D., Schwartz, M. M., Seshan, S. V., Alpers, C. E., Appel, G. B., . . . Renal Pathology Society Working Group on the Classification of Lupus, N. (2004). The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited. *Kidney Int, 65*(2), 521-530. doi:10.1111/j.1523-1755.2004.00443.x

Wen, Y. K. (2011). Renal biopsy findings in new-onset systemic lupus erythematosus with clinical renal disease. *Int Urol Nephrol, 43*(3), 801-806. doi:10.1007/s11255-011-9911-3

Yang, J., Xu, Z., Sui, M., Han, J., Sun, L., Jia, X., . . . Ren, H. (2015). Co-Positivity for Anti-dsDNA, -Nucleosome and -Histone Antibodies in Lupus Nephritis Is Indicative of High Serum Levels and Severe Nephropathy. *PLoS One, 10*(10), e0140441. doi:10.1371/journal.pone.0140441

Yap, D. Y., Yung, S., & Chan, T. M. (2018). Lupus nephritis: An update on treatments and pathogenesis. *Nephrology (Carlton), 23 Suppl 4*, 80-83. doi:10.1111/nep.13469

Yip, J., Aghdassi, E., Su, J., Lou, W., Reich, H., Bargman, J., . . . Fortin, P. R. (2010). Serum albumin as a marker for disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol, 37*(8), 1667-1672. doi:10.3899/jrheum.091028

Zafari, P., Rafiei, A., Esmaeili, S. A., Moonesi, M., & Taghadosi, M. (2019). Survivin a pivotal antiapoptotic protein in rheumatoid arthritis. *J Cell Physiol, 234*(12), 21575-21587. doi:10.1002/jcp.28784

Zhan, H., Li, H., Liu, C., Cheng, L., Yan, S., & Li, Y. (2021). Association of Circulating Vascular Endothelial Growth Factor Levels With Autoimmune Diseases: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Immunol, 12*, 674343. doi:10.3389/fimmu.2021.674343

Zhang, X., Nagaraja, H. N., Nadasdy, T., Song, H., McKinley, A., Prosek, J., . . . Rovin, B. H. (2012). A composite urine biomarker reflects interstitial inflammation in lupus nephritis kidney biopsies. *Kidney Int, 81*(4), 401-406. doi:10.1038/ki.2011.354

Zhou, L., Lu, G., Shen, L., Wang, L., & Wang, M. (2014). Serum levels of three angiogenic factors in systemic lupus erythematosus and their clinical significance. *Biomed Res Int, 2014*, 627126. doi:10.1155/2014/627126

Zimna, A., & Kurpisz, M. (2015). Hypoxia-Inducible Factor-1 in Physiological and Pathophysiological Angiogenesis: Applications and Therapies. *Biomed Res Int, 2015*, 549412. doi:10.1155/2015/549412

APÊNDICE 1

1 - Nome: _____

2 - Idade: ____ anos 3 - Sexo: ( ) Masc ( ) Fem 4 - Idade início de doença: _____

5 - Idade da análise: _____ 6 - Etnia: () branca () não branca

7 - Critérios diagnósticos:

Rash Malar	Fotossensibilidade	Artrite	Serosite	Nefrite	Neuro/Psiquiátrico
Ulceras orais	Hematológico	Anti-dsDNA	Anti-SM	ACA/PIL/B2	FAN

7 - Comorbidades:_____
8 - Medicações:_____
9 - Algum tratamento prévio para LES:_____
10 - SLEDAI pré-tratamento:_____
11 - Padrão Histológico:_____
12 - Avaliação laboratorial pré tratamento:

Pré-tratamento	Pós-tratamento (6m)
Creatinina:	Creatinina:
Albumina:	Albumina:
Urina:	Urina:
Proteinúria 24h:	Proteinúria 24h:
C3/C4:	C3/C4:
Anti-dsDNA:	Anti-dsDNA:
VEGF:	VEGF:
Anti-HIF:	Anti-HIF:
Survivina:	Survivina:

13 - SLEDAI pós-tratamento (6m):_____
14 - Medicação manutenção:_____

APÊNDICE 2: SLEDAI

SLEDAI-2K score	Descriptor	Definition
8	**Seizure**	Recent onset, exclude metabolic, infectious or drug causes.
8	**Psychosis**	Altered ability to function in normal activity due to severe disturbance in the perception of reality.
8	**Organic brain syndrome**	Altered mental function with impaired orientation, memory or other intellectual function.
8	**Visual disturbance**	Retinal changes.
8	**Cranial nerve disorder**	New onset of sensory or motor neuropathy involving cranial nerves.
8	**Lupus headache**	Severe, persistent headache which may be migrainous, but must be nonresponsive to narcotic analgesia.
8	**Cerebrovascular accident**	New onset of cerebrovascular accident(s). Exclude arteriosclerosis.
8	**Vasculitis**	Ulceration, gangrene, tender finger nodules, periungual infarction, splinter haemorrhages, or biopsy or angiogram proof of vasculitis.
4	**Arthritis**	≥2 joints with pain and signs of inflammation (i.e. tenderness, swelling or effusion).
4	**Myositis**	Proximal muscle aching/weakness, associated with elevated creatine phosphokinase/aldolase or electromyogram changes or biopsy showing myositis.
4	**Urinary casts**	Heme granular or red blood cell casts.
4	**Haematuria**	>5 red blood cells/high power field. Exclude stone, infection or other cause.
4	**Proteinuria**	>0.5 gram/24 hours.
4	**Pyuria**	>5 white blood cells/high power field. Exclude infection.
2	**Rash**	Inflammatory type rash.
2	**Alopecia**	Abnormal, patchy or diffuse loss of hair.
2	**Mucosal ulcers**	Oral or nasal ulcerations.
2	**Pleurisy**	Pleuritic chest pain with pleural rub or effusion, or pleural thickening.
2	**Pericarditis**	Pericardial pain with at least 1 of the following: rub, effusion, or electrocardiogram or echocardiogram confirmation.
2	**Low complement**	Decrease in CH50, C3 or C4.
2	**Increased DNA binding**	Increased DNA binding by Farr assay.
1	**Fever**	>38°C. Exclude infectious cause.
1	**Thrombocytopenia**	<100 000 platelets / $x10^9$/L, exclude drug causes.
1	**Leukopenia**	<3000 white blood cells / $x10^9$/L, exclude drug causes.

C3 = Complement protein 3, C4 = Complement protein 4, CH50 = 50% haemolytic complement activity, DNA = deoxyribonuclease, SLEDAI-2K = SLE disease activity index 2000

Summarized from *Gladman DD, Ibanez D, Urowitz MB. Systemic lupus erythematosus disease activity index 2000. J Rheumatol. 2002;29:288-91* (99).

APÊNDICE 3: BULAS

a) Bula Survivina:

- **TESTE PARA QUANTIFICAÇÃO DE SURVIVINA**

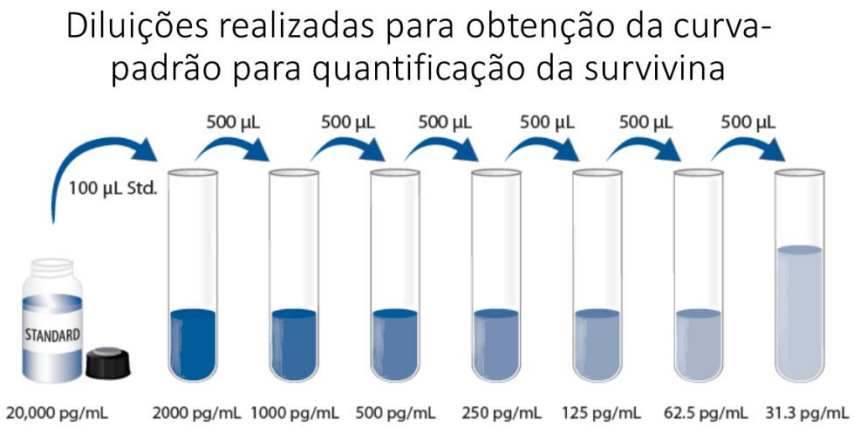
O *Quantikine® Human Survivin Immunoassay* é um teste de ELISA de fase sólida desenvolvido para medir a survivina humana presente em sobrenadantes de cultura de células, soro, plasma e urina. Contém survivina humana recombinante expressa por E. coli. Os resultados obtidos mostraram curvas lineares que eram paralelas às curvas padrão obtidas usando os padrões do kit Quantikine®. Esses os resultados indicam que este kit pode ser usado para determinar os valores de massa relativa para survivina de humanos.

- **PRINCÍPIO DO ENSAIO**

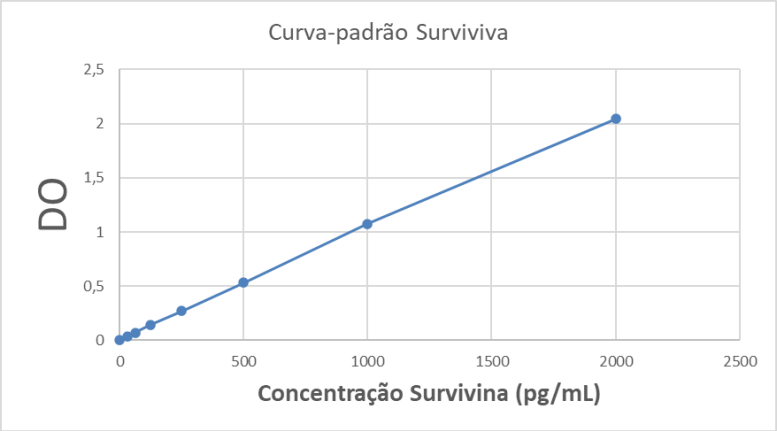
Este ensaio emprega a técnica de imunoensaio enzimático sanduíche quantitativo. Um anticorpo monoclonal específico para survivina humana foi pré-revestido em uma microplaca. Padrões e as amostras são pipetadas para os poços e qualquer survivina presente será ligada ao anticorpo imobilizado. Depois de lavar quaisquer substâncias não ligadas, um anticorpo policlonal ligado a enzima específico para survivina humana é adicionado aos poços. Após uma lavagem para remover qualquer reagente de anticorpo-enzima, uma solução de substrato é adicionada aos poços e a cor se desenvolve diretamente proporcional à quantidade de survivina ligada na etapa inicial. A cor desenvolvida nos poços mudará de azul para amarelo. Após 30 minutos, adicionou-se a solução de parada (*stop solution).* A alteração da cor (azul para amarelo) foi medida por espectrofotometria a um comprimento de onda de 450nm ± 2nm. A concentração de survivina nas amostras foi então determinada comparando a densidade óptica (D.O.) obtidas nas amostras com a curva padrão.

- **CÁLCULO DAS AMOSTRAS**

A curva padrão foi realizada utilizando uma solução de concentração conhecida (20.000 pg/mL = ***standard***) e realizada diluições como ilustrado na figura abaixo:



Estas oito concentrações estarão dispostas nos oito primeiros poços da placa para a leitura do ELISA. E será construída uma curva-padrão, que será utilizada para a determinação das concentrações das amostras dos pacientes, por simples interpolação direta no gráfico. Abaixo está representada a curva-padrão disponível na bula do kit *Quantikine® Human Survivin Immunoassay*. Curva-padrão da survivina:



Concentrações de survivina e suas respectivas leituras de densidade óptica obtidas a partir da solução padrão (standard) do kit *Quantikine® Human Survivin Immunoassay.*

Curva-Padrão Survivina	
Concentraçao (pg/mL)	**DO**
0	**0**
31,3	**0,038**
62,5	**0,071**
125	**0,143**
250	**0,27**
500	**0,533**

As leituras que não originaram conversão automática pela leitora de ELISA, foi realizado o cálculo manual das concentrações, utilizando-se a construção do gráfico em papel milimetrado, tendo no eixo Y a densidade óptica (DO) e no eixo X a concentração de survivina, como exemplificado acima.

Além disso, todos os valores de DO das concentrações da curva padrão foram subtraídos dos valores de DO obtidos na leitura do Branco (*Blank*), para correção da leitura de fundo. O *Blank é* realizado com a adição de todos os reagentes, exceto survivina.

b) Bula Fator de transcrição induzido por hipóxia 1 alfa (HIF-1α):

- **TESTE PARA QUANTIFICAÇÃO DE HIF-1α:**

O RayBio Human HIF-alpha ELISA kit é um teste de ELISA de fase sólida desenvolvido para quantificar HIF-1a humana presente em sobrenadantes de cultura de células, soro, plasma. Esse ensaio aplica anticorpo específico para HIF-1a humano nos 96 poços da placa. Os resultados obtidos mostraram curvas que deveriam ser paralelas às curvas padrão obtidas usando os padrões do kit. Esses os resultados indicam que este kit pode ser usado para determinar os valores de massa relativa de HIF-1a em humanos.

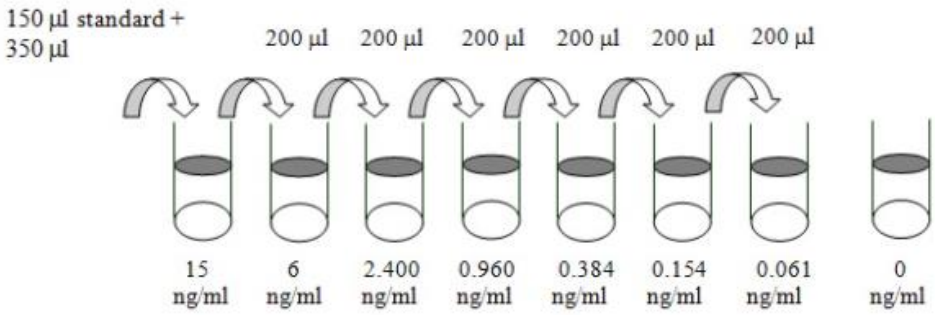
- **PRINCÍPIO DO ENSAIO**

Este ensaio emprega a técnica de imunoensaio enzimático sanduíche quantitativo. Um anticorpo monoclonal específico para HIF-1a humana foi pré-revestido em uma microplaca. Padrões e as amostras são pipetadas para os poços e qualquer HIF-1a presente será ligada ao anticorpo imobilizado. Depois de lavar quaisquer substâncias não ligadas, um anticorpo policlonal ligado a enzima específico para HIF-1a humana é

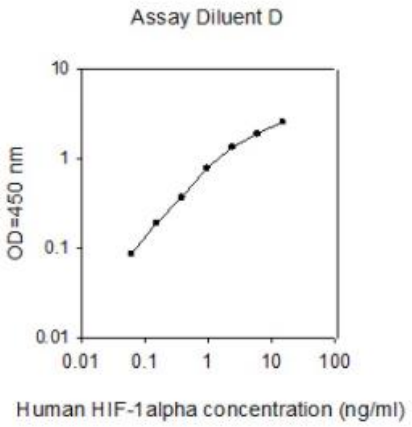
adicionado aos poços. Após uma lavagem para remover qualquer reagente de anticorpo-enzima, uma solução de substrato é adicionada aos poços e a cor se desenvolve diretamente proporcional à quantidade de HIF-1a ligada na etapa inicial. A cor desenvolvida nos poços mudará de azul para amarelo. Após 30 minutos, adicionou-se a solução de parada (*stop solution).* A alteração da cor (azul para amarelo) foi medida por espectrofotometria a um comprimento de onda de 450nm ± 2nm. A concentração de HIF-1a nas amostras foi então determinada comparando a densidade óptica (D.O.) obtidas nas amostras com a curva padrão.

- **CÁLCULO DAS AMOSTRAS**

A curva padrão foi realizada utilizando uma solução de concentração conhecida e realizada diluições como ilustrado na figura abaixo:



Estas oito concentrações estarão dispostas nos oito primeiros poços da placa para a leitura do ELISA e será construída uma curva-padrão, que será utilizada para a determinação das concentrações das amostras dos pacientes, por simples interpolação direta no gráfico. Abaixo está representada a curva-padrão disponível na bula do kit RayBio Human HIF-alpha ELISA. Curva-padrão do HIF-1a:



Concentrações de HIF-1a e suas respectivas leituras de densidade óptica obtidas a partir da solução padrão (standard) do kit RayBio Human HIF-a alpha ELISA.

As leituras não originaram conversão automática pela leitora de ELISA e gráfico, tendo no eixo Y a densidade óptica (DO) e no eixo X a concentração de HIF-1a, como exemplificado acima, não sendo possível documentação da concentração de HIF-1a encontrado nas amostras dos pacientes estudados.

c) **Bula Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF):** DuoSet ELISA Bio-techne development system Human VEGF

- **TESTE PARA QUANTIFICAÇÃO DE VEGF**

O *DuoSet ELISA development system Human VEGF* é um teste de ELISA de fase sólida desenvolvido para medir a fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) humana presente em sobrenadantes de cultura de células, soro, plasma. A performance do teste pode variar de acordo com o meio selecionado.

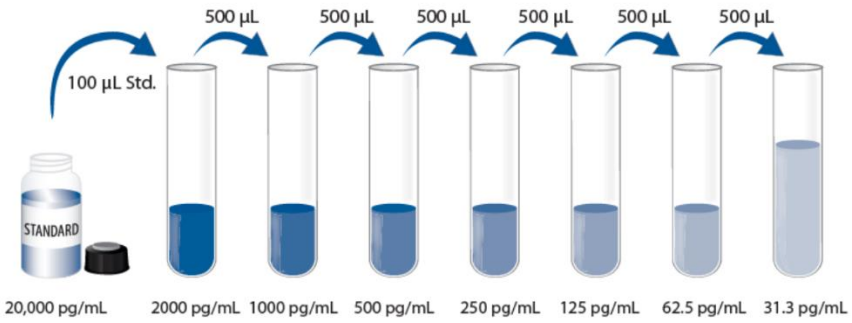
- **PRINCÍPIO DO ENSAIO**

Este ensaio emprega a técnica de imunoensaio enzimático sanduíche quantitativo. Um anticorpo monoclonal específico para VEGF humana foi pré-revestido em uma microplaca. Padrões e as amostras são pipetadas para os poços e qualquer VEGF presente será ligada ao anticorpo imobilizado. Depois de lavar quaisquer substâncias não ligadas, um anticorpo policlonal ligado a enzima específico para VEGF humana é adicionado aos poços. Após uma lavagem para remover qualquer reagente de anticorpo-enzima, uma solução de substrato é adicionada aos poços e a cor se desenvolve diretamente proporcional à quantidade de VEGF ligada na etapa inicial. Cada uma

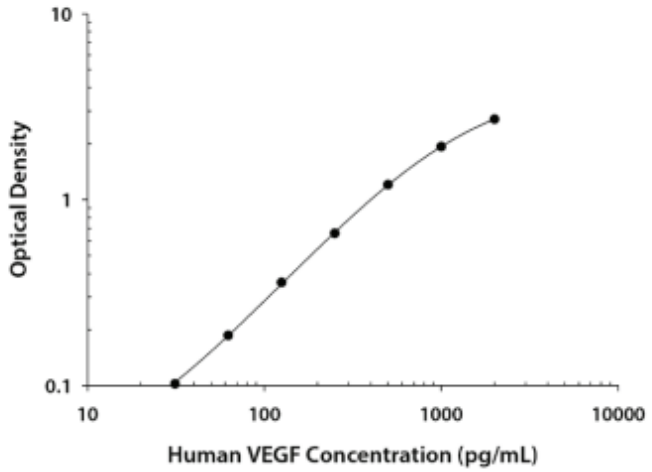
dessas etapas segue um período de incubação de 2 horas em temperatura ambiente evitando luz direta. Adicionou-se a solução de parada (*stop solution)* e após 20 minutos a cor desenvolvida nos poços mudará de azul para amarelo. A alteração da cor (azul para amarelo) foi medida por espectrofotometria a um comprimento de onda de 450nm ± 2nm. A concentração de VEGF nas amostras foi então determinada comparando a densidade óptica (D.O.) obtidas nas amostras com a curva padrão.

- **CÁLCULO DAS AMOSTRAS**

A curva padrão foi realizada utilizando uma solução de concentração conhecida (20.000 pg/mL= ***standard***) e realizada diluições como ilustrado na figura abaixo:



Estas oito concentrações estarão dispostas nos oito primeiros poços da placa para a leitura do ELISA. E será construída uma curva-padrão, que será utilizada para a determinação das concentrações das amostras dos pacientes, por simples interpolação direta no gráfico. Abaixo está representada a curva-padrão disponível na bula do kit. Curva-padrão do VEGF:



Concentrações de VEGF e suas respectivas leituras de densidade óptica obtidas a partir da solução padrão (standard) do kit.

As leituras que não originaram conversão automática pela leitora de ELISA, foi realizado o cálculo manual das concentrações, utilizando-se a construção do gráfico em papel milimetrado, tendo no eixo Y a densidade óptica (DO) e no eixo X a concentração de VEGF, como exemplificado acima.

Além disso, todos os valores de DO das concentrações da curva padrão foram subtraídos dos valores de DO obtidos na leitura do Branco (*Blank*), para correção da leitura de fundo. O *Blank é* realizado com a adição de todos os reagentes, exceto VEGF.

ANEXO 1

The Behaviour of Serum Survivin in Patients With Lupus Nephritis

Biomarker Insights
Volume 17: 1–9
© The Author(s) 2022
Article reuse guidelines:
sagepub.com/journals-permissions
DOI: 10.1177/11772719221131470
SAGE

Renata Valente Lisboa[1,2], Fabiola Reis de Oliveira[1,2], Thaise Oliveira Quaresma[1,2], Rafael Moura de Almeida[3], Rene Donizeti Ribeiro Oliveira[1,2] and Paulo Louzada-Junior[1,2]

[1]Ribeirão Preto Medical School, Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. [2]Center of Research in Inflammatory Diseases (CRID), Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. [3]University Center of Valença, Valença, Rio de Janeiro, Brazil.

ABSTRACT

BACKGROUND: Systemic lupus erythematosus (SLE) is a chronic, multi phenotypic, autoimmune inflammatory disease and renal involvement significantly worsens its prognosis. Apoptosis dysregulation plays a key pathogenic role. Survivin, a protein from the apoptosis inhibitors family, has been considered a promising strategy in cancer therapy and evaluated as one of the regulatory pathways in the scenario of immune-mediated disorders.

OBJECTIVE: This study aims to explore survivin behaviour in SLE patients with lupus nephritis (LN), assessing its potential as a therapeutic and prognostic biomarker.

METHODS: 297 SLE patients were classified based on the American College of Rheumatology (ACR) 1997 criteria, from 2000 to 2015. In a cross-sectional study, the serum level of survivin was measured by an ELISA test and compared between 200 SLE individuals and healthy controls. In a longitudinal cohort, 97 patients with active LN had the concentration of survinin measured, before and after treatment with cyclophosphamide pulse therapy.

RESULTS: The serum concentration of survivin was significantly lower in the SLE group than in healthy controls, regardless of concomitant NL or disease activity. The longitudinal evaluation revealed a significant reduction in survivin serum level after treatment. However, survivin

CONCLUSION: Our study suggests that survivin levels in SLE patients are lower than in the general population. Even so, its use as a biomarker in SLE seems limited, not reflecting disease activity or response to LN treatment, as in other contexts.

KEYWORDS: Survivin, apoptosis, biomarker, lupus nephritis, systemic lupus erythematosus

RECEIVED: March 27, 2022. **ACCEPTED:** September 21, 2022.

TYPE: Original Research

FUNDING: The author(s) disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship and/or publication of this article: This study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Grants: 2013/08216-2, 2020/05601-6) (São Paulo, SP, Brazil); CNPq and CAPES grants. Conselho Nacional de

COMPETING INTERESTS: The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship and/or publication of this article.

CORRESPONDING AUTHORS: Paulo Louzada-Junior, Center of Research in Inflammatory Diseases (CRID), Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Rua das Palmeiras, Casa 3, Ribeirão Preto, São Paulo 14049-900, Brazil. Email: plouzada@fmrp.usp.br

Renata Valente Lisboa, Division of Rheumatology, Ribeirão Preto Medical School,

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação sérica do Fator Induzido por Hipóxia 1 alfa (HIF-1a), do Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) e da Survivina em pacientes com nefrite lúpica

Pesquisador: Paulo Louzada Junior

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 63387416.4.0000.5440

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP -

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DA NOTIFICAÇÃO

Tipo de Notificação: Envio de Relatório Parcial

Detalhe:

Justificativa:

Data do Envio: 23/07/2018

Situação da Notificação: Parecer Consubstanciado Emitido

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.789.973

Apresentação da Notificação:

Tipo de Notificação: Envio de Relatório Parcial

Data do Envio: 23/07/2018

Objetivo da Notificação:

Trata-se de encaminhamento do Relatório Parcial- Solicitação de prorrogação de cronograma

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

não se aplica

Comentários e Considerações sobre a Notificação:

Em carta datada 23 de julho de 2018 o pesquisador encaminhou a prorrogação do cronograma do projeto de doutorado - Avaliação sérica do Fator Induzido por Hipóxia 1 alfa (HIF-1a), do Fator de

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900
UF: SP **Município:** RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br

Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) e da Survivina em pacientes com nefrite lúpica - análise por classe histológica -, orientado pelo Prof. Dr. Paulo Louzada Júnior.
O mesmo foi iniciado em julho de 2016 com programação de conclusão em julho de 2018. Entretanto, por alterações de cunho pessoal e profissional, tal cronograma não foi contemplado. Solicito, por gentileza, a prorrogação do mesmo até dezembro de 2019.
Encaminho conjuntamente o relatório parcial do projeto contendo as atividades realizadas até o momento, as pendências ainda presentes e o novo cronograma solicitado.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:
Documentos devidamente apresentados

Recomendações:
não se aplica

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:
O CEP tomou ciência do Relatório Parcial- Solicitação de prorrogação de cronograma

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Envio de Relatório Parcial	relatorioparcialetica.docx	23/07/2018 16:19:58	RENATA VALENTE LISBOA	Postado
Envio de Relatório Parcial	carta.docx	23/07/2018 16:20:14	RENATA VALENTE LISBOA	Postado

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

RIBEIRAO PRETO, 30 de Julho de 2018

Assinado por:
MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
(Coordenador)

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900
UF: SP **Município:** RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br

Continuação do Parecer: 2.789.973

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900
UF: SP **Município:** RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br