

EDSON PEREIRA DE SOUZA JÚNIOR

**RESPOSTA IMUNOLÓGICA DO TIPO TH17 E SUA REPERCUSSÃO
CLÍNICA NO LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Ernesto Akio Taketomi

UBERLÂNDIA - MG

2016

EDSON PEREIRA DE SOUZA JÚNIOR

**RESPOSTA IMUNOLÓGICA DO TIPO TH17 E SUA REPERCUSSÃO
CLÍNICA NO LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Uberlândia, 25 de outubro de 2016.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Ben-Hur Braga Taliberti
FAMED-UFU

Prof. Dra. Myrthes Toledo Barros
USP-SP

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

S729r
2016 Souza Júnior, Edson Pereira de, 1986
Resposta imunológica do tipo Th17 e sua repercussão clínica no
lúpus eritematoso sistêmico / Edson Pereira de Souza Júnior. - 2016.
29 p.

Orientador: Ernesto Akio Taketomi.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.
Inclui bibliografia.

1. Ciências médicas - Teses. 2. Lúpus eritematoso sistêmico - Teses.
3. Nefrite - Teses. 4. Doenças imunológicas - Teses. I. Taketomi, Ernesto
Akio. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-
Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 61

Agradecimentos

Agradeço primeiramente à Deus por ter me proporcionado a oportunidade de aprimorar e adquirir cada vez mais o conhecimento por meio dos orientadores e mestres

Agradeço ao meu orientador pelo tempo, disponibilidade e dedicação por todo o tempo durante a realização do trabalho.

Agradeço a minha família pelo incentivo incondicional a todos os meus projetos

Agradeço a toda equipe do Setor de Reumatologia do HC-UFU pela cooperação e auxílio na coleta e análises dos dados

RESUMO

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença inflamatória crônica de etiologia desconhecida, caracterizada por distúrbios das repostas imunes aos antígenos ou constituintes próprios, consequente a fatores genéticos, hormonais e ambientais. Assim tem-se por objetivo detectar de forma precoce pacientes com perfil de nefrite lúpica e identificar o papel da resposta Th1, Th2 e Th17 em humanos avaliando o uso de imunomoduladores como terapia alvo em doenças autoimunes. Foram avaliados os níveis de citocinas (IL-2, IL-4, IL-6, TGF- β , IL-10, IL-17, IFN- γ e TNF- α) em pacientes diagnosticados com lúpus eritematoso sistêmico com comprometimento renal ou com acometimento cutâneo-articular (sem nefrite) e indivíduos saudáveis, que não apresentavam doenças autoimunes, ambos os grupos do sexo feminino, na faixa etária de 30 a 45 anos, no período de março a outubro de 2011. O nível médio das citocinas IL-10, IFN- γ e IL-17 foram maiores em pacientes lúpicas do que no grupo controle, ao passo que os níveis das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, TNF- α e TGF- β não evidenciaram diferença estatística entre estes dois grupos. Além disso, houve aumento estatisticamente significativo nos níveis de IFN- γ e IL-17 no subgrupo de pacientes com nefrite lúpica quando comparados ao grupo de pacientes com acometimento cutâneo-articular e ao grupo controle. Assim, o melhor entendimento dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos nas doenças autoimunes, em particular no LES, poderá gerar novas perspectivas de tratamento com a finalidade de permitir intervenção na ativação de determinadas vias do processo inflamatório com o objetivo de cada vez mais melhorar a qualidade de vida dos pacientes.

Palavras-chave: Lúpus Eritematoso Sistêmico. Th17. Nefrite lúpica. IFN- γ . IL-10. IL-17.

ABSTRACT

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a chronic inflammatory disease of unknown etiology characterized by disorders of immune responses to the antigens or specific constituents, consequent to genetic, hormonal and environmental factors. The objective is thus to early detect patients with lupus nephritis profile and identify the role of Th1, Th2 and Th17 responses in humans evaluating the use of immunomodulators as targeted therapy in autoimmune diseases. Levels of cytokines were assessed (IL-2, IL-4, IL-6, TGF- β , IL-10, IL-17, IFN- γ and TNF- α) in patients diagnosed with systemic lupus erythematosus with renal impairment or with cutaneous-articular involvement (without nephritis) and healthy individuals who did not have autoimmune diseases, both female groups, aged 30-45 years in the period from March to October 2011. The average level of cytokines IL -10, IFN- γ and IL-17 were higher in patients with lupus than in control group, whereas the levels of cytokines IL-2, IL-4, IL-6, TNF- α and TGF- β have demonstrated no statistical difference between these two groups. In addition, there was a statistically significant increase in levels of IFN- γ and IL-17 in the subgroup of patients with lupus nephritis compared to the group of patients with cutaneous-articular involvement and to the control group. So, a better understanding of the cellular and molecular mechanisms involved in autoimmune diseases, especially SLE, may generate new prospects for treatment with the purpose of enabling intervention in the activation of specific ways of the inflammatory process with the aim of increasingly improve the quality of life of the patients.

Keywords: Systemic Lupus Erythemathosus. Th17. Lupus Nephritis. IFN- γ . IL-10. IL-17.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	7
2 OBJETIVO	13
2.1 Objetivo Geral.....	13
2.2 Objetivos Específicos	13
3 CASUÍSTICA E MÉTODOS	14
3.1 O Hospital	14
3.2 Desenho de estudo	14
3.3 Procedimento da coleta de dados	15
3.4 Análise de dados	15
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
5 CONCLUSÃO	23
6 REFERÊNCIAS.....	25

1 INTRODUÇÃO

Lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença autoimune sistêmica caracterizada pela produção de autoanticorpos, formação e deposição de imunocomplexos, inflamação em diversos órgãos e dano tecidual. Sua etiologia permanece ainda pouco conhecida, porém sabe-se da importante participação de fatores hormonais, ambientais, genéticos e imunológicos para o surgimento da doença. As características clínicas são polimórficas e a evolução costuma ser crônica com períodos de exacerbação e remissão. A doença pode cursar com sintomas constitucionais, artrite, serosite, nefrite, vasculite, miosite, manifestações mucocutâneas, hemocitopenias imunológicas, diversos quadros neuropsiquiátricos, hiperatividade reticuloendotelial e pneumonite (LOPES, 2006; BRASIL, 2013; MCLNNE; ROMAIN, 2014).

No Brasil, estima-se uma incidência de LES em torno de 8,7 casos para cada 100.000 pessoas por ano, de acordo com um estudo epidemiológico realizado na região Nordeste (BRASIL, 2013). A mortalidade dos pacientes com LES é cerca de 3 a 5 vezes maior do que a da população geral e está relacionada a atividade inflamatória da doença, especialmente quando há acometimento renal e do sistema nervoso central (SNC), a maior risco de infecções graves decorrentes da imunossupressão e, tardiamente, às complicações da própria doença e do tratamento, sendo a doença cardiovascular um dos mais importantes fatores de morbidade e mortalidade dos pacientes (VILLAR; SATO, 2002).

A incidência do lúpus não é conhecida, mas varia de acordo com a localidade e a etnia. Taxas de prevalência de 4 a 250/100000 foram relatados com aumento da prevalência entre índios norte-americanos, asiáticos, polinésios, latinos e afro-americanos. Apesar de o início antes dos 8 anos de idade ser incomum o lúpus já foi identificado durante o primeiro ano de vida, sendo a predominância feminina variando de 4:1 antes da puberdade, de 8:1 a partir dessa fase, sendo assim, 9 a 10 vezes mais frequente em mulheres durante a idade reprodutiva (NELSON, 2009; SCHUR; GLADMAN, 2011).

Embora a causa específica do LES seja desconhecida, a desregulação do sistema imune e dos imunocomplexos teciduais causam danos em locais como a pele e os rins, assim como autoanticorpos citotóxicos que causam trombocitopenia e anemia hemolítica, são causas suspeitas. Múltiplos distúrbios imunes podem predispor ao lúpus

(RAÍ, 2009). Pacientes com LES mostraram anormalidades celulares incluindo um aumento da apoptose *in vitro* relacionado a proteínas (Bcl2), e um aumento da regulação para cima de antígenos celulares, bem como um desarranjo da produção de citocinas (ARINGER, et. *al*, 2001).

O entendimento atual da patogênese do lúpus envolve o papel da susceptibilidade genética com base em modelos que envolvem múltiplos genes, desencadeantes ambientais, incluindo infecções microbianas, luz solar, algumas drogas e uma função alterada do sistema imune. Avanços recentes na imunologia têm como principal foco os mecanismos que descrevem a ativação do sistema imune inato em que alguns aspectos genéticos e ambientais do lúpus promovem sua ativação e, conseqüentemente, a autoimunidade. Outros fatores podem contribuir para a inflamação e as lesões teciduais (CECIL, 2009). Tanto células T *reg* CD4⁺ quanto CD8⁺, aparecem relacionados em número e em função nas diversas doenças autoimunes e nos modelos experimentais de autoimunidade, sugerindo a possibilidade de imunoterapia alvo dessas células para melhorar o manejo de condições autoimunes (DINESH, et. *al*, 2010).

O sistema imune é organizado em dois diferentes tipos de resposta, a inata e adaptativa. A resposta inata é imediata e rápida, inclui a presença de neutrófilos e macrófagos os quais, dentre outras funções, estão relacionados com a ingestão e destruição de patógenos. Há ainda na resposta inata a associação com destruição do tecido local em processos inflamatórios. Já a resposta adaptativa é mais lenta, apesar de fornecer duas características que não estão presentes na resposta inata: reconhecimento específico dos antígenos e células de memória, os quais permitem um rápido recrutamento de células de defesa após exposição ao agente agressor (MCLNNES; TEPAS, 2014).

As células CD4⁺ T helper (resposta adaptativa) podem se classificar em dois diferentes subtipos baseados em seus padrões de produção de citocinas. Células Th1 produzem principalmente interferon- γ (IFN- γ) e interleucina-2 (IL-2) e provêm imunidade mediada por células, enquanto células Th2 secretam IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, estão associados com a resposta imune humoral e induzem a produção de anticorpos. Foi demonstrado que um desbalanço entre a produção de citocinas de células Th1 e Th2 constitui um papel chave na indução do desenvolvimento de doenças auto-imunes severas; a correção entre esse desbalanço tem, de fato, levado a uma profilaxia e terapia de vários modelos de autoimunidade (MITSUTERU, et. *al*, 1999). Uma perturbação do

equilíbrio Th1/Th2 em indivíduos normais, e o seu retorno aos parâmetros anteriores, indica que mecanismos homeostáticos subjacentes devem operar (MITCHISON, et. al,1999).

Estudos mais recentes demonstraram que as células T se distinguem em pelo menos quatro subtipos diferentes de linhagem: Th1, Th2, Th17 e *Treg*, sendo os padrões Th1 e Th2 os mais bem estudados. Sob a influência de IL-6 e TGF- β , a resposta Th17 se amplifica após secreção da IL-17. Essa última, parece ter um papel relacionado com respostas inflamatórias crônicas, em infecções, alergias e autoimunidade (BONILLA; TEPAS, 2014).

As células Th1 e Th17 exercem um papel relacionado com autoimunidade, enquanto as Th2 são marcadores de doenças atópicas. As T regulatórias representam o principal subtipo de CD4⁺ que podem estar envolvidas no controle e atenuação da atividade dos outros três subtipos (BALLAS, 2014).

Espera-se que a compreensão da relação entre os subgrupos de células T, seus respectivos padrões de citocinas e as condições patológicas revelem a maneira de manipular as respostas imunológicas na prevenção e no tratamento da doença. Já existem muitos modelos experimentais em que a modulação do equilíbrio Th1/Th2, com citocinas recombinantes ou antagonistas das citocinas, altere a evolução da doença lúpica (RANG; DALE, 2007).

O envolvimento renal é frequente no LES, pois 74% dos pacientes serão acometidos em algum momento na evolução da doença, sendo um indicador de mau prognóstico. A patologia renal é geralmente decorrente do depósito de imunocomplexos circulantes ou da formação local desses complexos nos glomérulos levando a ativação do complemento e subsequente recrutamento de células inflamatórias (CECIL, 2009). Deve-se ter em mente que os sintomas e sinais específicos de nefrite só ocorrem em grau avançado de síndrome nefrótica e de insuficiência renal. A constatação de nefrite lúpica, portanto, baseia-se fundamentalmente em alterações laboratoriais e histológicas (LOPES, 2009)

Pacientes que sofrem de LES com comprometimento renal apresentam frequentemente remissão da atividade clínica sistêmica, após progressão para um estágio terminal de doença renal (ETDR). LES é caracterizado por ter uma resposta imune predominantemente humoral, resposta por meio de células Th2. Uma vez que o ETDR induz um estado de imunodeficiência que afeta o balanço dos subtipos de células

T, sugere-se que haja uma indução para a resposta imune do tipo Th1 pelo ETDR, o que pode ser a responsável pela remissão clínica sistêmica (HEINE, et. *Al*, 2002).

A dosagem de RNAm e a expressão de proteína do T-bet foram significativamente maiores em paciente portadores de lúpus eritematoso sistêmico com nefrite lúpica, do que naqueles com quadro inativo da doença (CHAN, et. *Al*, 2006).

Células Th17 estão sendo inicialmente implicadas na patogênese do LES. Estudos recentes mostraram que a IL-27 controla o desenvolvimento de Th17 (LI, et. *Al*, 2010). A resposta Th17 se associa com a produção de IL-17, IL-22, IL-23 e com o recrutamento de granulócitos (CHAUDHRY, et. *Al*, 2009).

Há uma forte relação no papel das células Th17 em algumas formas de glomerulonefrite, sobretudo em modelos animais (RONCO; FORMAN, 2014).

Um fator de transcrição que é responsável pela diferenciação das células Th17 é o receptor órfão retinóide (ROR γ t). *In vitro*, esse fator de transcrição promove a expressão da IL-17 (CHEN; O'SHEA, 2008). A identificação do ROR γ t como um fator da linhagem Th17, estabeleceu a identificação dessas células como um novo subgrupo de células Th (HIROTA; MARTIN; VELDHOFEN, 2010). A IL-17 consiste em uma família de seis citocinas estruturalmente relacionadas, algumas das quais provem danos teciduais em doenças de hipersensibilidade e outras são importantes para defesa contra infecções bacterianas. A IL-17 A e F, que são os membros mais bem caracterizados da família, são produzidas por diversos tipos de células, incluindo um subconjunto de células T CD4⁺ efectoras distintas das células Th1 e Th2, chamada Th17 (ABBAS, et. *Al*, 2008).

As células Th17 têm sido detectadas em diferentes artropatias, mas o seu papel funcional nas doenças humanas ainda não está estabelecido (LUBBERTS, 2010). Um aumento dos níveis da IL-17 foi detectado em vários pacientes com doença autoimune, como LES, artrite reumatoide, esclerose múltipla e colite inflamatória (KURTS, 2008).

As células Th17 tem se mostrado com uma nova via de resposta, diferente daquela das células Th1 e Th2. Semelhante à diferenciação das outras subpopulações, a atividade de células Th17 é controlada pela exposição à citocinas específicas. Nos camundongos, as citocinas que desempenham esse papel são a TGF- β e IL-6 produzidas pelas APC (células apresentadores de antígenos). A geração de células Th17 pode ser inibida por várias citocinas. De grande importância é o fato de que essas substâncias produzidas por células Th1 (IFN- γ) e Th2 (IL-4) são conhecidas por interferirem no

desenvolvimento das células Th17. A presença da IL-2 também tem demonstrado inibir a diferenciação em direção a linhagem dessas células e, em vez disso, favorecer a geração de T regulatórias (CD4+, CD25+) (PERNIS, 2009). Fato interessante é que duas citocinas com efeitos antagônicos têm cooperado para induzir de forma diferente as células Th17, sugerindo que TGF- β e IL-6 agindo em conjunto induzem a diferenciação em favor das células Th17 por meio da expressão do fator de transcrição denominado de ROR γ t. 7 (KORN, et. *al*, 2009).

Uma das recentes observações sobre o desenvolvimento das células Th17 foi que a diferenciação das Th0 em direção a essa linhagem pode ser inibida pela citocina IFN- γ (Th1), mas em lesões inflamatórias induzidas por doenças autoimunes, as Th17 e as Th1 podem ser encontradas juntamente, sugerindo a possibilidade de uma correlação entre essas linhagens nessas doenças (SPOLSKI; LEONARD, 2009).

A interleucina 27 é uma citocina helicoidal da grande família IL-6/IL-12 com uma abrangência de propriedades anti-inflamatórias (BATTEN; GHILARDI, 2007). Tem se mostrado que uma deficiência da sinalização da IL-27 resulta em um aumento da resposta Th17, o que pode contribuir para a inflamação tecidual. A inibição da resposta Th17, responsável pela produção da IL-27, depende da sinalização de STAT1, mas não requer T-bet, IFN- γ R ou receptor de IL-6 (KORN, et. *al*, 2009). A linhagem de Th17 vem sendo caracterizada como um fator de extrema importância em uma variedade de respostas imunes inflamatórias (O'DWYER, 2008).

As primeiras citocinas descritas que regulam negativamente a geração de células Th17 foram IFN- γ (Th1) e IL-4 (Th2). De fato, anticorpos anti-IFN- γ e anti-IL-4, facilitam *in vitro* a diferenciação de células T produtoras de IL-17 (BASSO; CHEROUTRE; MUCIDA, 2009).

LES pode estar ligado a uma expansão da população de células Th17 e à uma depleção natural de células Treg. O aumento de Th17 parece estar relacionado a uma citocina distinta no lúpus com atividade clínica sistêmica. A IL-17 está envolvida na inflamação vascular. O antagonismo de células Th17 por meio do bloqueio de IL-17 com anticorpos deve ser explorado como tratamento para o lúpus (YANG, et. *al*, 2009). Outras citocinas além da IL-17 parecem ter um papel somente parcial com a progressão da doença, desde que fosse neutralizada a resposta IL-17 por esses anticorpos (BEADILING; SLIFKA, 2006).

Moléculas alvo envolvidas na geração, manutenção e na função efetora das células Th17, como TGF- β , IL-6, IL-23 e IL-17, estão sendo correlacionados como uma possível modalidade terapêutica para o controle das desordens inflamatórias (BASSO; CHEROUTRE; MUCIDA, 2009).

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

Detectar de forma precoce pacientes com perfil de nefrite lúpica a partir do papel da resposta Th1, Th2 e Th17 em humanos.

2.2 Objetivos Específicos

Dividir grupos de pacientes com diferentes perfis da apresentação clínica do lúpus e grupo controle;

Estudo da casuística relacionada aos grupos de pacientes;

Comparar os grupos com relação à média das variáveis IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ , IL-17, TGF- β ;

Relacionar os resultados obtidos na comparação dos grupos com o grau ou severidade da doença;

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 O Hospital

O Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia é um hospital universitário, com aproximadamente 500 leitos, que oferece nível terciário de atendimento. O ambulatório didático Amélio Marques faz parte do complexo hospitalar, o qual atende pacientes em diversas especialidades, conta com 113 consultórios médicos e 24 salas destinadas para consultas não médicas e procedimentos.

3.2 Desenho de estudo

Realizado um estudo observacional, horizontal, do tipo caso controle, com pacientes do sexo feminino, divididos em quatro grupos, na faixa etária de 30 a 45 anos: 30 pessoas saudáveis do sexo feminino (controle); 16 pacientes com lúpus subgrupo clínico cutâneo articular (CA), 8 pacientes lúpicas com acometimento renal, sendo denominados portadores de nefrite lúpica (NL), e 6 pacientes com lúpus inicialmente com padrão cutâneo-articular, porém que evoluíram para nefrite lúpica nos anos subsequentes (CANL), em um total de 30 pacientes e 30 mulheres saudáveis.

Após a coleta, análise e armazenamento das amostras séricas das citocinas inflamatórias, foi feito o acompanhamento dos pacientes por meio de revisão de prontuário e acesso ao Sistema de Informação Hospitalar do HC-UFU, identificando o perfil clínico de acometimento da doença (nefrite lúpica x cutâneo-articular).

Os parâmetros utilizados para avaliar o envolvimento renal (nefrite lúpica) foram: edema, oligúria e hipertensão arterial; exame do sedimento urinário, proteinúria de 24 horas, creatinina e albumina séricas, depuração de creatinina, C3 , anticorpos anti-dsDNA e biópsia renal.

Pacientes que não apresentavam estes critérios e que tinham lesões cutâneas e/ou articulares considerados critérios diagnósticos pelo Colégio Americano de Reumatologia, foram enquadrados no subgrupo clínico cutâneo-articular.

3.3 Procedimento da coleta de dados

Foi realizada a coleta de plasma sanguíneo, no ambulatório de análise clínicas da UFU, no qual foram dosados: Fator anti-nuclear (FAN), anticorpo anti-dsDNA, anticorpo anti-Sm, e outros auto-anticorpos no laboratório do Hospital de Clínicas da UFU, bem como citocinas (IFN- γ , TNF- α , TGF- β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-17) e seus respectivos RNAs mensageiros.

As citocinas IFN- γ e IL-10 foram mensuradas em soro por ELISA *sandwich*, segundo protocolo recomendado pelos fabricantes (R&D Systems, Minneapolis, EUA).

A quantificação das citocinas da resposta Th17 (IL-17) foi feita através do Kit BD Cytometric Bead Array (CBA).

As demais citocinas foram avaliadas usando a técnica de PCR do tipo cinético ou “real time” PCR (RT-PCR), conforme Bustin (2000), com adaptações para a padronização da técnica para cada uma dessas em separado.

3.4 Análise de dados

O estudo da casuística relacionada aos pacientes em cada subgrupo clínico do Lupus (Controle, CA, CANL e NL) foi verificado para cada variável (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF- α , IFN- γ e TGF- β) se as mesmas seguiam distribuição normal, verificado pelo teste de Shapiro-Wilk ($P > 0,05$). A estas foi realizado a estimação intervalar das médias amostrais a partir de um intervalo de confiança para média com aproximação à uma distribuição normal. O intervalo de confiança (IC) para média (μ) populacional é apresentado a seguir:

$$IC(\mu)_{1-\alpha} : [LI; LS] : \left[\bar{x} - t_{(\alpha/2; n-1)} \frac{S}{\sqrt{n}}; \bar{x} + t_{(\alpha/2; n-1)} \frac{S}{\sqrt{n}} \right]$$

em que, LI é o limite inferior e LS o limite superior do intervalo de confiança estimado, $1 - \alpha$ é o nível de confiança, sendo que foi fixado em 95%, α é o nível de significância, t refere-se a probabilidade $\alpha/2$ unicaudal da distribuição t-student com $n - 1$ graus de liberdade ; n é o tamanho da amostra (MORETTIN, 2009). Nos casos em que não foi observado a normalidade dos dados (distribuições assimétricas) estimou-se a mediana e o intervalo de confiança para mediana.

Uma aproximação para o intervalo de confiança de $1-\alpha$ para a mediana foi estimado pelo método de Hettmansperger-Sheather (1986):

$$IC(Md)_{1-\alpha} : [LI; LS] : [\lambda X_{k+1} + (1-\lambda) X_k; \lambda X_{n-k} + (1-\lambda) X_{n-k+1}] ,$$

em que n : tamanho da amostra de uma variável aleatória que segue uma distribuição Binomial ($B(n, p=0,5)$); k : inteiro entre $[0, n/2]$; $\lambda = (n-k)I/k + (n-2k)I$; $I = \gamma_k - 1 - \alpha / \gamma_k - \gamma_{k+1}$; $\gamma_{k+1} < 1 - \alpha < \gamma_k$; X : valores observados.

Para comparar os diferentes subgrupos clínicos do lúpus, em cada uma das variáveis analisadas, foi realizado um estudo de análise de variância (ANAVA) de um delineamento inteiramente casualizado (DIC), sendo os tratamentos desse delineamento os diferentes grupos (Controle, CA, CANL e NL) e as repetições os pacientes. Este modelo estatístico depende das pressuposições de normalidade e independência dos resíduos e homogeneidade das variâncias. Satisfazer estas pressuposições garantem a robustez no teste F da ANAVA e também do teste de comparação múltipla e, consequentemente, a confiabilidade nos resultados. Para a variável IL-6, a pressuposição de normalidade dos resíduos não foi satisfeita, assim, uma transformação logarítmica foi realizada nos dados, $\ln(IL-6+1)$, que após resolver o problema foi submetida à significância do teste F da análise de variância (MORAIS, 2001; PIMENTEL-GOMES, 2000; BANZATTO e KRONKA, 1995).

Para as demais variáveis que, mesmo depois de diversas transformações, não atenderam as pressuposições de normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias, foi aplicado o teste não-paramétrico de Kruskal Wallis e representados as médias dos rank's ou médias das posições graficamente.

As análises foram realizadas utilizando o ambiente R: A Language and Environment for Statistical Computing (2015).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na casuística (Tabela 1), as variáveis que seguiam distribuição Normal (simétrica), foram representadas pela média. Para as que não seguiam a Normal (assimétrica) foram representadas pela mediana, pois esta representa a tendência central dos dados de forma mais realista. Assim, tem-se para o grupo Controle, como era de se esperar, estimativas de tendência central próximas de zero e baixa variabilidade para a maioria das variáveis estudadas. Exceção foi para TGF- β , com valores em torno de 47 mil. Para os demais grupos houve uma tendência de aumento geral nos valores das variáveis analisadas, exceto para CA em que esse incremento foi inferior. Nota-se também altas variações ou variabilidades em algumas variáveis nos subgrupos clínicos do lúpus e não se observa o mesmo no controle. Para a variável IL-4, no grupo CA não foi possível a realização do cálculo do teste de normalidade devido ao fato de que todos os valores da variável neste grupo ser igual a zero.

Tabela 1. Casuística por subgrupos do Lupus.

Grupos	Variáveis	Estimativas	p-valor ¹
Controle	IL2 ,mediana (IC)	0,0 (0,0-0,57)	<0,01
	IL4, mediana (IC)	0,0 (0,0-0,0)	<0,01
	IL6, mediana (IC)	1,84 (1,47-2,74)	<0,01
	IL10, xbar \pm SD [IC]	1,1528 \pm 0,474 [0,9723-1,3332]	0,096
	TNF, mediana (IC)	0,0 (0,0-0,0)	<0,01
	GAMA, mediana (IC)	0,49 (0,38-0,68)	<0,01
	IL17A, mediana (IC)	0,0 (0,0-0,0)	<0,01
	BETA, xbar \pm SD [IC]	47782,7 \pm 14335,5 [42429,7-53135,7]	0,132
CA	IL2 ,mediana (IC)	0,0 (0,0-1,0)	<0,01
	IL4	0,0	-
	IL6, mediana (IC)	2,25 (1,51-4,84)	<0,01
	IL10, mediana (IC)	1,765 (1,02-2,87)	<0,01
	TNF, mediana (IC)	0,0 (0,0-0,93)	<0,01
	GAMA, xbar \pm SD [IC]	0,4836 \pm 0,331 [0,2925-0,6746]	0,214
	IL17A, mediana (IC)	0,0 (0,0-0,0)	<0,01

	BETA, xbar \pm SD [IC]	36784,3 \pm 17772,4 [27314,1-46254,6]	0,850
CANL	IL2, xbar \pm SD [IC]	0,7217 \pm 0,605 [0,0868-1,3565]	0,249
	IL4, mediana (IC)	0,0 (0,0-1,5)	<0,01
	IL6, mediana (IC)	2,905 (1,67-10,57)	0,026
	IL10, mediana (IC)	1,83 (1,51-5,72)	<0,01
	TNF, xbar \pm SD [IC]	0,8083 \pm 0,836 [0,0-1,6857]	0,274
	GAMA, xbar \pm SD [IC]	0,5367 \pm 0,299 [0,2226-0,8507]	0,351
	IL17A, mediana (IC)	0,0 (0,0-24,37)	<0,01
	BETA, mediana (IC)	43896,3 (35776,0-68556,1)	0,045
NL	IL2, mediana (IC)	0,915 (0,0-1,39)	0,034
	IL4, mediana (IC)	0,0 (0,0-1,5)	<0,01
	IL6, xbar \pm SD [IC]	3,9513 \pm 2,843 [1,5748-6,3277]	0,585
	IL10, xbar \pm SD [IC]	2,0113 \pm 1,081 [1,1073-2,9152]	0,086
	TNF, mediana (IC)	0,905 (0,0-1,26)	0,021
	GAMA, mediana (IC)	0,75 (0,43-87,55)	<0,01
	IL17A, mediana (IC)	10,655 (0,0-86,85)	<0,01
	BETA, xbar \pm SD [IC]	39997,8 \pm 9320,9 [32205,3-47790,3]	0,515

IC: intervalo de confiança; SD: desvio padrão; xbar: média amostral;¹Teste de Shapiro-Wilk para normalidade; p-valor em negrito indicam testes significativos ao nível de 0,05 de significância, ou seja, dados não seguem a distribuição Normal. IL-4 no grupo CA tiveram todos valores iguais a zero.

As pressuposições de normalidade dos resíduos da análise de variância em DIC não foram satisfeitas para a maioria das variáveis analisadas pela ANAVA, com exceção de IL-6 e TGF- β , sendo a primeira, após a transformação logarítmica, satisfatória (Tabelas 2 e 3). Para essas variáveis foi feito a ANAVA com a utilização de teste F para comparação múltipla e para demais o teste de Kruskal Wallis.

Segundo Finkelmann et. al (1988), Romani et. al (1992) e Salgame et. al (1991) há situações em doenças autoimunes, em que a resposta Th1 está associada com um melhor prognóstico, enquanto na Th2 está associada com uma menor capacidade de controle da doença e, com isso, evolução desfavorável. (LOCKSLEY; SCOTT, 1991). No nosso estudo esta associação não pôde ser observada, visto que não houve diferença estatística entre as variáveis IL-2, TNF- α (Th1) e IL-4, IL-6 (Th2) e TGF- β , dentro dos diferentes grupos de pacientes. Segundo Tanaka et. al (1999) ,teoricamente mudanças

nos valores de Th2 pode aumentar a susceptibilidade do LES, mas, de acordo com seus resultados, esta associação não pôde ser demonstrada. Tais resultados se assemelham ao nosso estudo visto que não foram observadas diferenças entre os grupos de pacientes com lúpus em relação ao grupo controle para as principais citocinas da resposta Th2. A mesma análise não ocorreu para as variáveis IL-10, IFN- γ e IL-17.

Houve aumento dos valores séricos da IL-10 nos grupos NL, CANL e CA, em relação ao grupo controle, de 74%, 114% e 247%, respectivamente. Segundo Sanjabi *et. al* (2009) a IL-10 é chave para a regulação do sistema imune, uma vez que limita a resposta inflamatória, o que, em situações exacerbadas, poderia causar danos teciduais.

Na análise da IFN- γ e IL-17 a diferença foi entre NL com relação à CA e Controle, sendo evidenciado um aumento dos valores para o subgrupo NL. Para o IFN- γ , no subgrupo NL, houve um aumento de 1055% em relação ao controle e para IL-17 de 394%. Quando comparado NL ao CA essas porcentagens são ainda maiores (Tabelas 2-3 e Figuras 1-2).

Tabela 2. Médias das variáveis IL-2, IL-4, IL-6 e IL-10, analisadas em função dos grupos de pacientes, incluindo as pressuposições do modelo em DIC.

Grupos	IL-2	IL-4	IL-6 ¹	IL-10
Controle	0,2686 a	0,2035 a	2,484 a	1,1527 b
CA	0,4107 a	0,0000 a	4,610 a	4,0100 a
CANL	0,7217 a	0,2500 a	4,055 a	2,4700 a
NL	0,7100 a	0,1875 a	3,951 a	2,0112 a
p-valor	0,0887	0,5318	0,2574	0,0014
	$W = 0,89;$ $L=1,1; DW=$ 1,85	$W = 0,52; L=$ 0,7; DW= 2,13	$W = 0,97; L=$ 0,18; DW= 2,46	$W = 0,35; L=$ 1,16; DW= 2,14

¹ Médias seguidas de mesma letras na coluna em IL-6 não se diferem entre si pelo teste de F ao nível de 0,05 de significância, as demais pelo teste de Kruskal Walllis; W , L , DW : estatísticas dos testes de Shapiro-Wilk para normalidade dos resíduos, Levene para homogeneidade de variâncias e Durbin-Watson para independência dos resíduos, respectivamente; Valores em negrito indicam resíduos normalmente distribuídos e independentes e variâncias homogêneas ao nível de 0,05 de significância; ¹ Transformação logarítmica para aplicação da ANOVA e p-valor do teste F.

Desta forma pode-se observar que para grupos de pacientes com as características estudadas, a IL-10 só diferencia pacientes sadios daqueles que tiveram lúpus, independente do acometimento clínico. Portanto, esta variável não se demonstrou interessante em diferenciar o padrão do acometimento clínico, mas sim demonstrar possível atividade de doença pelo lúpus.

Tabela 3. Médias das variáveis TNF- α , IFN- γ , IL-17 E TGF- β , analisadas em função dos grupos de pacientes, incluindo as pressuposições do modelo em DIC.

Grupos	TNF- α	IFN- γ	IL-17	TGF- β ¹
Controle	0,2293 a	1,0465 b	4,4172 b	47782,73 a
CA	0,3557 a	0,4836 b	1,0071 b	36784,35 a
CANL	0,8083 a	0,5367 ab	5,2250 ab	46078,27 a
NL	0,6662 a	12,0975 a	21,8287 a	39997,84 a
p-valor	0,0647	0,0443	0,0047	0,0987
	$W = 0,88;$ $L=1,2; DW=$ 2,10	$W = 0,33; L=$ 2,2; DW= 2,21	$W = 0,52; L=$ 2,2; DW= 1,87	$W = \mathbf{0,98}; L=$ 1,26; DW= 2,40

¹Médias seguidas de mesmas letras na coluna em TGF- β não se diferem entre si pelo teste de F ao nível de 0,05 de significância, as demais pelo teste de Kruskal Wallis; W , L , DW : estatísticas dos testes de Shapiro-Wilk para normalidade dos resíduos, Levene para homogeneidade de variâncias e Durbin-Watson para independência dos resíduos, respectivamente; Valores em negrito indicam resíduos normalmente distribuídos e independentes e variâncias homogêneas ao nível de 0,05 de significância.

Observando os resultados médios das variáveis IFN- γ e IL17 nota-se que houve uma distinção nítida entre os pacientes diagnosticados com nefrite lúpica em relação ao padrão cutâneo-articular e ao grupo controle (sadios). Assim, estas citocinas poderiam ser uma ferramenta de auxílio no diagnóstico precoce do subgrupo clínico nefrite lúpica e, com isso, agir de forma precoce, visando inibir a progressão para estágios irreversíveis da doença, sobretudo para estágio final de doença renal. Porém, cabe salientar que caso os pacientes fossem do grupo CANL não foi possível encontrar esta associação.

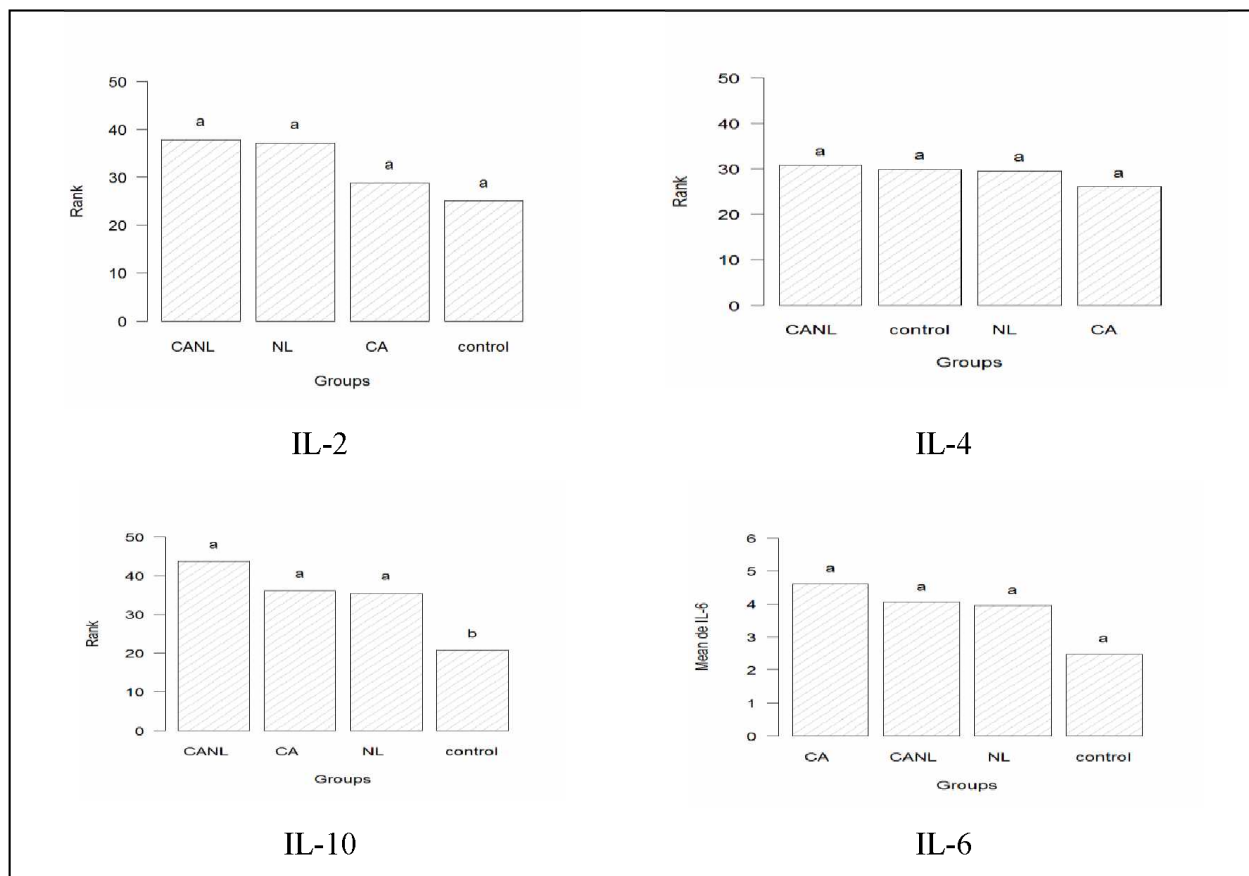


Figura 1. Médias dos rank's para as variáveis IL-2 , IL-4 e IL-10 em função dos grupos de pacientes, letras distintas detectadas pelo teste de Kruskal Wallis e Médias da variável IL-6 letras iguais detectadas pelo teste de F.

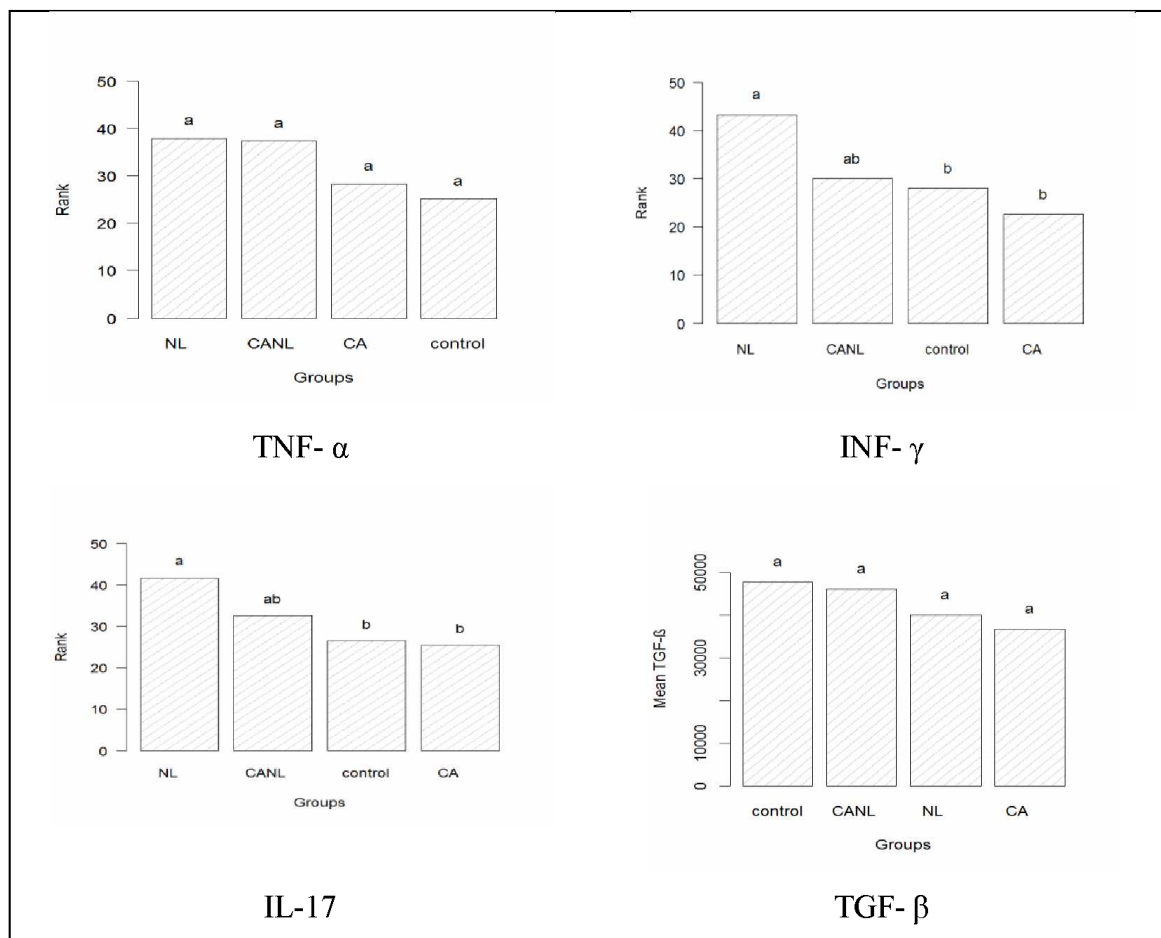


Figura 2. Médias dos rank's para as variáveis TNF- α , INF- γ e IL-17 em função dos grupos de pacientes, letras distintas detectadas pelo teste de Kruskal Wallis e Médias da variável TGF- β letras iguais detectadas pelo teste de F.

5 CONCLUSÃO

Por ser uma doença que afeta vários sistemas e que se detectada precocemente melhora os índices de sobrevida, é necessário maiores estudos principalmente no que diz respeito ao uso de imunobiológicos e seus respectivos anticorpos reguladores das vias de resposta imune. A terapia alvo, com bloqueio da resposta Th1 e/ou Th17 com anticorpos anti-IFN- γ e anti-IL-17, respectivamente, parece ser uma das mais promissoras.

Ao se identificar o subgrupo clínico da doença, antes mesmo das lesões tardias evidenciadas pelos exames laboratoriais e histopatológicos, por meio dos valores das citocinas séricas, poderíamos interferir no prognóstico dos pacientes, agindo com intuito de inibir a lesão renal permanente e reduzindo com isso a morbimortalidade. Sabe-se que a presença de lesões permanentes no primeiro ano do diagnóstico da doença associa-se a uma maior mortalidade nos próximos 10 anos.

Valores limites (*cut off*) das principais citocinas, indicando a presença ou não da doença e o perfil de acometimento clínico (cutâneo-articular x nefrite), podem ser a nova ferramenta promissora do tratamento do lúpus e de outras desordens autoimunes.

Houve uma associação entre o aumento de IL-10 entre o grupo de pacientes lúpicas em relação ao grupo controle, o que poderia sugerir atividade de doença, uma vez que a IL-10 geralmente se relaciona com a resposta Treg, na tentativa de promover a autorregulação para controlar o processo inflamatório observado em doenças autoimunes.

Adicionalmente, pacientes com nefrite lúpica apresentaram maiores níveis de IFN- γ e IL-17 em relação aos pacientes do subgrupo cutâneo-articular e indivíduos do grupo controle, sugerindo que se dosados de forma precoce nos pacientes portadores de LES, ainda sem evidência clínica de acometimento renal, pode-se melhorar o prognóstico e o desfecho clínico destes, uma vez que a terapêutica pode ser instituída de forma precoce.

Apesar disso, ainda há uma enorme barreira no que diz respeito, principalmente na etiopatogênese dessa comorbidade. Deve-se levar em conta vários fatores que podem alterar a resposta e o padrão do acometimento clínico, como: sexo, idade, fatores hereditário e até mesmo ambiente externo, podendo alterar níveis séricos das citocinas e seus respectivos valores limítrofes.

Dessa maneira, faz-se necessárias constantes abordagens e técnicas para que se possa compreender melhor o mecanismo das lesões teciduais e suas respectivas repercussões sistêmicas, sobretudo na fase ativa da doença. Assim, o melhor entendimento dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos nas doenças autoimunes, em particular no LES, poderá gerar novas perspectivas de tratamento com a finalidade de permitir intervenção na ativação de determinadas vias do processo inflamatório com o objetivo de cada vez mais melhorar a qualidade de vida dos pacientes.

6 REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K; LICHTMAN, A. H; PILLAI, S. Doenças causadas por respostas imunológicas: hipersensibilidade e auto-imunidade. In: ABBAS, A. K; LICHTMAN, A. H; PILLAI, S. *Imunologia Celular e Molecular*. Rio de Janeiro, Ed. Elsevier, 2008, p. 419-439.

ARINGER, M., et al. Serum interleukin-15 is elevated in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology*, Londres, v. 40, p. 876-881, 2001.

BALLAS, Z. K. T helper subsets: Differentiation and role in disease. **UpToDate**. 2014. Disponível em: < <http://www.uptodate.com/online>>. Acesso em: 13/10/2014.

BASSO, A. S; CHEROUTRE, H; MUCIDA, D. More stories on Th17 cells. *Cell Research*, Shanghai, v. 19, p. 399-411, 2009.

BATTEN, M; GHILARDI, N. The biology and therapeutic potencial of interleukin 27. *J Mol Med*, Berlim, v. 85, p. 661-672, 2007.

BEADILING, C; SLIFKA, M. K. Regulation of innate and adaptive immune responses by the related cytokines IL-12, IL-23, and IL-27. *Arh. Immunol. Ther. Exp*, Basel, v. 54, p. 15-24, 2006.

BONILLA, F. A; TEPAS, E. The adaptive cellular immune response. **UpToDate**. 2014. Disponível em: < <http://www.uptodate.com/online>>. Acesso em: 10/06/2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas do Lúpus Eritematoso Sistêmico, 2013. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/sas/2013/prt0100_07_02_2013.html, acesso em março 2016.

CHAN, R. W. Y., et al. Imbalance of Th1/Th2 transcription factors in patients with lupus nephritis. *Oxford University Press, Rheumatology*, London, v. 45, p. 951-957, 2006.

CHEN, Z; O'SHEA, J. J. Th17 cells: a new fate for differentiating helper T cells. *Immunol Res*, Cham, v. 41, p. 87-102, 2008.

CHAUDHRY, et al. CD4+ Regulatory T cells control Th17 responses in a Stat3-dependent manner. *Science*, Washington DC, v. 326, p. 986, 2009

Crow, K.M. Lúpus Eritematoso Sistêmico. In AUSIELLO, D; GOLDMAN, L. *Cecil Medicina*. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. p. 2326-2338.

DINESH, R. K.; et. *al.* CD8+ Tregs in Lupus, Autoimmunity, and Beyond. *Autoimmunity Reviews*, Los Angeles, v. 9, p. 560-568, 2010.

FINKELMAN, F. D.; KATONA, I. M.; MOSSMANN, T. R.; COFFMAN, R. L. IFN- γ regulates the isotypes of Ig secreted during in vivo humoral immune responses. *J Immunol*, Rockville, v. 140, p. 1022-27, 1988.

GITELMAN, M. S. K.; MILLER, M. L. Lúpus Eritematoso Sistêmico. In: NELSON. *Tratado de Pediatria*. Rio de Janeiro, Ed. Elsevier, 2009.

HEINE, G., et al. A shift in the Th1/Th2 ratio accompanies the clinical remission of systemic lupus erythematosus in patients with end-stage renal disease. *Nephrol Dial Transplant*, Hamburgo, v. 17, p. 1790-1794, 2002.

HIROTA, K.; MARTIN, B.; VELDHOFEN, M. Development, regulation and functional capacities of Th17 cells. *Semin. Immunopathol*, Berlim, v. 32, p. 3-16, 2010.

KORN, T., et al. IL-17 and Th17 cells. *Annu. Rev. Immunol*, v. 27, p. 485-517, 2009.

KURTS, C. Th17 cells: a third subset of CD4+ T effector involved in organ-specific autoimmunity. *Nephrol. Dial. Transplant*, Hamburgo, v. 23, p. 816-819, 2008.

LI, T., et al. Low Level of Serum Interleukin 27 in Patients With Systemic Lupus Erythematosus. *Journal of Investigative Medicine*, Berlim, v. 58, 2010.

LIN, Y.; SLIGHT, S. R.; KHADER, S. A. Th17 cytokines and vaccine-induced immunity. Springer-Verlag, *Semin. Immunopathol*, Berlim, v. 32, p. 79-90, 2010.

LOCKSLEY, R. M.; SCOTT, P. Helper T-cell subsets in mouse leishmaniasis induction expansion and effector function. *Immunol Today*, São Francisco, v. 12, p. 58-61, 1991.

LUBBERTS, E. Th17 cytokines and arthritis. *Semin Immunopathol*, Berlim, v. 32, p. 43-53, 2010.

CLNNES, I. B.; ROMAIN, P. L. Role of cytokines in rheumatic diseases. **UpToDate**. 2014. Disponível em: <<http://www.uptodate.com/online>>. Acesso em: 15/10/2014.

MCLNNES, B. I.; TEPAS, E. Role of cytokines in the immune system. **UpToDate**. 2014. Disponível em: <<http://www.uptodate.com/online>>. Acesso em: 01/03/2014.

MITCHISON, N. A.; SCHUHBAUER, D.; MULLER, B. Natural and induced regulation of Th1/Th2 balance. *Springer Semin Immunopathol*, Berlim, v. 21, p. 199-210, 1999.

MITSUTERO, A., et. *al.* Th1/Th2 balance of peripheral T helper cells in systemic lupus erythematosus. *American College of Rheumatology*, Atlanta, v. 42, n. 6, p. 1644-1648, 1999.

Neto,E,F,B; Bonfá,E. Lúpus Eritematoso Sistêmico. In: LOPES, AC. *Tratado de Clínica Médica*. São Paulo: Roca, 2009. p. 1513.

O'DWYER, M. J., et al. The human response to infection is associated with distinct patterns of interleukin 23 and interleukin 27 expression. *Intensive Care Med*,Berlim, v. 34, p. 683-691,2008.

PERNIS, A. B. Th17 cells in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Journal of Internal Medicine*, Nova York, v. 265, p. 644-652,2009.

RAÍ, B. A. S. C. Systemic lupus erythematosus(SLE). *Internet Journal of Dental Science*, Sugar Land, v. 6, n. 2,2009.

RANG, H., et al. Hormônios locais, inflamação e reações imunológicas.*Farmacologia*. Rio de Janeiro,Ed. Elsevier, 2007, p. 202-225

ROMANI, L.; MENCACCI, U.; GROHMANN, S.; MOCCI, S.; MOSCI, P.; PUCETTI, P.; BISTONI, F. Neutralizing antibody to interleukin-4 induces systemic protection and T helper type 1-associated immunity in murine candidiasis. *J. Exp. Med.*, Birmingham,v.179, p. 19–25, 1992.

RONCO, P.; FORMAN, J. P. Mechanisms of imune injury of the glomerulus. **UpToDate**. 2014. Disponível em: <<http://www.uptodate.com/online>>. Acesso em: 08/09/2014

SALGAME, P.; ABRAMS, J. S.; CLAYBERGER, C.; GOLDSTEIN, H.; CONVIT, J.; MODLIN, R. L.; BLOOM, B. R. Differing lymphokine profiles of functional subsets of human CD4 and CD8 T-cell clones. *Science*, Washington ,v. 54, p. 279–82, 1991.

SANJABI, S; ZENEWICZ, L,A; KAMANAKA, M; FLAVELL, R,A. Anti- and Pro-inflammatory Roles of TGF- β , IL-10, and IL-22 In Immunity and Autoimmunity. 2009;05(29): 447-53. PubMed; PMID 2755239.

SCHUR, P. H.; GLADMAN, D. D. Overview of the clinical manifestations of systemic lupus erythematosus in adults. 2011. Disponível em: <<http://www.uptodate.com/contents/overview-of-the-clinical-manifestations-of-systemic-lupus-erythematosus-in-adults>>, acesso em: março 2016.

SPOLSKI, R.; LEONARD, W. J. Beyond IL-17/Th17. *Eur. J. Immunol*, Bethesda, v. 39, p. 634-675, 2009.

TANAKA, Y., et. al. Association of the interferon- γ receptor variant (Val14Met) with systemic lúpus erythematosus. Springer-Verlag. *Immunogenetics*, Berlim,v. 49, p. 266-271, 1999.

VILAR, M. J.; SATO, E. I. Estimating the incidence of systemic lupus erythematosus in a tropical region (Natal, Brazil). *Lupus*, Bethesda v.11, n. 8, p. 528- 32,2002.

YANG, J., et al. Th17 and natural Treg cell population dynamics in systemic lúpus erythematosus. *American College of Rheumatology*, Bethesda ,v. 60, p. 1472-1483, 2009.