



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *Strictu sensu***  
**MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**



**PERFIL DO ESTRESSE OXIDATIVO NA LESÃO RENAL DE  
PACIENTES COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO**

**GISELLE KATIANE BONFIM BACELAR DE SOUZA**

**MANAUS  
2012**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *Strictu sensu*  
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**GISELLE KATIANE BONFIM BACELAR DE SOUZA**

**PERFIL DO ESTRESSE OXIDATIVO NA LESÃO RENAL DE  
PACIENTES COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Amazonas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre na área de concentração “Promoção da Saúde na Amazônia” e linha de pesquisa “Diagnóstico Epidemiológico, Clínico e/ou Laboratorial”.

**Orientador:** Prof. Dr. Émerson Silva Lima

**Coorientador:** Prof. Dr. Domingos Sávio Nunes de Lima

**MANAUS  
2012**

**GISELLE KATIANE BONFIM BACELAR DE SOUZA**

**PERFIL DO ESTRESSE OXIDATIVO NA LESÃO RENAL DE  
PACIENTES COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Amazonas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre na área de concentração “Promoção da Saúde na Amazônia” e linha de pesquisa “Diagnóstico Epidemiológico, Clínico e/ou Laboratorial”.

**Aprovado em 09 de Novembro de 2012.**

**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. Émerson Silva Lima (Presidente)  
Universidade Federal do Amazonas

Prof. Dr. Luiz Fernando Passos (Membro Interno)  
Universidade Federal do Amazonas

Prof. Dra. Kátia Luz Torres (Membro Externo)  
Fundação Centro de Controle de Oncologia do Estado do Amazonas.

*Dedicatória*

*Aos maiores amores de minha vida: meus pais – meus exemplos de vida – meu amado esposo – minha cara-metade – e meu filho – meu legado mais valioso.*

## Agradecimentos

A **Deus**, por guiar meus caminhos e me abençoar com mais esta vitória.

Aos meus pais, **Bomfim e Rosa**, por terem me proporcionado tudo que necessitei para alcançar todas as vitórias em minha vida.

Ao meu esposo, **Rafael**, pelo seu amor e por permanecer firme ao meu lado nos momentos mais difíceis.

Ao meu filho, **Vinícius**, por ser a materialização de tudo que há de melhor em mim.

Ao **Dr. Émerson Lima e Dr. Domingos Sávio**, pelas orientações valiosas, paciência, apoio e por acreditarem em meu potencial.

Ao **Antônio Luiz Boechat**, pela importante orientação na realização das análises estatísticas deste trabalho.

Aos **docentes** do Mestrado em Ciências da Saúde, pelos conhecimentos transmitidos.

Às bancas examinadoras de qualificação e defesa, compostas pelos Drs. **Luiz Fernando Passos Kátia Luz Torres, Jaidione Malcon e Antônio Luiz Boechat**, pela colaboração com sugestões valiosas que enriqueceram este trabalho.

Aos **professores, funcionários, técnicos e colegas doutorandos, mestrandos e alunos de iniciação científica** da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, pelo

*apoio e colaboração imprescindível para a realização das análises laboratoriais.*

*Aos **diretores, preceptores, residentes, internos e funcionários** do Ambulatório Araújo Lima e do Hospital Universitário Getúlio Vargas, por todo suporte e apoio na seleção de pacientes.*

*À **direção, farmacêutico-bioquímicos, técnicos e bolsistas** do Laboratório do Hospital Universitário Getúlio Vargas, pelo apoio na coleta do material biológico para a execução das análises deste trabalho.*

*Aos **pacientes** do Hospital Universitário Getúlio Vargas e **alunos** do curso de Farmácia, pela doação voluntária de seu material biológico, permitindo assim a concretização deste projeto.*

*Aos meus **colegas de trabalho**, pela compreensão e apoio.*

*À **Secretaria Municipal de Saúde – SEMSA da Prefeitura de Manaus**, por acreditar e investir na qualificação de seus servidores e, especialmente por todo apoio dado a mim em mais esta jornada.*

*Ao **INSTITUTO NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE PROCESSOS REDOX EM BIOMEDICINA - INCT-Redoxoma** por todo investimento financeiro dedicado a este projeto.*

*A todos que de alguma forma contribuíram com o sucesso deste trabalho.*

**Muito obrigada.**

## RESUMO

O Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é uma doença autoimune do tecido conjuntivo, com etiopatogenia ainda não totalmente compreendida. Dentre as manifestações clínicas mais importantes do LES encontra-se a nefrite lúpica (NL) caracterizada como grave fator de risco de morbimortalidade, que durante os períodos de exacerbação ocorre a produção de autoanticorpos e deposição de imunocomplexos na região dos glomérulos, favorecendo a produção de espécies reativas do oxigênio que possivelmente agem como mediadores do dano glomerular. Para melhor avaliar o perfil do estresse oxidativo na lesão renal de pacientes com LES, foram selecionados 93 pacientes, com idade entre 15 e 49 anos, distribuídos entre os grupos: lúpus controle (n = 30), nefrite lúpica (n = 31), lúpus ativo e sem lesão renal (n = 21) e sem lúpus (n = 11), para realização de um estudo transversal, cujas amostras de sangue coletadas foram submetidas às dosagens hematológica (hemograma completo), bioquímica (ureia, creatinina, ácido úrico, proteínas totais e albumina), imunológica (complemento C3 e C4) e de marcadores de estresse oxidativo (superóxido desmutase (SOD), catalase (CAT), glutatona peroxidase (GPx), glutatona redutase (GR), tióis totais (SH), malondialdeído (MDA), estado oxidante total (TOS), capacidade antioxidante total (TAC), índice de estresse oxidativo (IEO) e alantoína). A atividade da GPx apresentou-se aumentada no LES controle, a atividade da GR apresentou-se aumentada no LES ativo sem lesão renal, a concentração de SH apresentou-se diminuída na NL e no LES ativo sem lesão renal, a concentração de MDA apresentou-se elevada no LES ativo sem lesão renal, os níveis de TOS apresentaram-se diminuídos na NL, os níveis de TAC apresentaram-se aumentados na NL, a determinação do IEO apresentou-se diminuída na NL e os níveis de alantoína apresentaram-se aumentados nos pacientes com LES (controle e em atividade). SLEDAI se correlacionou positivamente com GR e MDA e negativamente com GPx, TOS, IEO e SH. Prednisona se correlacionou positivamente com GR e negativamente com TOS, IEO e SH. Ureia se correlacionou positivamente com GR e alantoína e negativamente com SH. Creatinina se correlacionou positivamente com TAC e alantoína e negativamente com TOS, IEO e SH. Proteínas Totais se correlacionaram positivamente com TOS, IEO, SH e MDA e negativamente com TAC e alantoína. Albumina se correlacionou positivamente com GPx, TOS, IEO e SH e negativamente com alantoína. Ácido úrico se correlacionou positivamente com alantoína e negativamente com SH. C3 se correlacionou positivamente com SH e negativamente com GR. Pacientes com lúpus eritematoso sistêmico, independente do órgão-alvo e em qualquer grau da atividade da doença apresentaram alteração do estresse oxidativo, possivelmente devido a um elevado consumo de antioxidantes endógenos e reduzida atividade de antioxidantes enzimáticos. Novos estudos poderão aprofundar o conhecimento sobre os possíveis benefícios da inclusão de antioxidantes no protocolo de tratamento desta doença.

**Palavras-chave:** lúpus eritematoso sistêmico; nefrite lúpica; estresse oxidativo; antioxidantes; capacidade antioxidante total; peroxidação lipídica; alantoína; tióis totais.

## ABSTRACT

Systemic Lupus Erythematosus (SLE) is an autoimmune disease of connective tissue, with etiology and pathogenesis still not fully understood. Among the most important clinical manifestations of SLE is the lupus nephritis (LN), characterized as a serious risk factor for morbidity and mortality, which during the periods of exacerbation occurs the production of autoantibodies and immune complex deposition in glomeruli, favoring the production of reactive oxygen species, which may act as mediators of glomerular damage. To better evaluate the profile of oxidative stress in renal injury in patients with SLE, 93 patients were selected, aged between 15 and 49 years, distributed between the groups: control lupus (n = 30), lupus nephritis (n = 31), and active lupus without kidney injury (n = 21) and without lupus (n = 11), to carry out a cross-sectional study whose blood samples collected were subjected to hematologic (complete hemogram), biochemistry (urea, creatinine, uric acid, total protein and albumin), immunological (complement C3 and C4) and oxidative stress markers (superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), total thiol (SH), malondialdehyde (MDA), total oxidant status (TOS), total antioxidant capacity (TAC), index oxidative stress (IEO) and allantoin) dosages. The GPx activity showed increased in SLE control, GR activity showed increased in active SLE without renal injury, the SH concentration showed decreased in NL and active SLE without renal injury, the concentration of MDA showed elevated in active SLE without renal injury, TOS levels showed decreased in the NL, the TAC levels showed increased in the NL, the IEO determination showed decreased in NL and allantoin levels showed increased in patients with SLE (control and activity). SLEDAI score showed positively correlated with GR and negatively with GPx and MDA, TOS, IEO and SH. Prednisone showed positively correlated with GR and negatively with TOS, IEO and SH. Urea showed positively correlated with GR and allantoin and negatively with SH. Creatinine showed positively correlated with TAC and allantoin and negatively with TOS, IEO and SH. Total proteins showed positively correlated with TOS, IEO, SH and negatively with MDA and TAC and allantoin. Albumin showed positively correlated with GPx, TOS, and IEO SH and negatively with allantoin. Uric acid showed positively correlated with allantoin and negatively with SH. C3 showed positively correlated with SH and negatively with GR. SLE patients, regardless of the target organ and in any degree of disease activity had alterations in oxidative stress, possibly due to a high consumption of endogenous antioxidants and reduced antioxidant enzyme activity. Further studies may deepen the knowledge about the possible benefits of antioxidants inclusion in the treatment protocol of this disease.

**Keywords:** systemic lupus erythematosus; lupus nephritis; oxidative stress; antioxidants; total antioxidant capacity; lipid peroxidation; allantoin; total thiol.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b>	Redução tetravalente do oxigênio molecular (O <sub>2</sub> ) até a formação da água .....	30
<b>Figura 2</b>	Fontes e respostas celulares às Espécies Reativas do Oxigênio (ROS) ...	32
<b>Figura 3</b>	Fluxo de Procedimentos para avaliação do perfil de estresse oxidativo em pacientes participantes do estudo .....	44
<b>Figura 4</b>	Gráficos de análise de variância entre a atividade da GPx nos diferentes grupos de estudo. Valores significativos: * $p < 0,05$ , ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ .....	62
<b>Figura 5</b>	Gráficos de análise de variância entre as dosagens de GR nos diferentes grupos de estudo. Valores significativos: * $p < 0,05$ .....	64
<b>Figura 6</b>	Gráficos de análise de variância entre as dosagens de TOS nos diferentes grupos de estudo. Valores significativos: * $p < 0,05$ , ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ .....	65
<b>Figura 7</b>	Gráficos de análise de variância entre as dosagens de TAC nos diferentes grupos de estudo. Valores significativos: * $p < 0,05$ , ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ .....	67
<b>Figura 8</b>	Gráficos de análise de variância entre as dosagens de IEO nos diferentes grupos de estudo. Valores significativos: * $p < 0,05$ , ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ .....	68
<b>Figura 9</b>	Gráficos de análise de variância entre as dosagens de Tióis Totais nos diferentes grupos de estudo. Valores significativos: * $p < 0,05$ , ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ .....	70
<b>Figura 10</b>	Gráficos de análise de variância entre as dosagens de Alantoína nos diferentes grupos de estudo. Valores significativos: * $p < 0,05$ , ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ .....	71
<b>Figura 11</b>	Gráficos de análise de variância entre as dosagens de MDA nos diferentes grupos de estudo. Valores significativos: * $p < 0,05$ , ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ .....	73
<b>Figura 12</b>	Gráficos de Dispersão (análise de correlação de Spearman) entre as dosagens de GPx e o SLEDAI ( $r = 0.294$ e $p = 0,007$ ). e as dosagens de Albumina ( $r = 0.298$ e $p = 0,007$ ) .....	75

<b>Figura 13</b>	Gráficos de Dispersão (análise de correlação de Spearman) entre as dosagens de GR e o SLEDAI ( $r = 0,224$ e $p = 0,043$ ) as concentrações de Prednisona ( $r = 0,2854$ e $p = 0,016$ ), as dosagens de Ureia ( $r = 0,289$ e $p = 0,008$ ) e C3 ( $r = -0,289$ e $p = 0,009$ ) .....	76
<b>Figura 14</b>	Gráficos de Dispersão (análise de correlação de Spearman) entre as dosagens de TOS e o SLEDAI ( $r = 0,391$ e $p < 0,001$ ), a concentração de Prednisona ( $r = -0,484$ e $p < 0,001$ ) e as dosagens de Creatinina ( $r = -0,222$ e $p = 0,045$ ), Proteínas Totais ( $r = 0,275$ e $p = 0,018$ ) e Albumina ( $r = 0,378$ e $p = 0,003$ ) .....	77
<b>Figura 15</b>	Gráficos de Dispersão (análise de correlação de Spearman) entre as dosagens de TAC e as dosagens de Creatinina ( $r = 0,400$ e $p = 0,004$ ) e Proteínas Totais ( $r = -0,504$ e $p < 0,001$ ) .....	78
<b>Figura 16</b>	Gráficos de Dispersão (análise de correlação de Spearman) entre as determinações de IEO e o SLEDAI ( $r = -0,325$ e $p = 0,003$ ), as concentrações de Prednisona ( $r = -0,395$ e $p = 0,004$ ), as dosagens de Creatinina ( $r = -0,429$ e $p = 0,002$ ), Proteínas Totais ( $r = 0,260$ e $p < 0,001$ ) e Albumina ( $r = 0,298$ e $p = 0,007$ ) .....	79
<b>Figura 17</b>	Gráficos de Dispersão (análise de correlação de Spearman) entre as dosagens de Tióis Totais e o SLEDAI ( $r = -0,730$ e $p < 0,001$ ), as concentrações de Prednisona ( $r = -0,642$ e $p < 0,001$ ), as dosagens séricas de Ureia ( $r = -0,316$ e $p = 0,004$ ), Creatinina ( $r = -0,569$ e $p < 0,001$ ), Proteínas Totais ( $r = 0,454$ e $p < 0,001$ ), Albumina ( $r = 0,592$ e $p < 0,001$ ) Ácido Úrico ( $r = -0,255$ e $p = 0,010$ ) e C3 ( $r = 0,426$ e $p < 0,001$ ) .....	80
<b>Figura 18</b>	Gráficos de Dispersão (análise de correlação de Spearman) entre as dosagens de Alantoína e as dosagens de Ureia ( $r = 0,330$ e $p = 0,003$ ), Creatinina ( $r = 0,257$ e $p = 0,020$ ), Proteínas Totais ( $r = -0,244$ e $p = 0,027$ ), Albumina ( $r = -0,314$ e $p = 0,004$ ) e Ácido Úrico ( $r = 0,280$ e $p = 0,001$ ) .....	81
<b>Figura 19</b>	Gráficos de Dispersão (análise de correlação de Spearman) entre as dosagens de MDA e o SLEDAI ( $r = -0,226$ e $p = 0,041$ ) e as dosagens de Proteínas Totais ( $r = 0,343$ e $p = 0,002$ ) .....	82

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

<b>Quadro 1</b>	Comparativo entre as Classificações para o Lúpus Renal propostas pela OMS (1995) e ISN/RPS (2004) .....	25
<b>Quadro 2</b>	Espécies Reativas do Oxigênio de Interesse Biológico .....	29
<b>Quadro 3</b>	Solução Conservante utilizada para análise de estresse oxidativo .....	48
<b>Quadro 4</b>	Especificações dos kits para Dosagens Bioquímicas .....	49
<b>Tabela 1</b>	Características Clínicas dos Pacientes dos Grupos Controle, Nefrite Lúpica, Lúpus Ativo e Sem Lúpus .....	58
<b>Quadro 5</b>	Grupos de Tratamentos para o LES conforme agressividade .....	59
<b>Tabela 2</b>	Dosagens Laboratoriais dos Pacientes dos Grupos Controle, Nefrite Lúpica, Lúpus Ativo e Sem Lúpus .....	59
<b>Tabela 3</b>	Dosagens de Marcadores de Estresse Oxidativo em Pacientes com e sem LES, com LES com e sem Atividade Lúpica .....	60
<b>Tabela 4</b>	Dosagens de Marcadores de Estresse Oxidativo em Pacientes dos Grupos Controle, Nefrite Lúpica, Lúpus Ativo e Sem Lúpus .....	61
<b>Tabela 5</b>	Correlação dos Marcadores de Estresse Oxidativo com os Parâmetros Clínicos e Laboratoriais dos Pacientes dos Grupos Controle, Lúpus Ativo e Nefrite Lúpica .....	74

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

<b>μL</b>	Microlitro
<b>μmol</b>	Micromol
<b><sup>1</sup>O<sub>2</sub></b>	Oxigênio Singlete
<b>4-HNE</b>	4-Hidroxinonenal
<b>ABTS</b>	Ácido 2,2'-Azino-Bis[3-Etilbenzotiazolino-6-Sulfônico]
<b>ACR</b>	American College of Rheumatology
<b>anti-dsDNA</b>	Anticorpo contra DNA de Dupla Hélice
<b>anti-La/SSB</b>	Anticorpo contra uma proteína RNA-obrigatória
<b>anti-P</b>	Anticorpo contra Proteínas Ribosomais (P0, P1 e P2)
<b>anti-RNP</b>	Anticorpo contra ribonucleoproteína nuclear
<b>anti-Ro/SSA</b>	Anticorpo contra Complexo de Ribonucleoproteína
<b>anti-Sm</b>	Anticorpo contra proteína Smith
<b>AVC</b>	Acidente Vascular Cerebral
<b>BHT</b>	Butil-Hidroxitolueno
<b>BILAG</b>	Índice de Avaliação do Lúpus do Grupo das Ilhas Britânicas
<b>C3</b>	Complemento C3
<b>C4</b>	Complemento C4
<b>CAT</b>	Catalase
<b>CEP</b>	Comitê de Ética em Pesquisa
<b>c-GPx</b>	Glutathiona Peroxidase Citosólica
<b>CH50</b>	Complemento Hemolítico Total
<b>Cu<sup>+</sup></b>	Íon Cobre
<b>Cu/Zn-SOD</b>	Superóxido Desmutase – Cobre – Zinco
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>DFO</b>	Desferroxamina
<b>DP</b>	Desvio Padrão
<b>DRC</b>	Doença Renal Crônica
<b>DTNB</b>	Ácido 5,5'-Ditiobis-2-Nitrobenzóico
<b>ECG</b>	Eletroencefalograma
<b>ECLAM</b>	Consenso Europeu para Medida da Atividade do Lúpus
<b>Ec-SOD</b>	Superóxido Desmutase – Extracelular

<b>EO</b>	Estresse Oxidativo
<b>FAN</b>	Fator Antinuclear
<b>Fe<sup>++</sup></b>	Íon Ferroso
<b>GI-GPx</b>	Glutationa Peroxidase Gastrointestinal
<b>GPx</b>	Glutationa Peroxidase
<b>GPx-PH</b>	Fosfolípídeo Hidroperóxido Glutationa Peroxidase
<b>GR</b>	Glutationa Redutase
<b>GSH</b>	Glutationa Reduzida
<b>GSSG</b>	Glutationa Oxidada
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Água Molecular
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de Hidrogênio
<b>HClO</b>	Ácido Hipocloroso
<b>HEp-2</b>	Human Epidermoid Cancer Cells
<b>HO<sup>·</sup></b>	Radical Hidroxila
<b>HPLC</b>	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
<b>HUGV</b>	Hospital Universitário Getúlio Vargas
<b>IEO</b>	Índice de Estresse Oxidativo
<b>IFI</b>	Imunofluorescência Indireta
<b>IgG</b>	Imunoglobulina G
<b>INT</b>	2-(4-Iodofenil)-3-(4-Nitrofenol)-5-Feniltetrazolium
<b>ISN</b>	Sociedade Internacional de Nefrologia
<b>K<sub>4</sub>EDTA</b>	Ácido Etilendiamino Tetra-Acetato de Tetrapotásio
<b>LA</b>	Lúpus Ativo
<b>LDL-ox</b>	Lipoproteína de Baixa Densidade Oxidada
<b>LES</b>	Lúpus Eritematoso Sistêmico
<b>LFA</b>	Lupus Foundation of America
<b>M</b>	Concentração Molar ou Média Aritimética
<b>MDA</b>	Malondialdeído
<b>mM</b>	Milimolar
<b>MMF</b>	Micofenolato de Mofentil
<b>Mn-SOD</b>	Superóxido Desmutase – Manganês
<b>n</b>	Número de pacientes
<b>N</b>	Concentração Normal
<b>NaCl</b>	Cloreto de Sódio
<b>NADP<sup>+</sup></b>	Nicotinamida-Adenina-Dinucleotídeo-Fosfato

<b>NADPH</b>	Nicotinamida-Adenina-Dinucleotídeo-Fosfato Reduzida
<b>NL</b>	Nefrite Lúpica
<b>O<sub>2</sub></b>	Oxigênio Molecular
<b>O<sub>2</sub><sup>•-</sup></b>	Ânion Radical Superóxido
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>PAAC</b>	Pesquisa de Anticorpos contra Antígenos Celulares
<b>PCR</b>	Proteína C Reativa
<b>p-GPx</b>	Glutathiona Peroxidase Plasmática
<b>PMSF</b>	Phenylmethanesulfonylfluoride
<b>R</b>	Coefficiente de Correlação
<b>RO<sup>•</sup></b>	Radical Alcoxila
<b>ROO<sup>•</sup></b>	Radical Peroxilia
<b>ROOH</b>	Hidroperóxido Orgânico
<b>ROS</b>	Espécies Reativas do Oxigênio
<b>rpm</b>	Rotações por minuto
<b>RPS</b>	Sociedade de Patologia Renal
<b>S</b>	Sem Lúpus
<b>SAF</b>	Síndrome do Anticorpo Antifosfolípideo
<b>SLA</b>	Sem Lúpus Ativo
<b>SLAM</b>	Medida da Atividade do Lúpus Sistêmico
<b>SLEDAI</b>	Índice de Atividade da Doença no Lúpus Eritematoso Sistêmico
<b>SNC</b>	Sistema Nervoso Central
<b>SOD</b>	Superóxido Dismutase
<b>TAC</b>	Capacidade Antioxidante Total
<b>TBA</b>	Ácido Tiobarbitúrico
<b>TEP</b>	Tromboembolismo Pulmonar
<b>TOS</b>	Estado Oxidante Total
<b>TVP</b>	Trombose Venosa Profunda
<b>UFAM</b>	Universidade Federal do Amazonas
<b>U/L</b>	Unidade Internacional por Litro
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>VHS</b>	Velocidade de Hemossedimentação
<b>XO</b>	Xantina Oxidase
<b>ηm</b>	Nanômetro

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>17</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>19</b>
<b>2.1 Lúpus Eritematoso Sistêmico .....</b>	<b>19</b>
2.1.1 Diagnóstico Clínico e Laboratorial .....	20
2.1.2 Avaliação do Índice de Atividade da Doença .....	21
2.1.3 Manifestações Clínicas .....	22
<b>2.2 Acometimento Renal no Lúpus – Nefrite Lúpica .....</b>	<b>24</b>
<b>2.3 Estresse Oxidativo .....</b>	<b>28</b>
2.3.1 Sistemas Antioxidantes, Oxidantes e Marcadores do Estresse Oxidativo ...	31
<b>2.4 Estresse Oxidativo no Lúpus e na Nefrite Lúpica .....</b>	<b>35</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>39</b>
<b>3.1 Objetivo Geral .....</b>	<b>39</b>
<b>3.2 Objetivos Específicos .....</b>	<b>39</b>
<b>4. METODOLOGIA .....</b>	<b>40</b>
<b>4.1 Modelo de Estudo .....</b>	<b>40</b>
<b>4.2 Universo de Estudo .....</b>	<b>40</b>
4.2.1 População de Estudo .....	40
4.2.2 Participantes .....	40
4.2.3 Amostragem .....	41
4.2.4 Critérios de Elegibilidade .....	41
4.2.4.1 Critérios de Inclusão .....	41
4.2.4.2 Critérios de Exclusão .....	42
<b>4.3 Informações Éticas .....</b>	<b>43</b>
<b>4.4 Fluxo de Procedimentos .....</b>	<b>44</b>
<b>4.5 Detalhamento dos Procedimentos .....</b>	<b>45</b>
4.5.1 Coleta de Informações .....	46
4.5.2 Preparação das Amostras Clínicas .....	46
4.5.2.1 Separação do Soro .....	46
4.5.2.2 Separação do Plasma .....	47
4.5.2.3 Lavagem de Concentrado de Hemácias .....	47
4.5.2.4 Processamento do Sangue Total .....	47
4.5.3 Análise das Amostras Clínicas .....	48
4.5.3.1 Determinação do Perfil Hematológico .....	48
4.5.3.2 Determinação do Perfil Renal .....	48
4.5.3.3 Dosagem de Complemento .....	50

4.5.3.4 Dosagem do Malondialdeído (MDA) .....	50
4.5.3.5 Dosagem de Alantoína .....	51
4.5.3.6 Dosagem de Tióis Totais .....	51
4.5.3.7 Dosagem da Capacidade Antioxidante Total (TAC) .....	52
4.5.3.8 Dosagem do Estado Oxidante Total (TOS) .....	53
4.5.3.9 Determinação do Índice de Estresse Oxidativo (IEO) .....	53
4.5.3.10 Dosagem da Atividade da Enzima Superóxido Dismutase (SOD) ..	54
4.5.3.11 Dosagem da Atividade da Enzima Catalase (CAT) .....	54
4.5.3.12 Dosagem da Atividade da Enzima Glutationa Peroxidase (GPx) ..	55
4.5.3.13 Dosagem da Atividade da Enzima Glutationa Redutase (GR) .....	55
<b>4.6 Análises Estatísticas dos Resultados .....</b>	<b>56</b>
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>57</b>
<b>5.1 Caracterização dos Grupos de Estudo .....</b>	<b>57</b>
<b>5.2 Análises das Dosagens de Marcadores de Estresse Oxidativo .....</b>	<b>60</b>
5.2.1 Estudo da Atividade da Enzima Glutationa Peroxidase (GPx) .....	62
5.2.2 Estudo da Atividade da Enzima Glutationa Redutase (GR) .....	63
5.2.3 Estudo do Estado Oxidante Total (TOS) .....	64
5.2.4 Estudo da Capacidade Antioxidante Total (TAC) .....	66
5.2.5 Estudo da Determinação do Índice de Estresse Oxidativo (IEO) .....	68
5.2.6 Estudo das Dosagens de Tióis Totais .....	69
5.2.7 Estudo das Dosagens de Alantoína .....	71
5.2.8 Estudo das Dosagens de Malondialdeído (MDA) .....	72
<b>5.3 Correlação entre Marcadores de Estresse Oxidativo e Características Clínicas e Laboratoriais .....</b>	<b>73</b>
5.3.1 Estudo das Correlações da Enzima Glutationa Peroxidase (GPx) .....	75
5.3.2 Estudo das Correlações da Enzima Glutationa Redutase (GR) .....	75
5.3.3 Estudo das Correlações do Estado Oxidante Total (TOS) .....	76
5.3.4 Estudo das Correlações da Capacidade Antioxidante Total (TAC) .....	77
5.3.5 Estudo das Correlações do Índice de Estresse Oxidativo (IEO) .....	78
5.3.6 Estudo das Correlações de Tióis Totais .....	79
5.2.7 Estudo das correlações de Alantoína .....	81
5.2.8 Estudo das Correlações de Malondialdeído (MDA) .....	82
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>83</b>
<b>6.1 Antioxidantes Enzimáticos e Não Enzimáticos .....</b>	<b>83</b>
<b>6.2 Balanço Oxidantes/Antioxidantes Plasmáticos .....</b>	<b>88</b>
<b>6.3 Considerações Finais e Perspectivas Futuras .....</b>	<b>91</b>
<b>7. CONCLUSÕES .....</b>	<b>93</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>94</b>
<b>APÊNDICES .....</b>	<b>108</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>112</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é uma doença inflamatória crônica, de origem autoimune, que apresenta distúrbio multissistêmico do tecido conjuntivo, cujo aparecimento dos sintomas ocorre principalmente em mulheres, entre 15 e 50 anos, a uma razão de 9:1 em relação aos homens. Fora desta faixa etária, tanto na infância quanto na velhice, torna-se menos comum e a relação mulher-homem cai para, em média, 3,5:1 (D'CRUZ et al., 2007; GORDON et al., 2009; OLIVER & SILMAN, 2009).

Trata-se de uma doença de ocorrência mundial, onde ao menos cinco milhões de pessoas em todo o mundo apresentam alguma forma de lúpus, com maior incidência em populações urbanas e prevalência estimada entre 22 e 241 para cada 100.000 habitantes (D'CRUZ et al., 2007; GORDON et al., 2009; LFA, 2011).

De surgimento e evolução imprevisíveis, o LES podem oscilar entre períodos de exacerbação e remissão, associados à variação da gravidade, duração e acometimento, onde o envolvimento renal é muito frequente e apresenta uma significativa importância de morbimortalidade, em virtude do aumento da possibilidade de internação e inevitável progressão para falência renal (CERVERA et al., 2003; LI & ISENBERG, 2006; MELO et al., 2009).

O dano renal causado no LES é provocado pela produção e deposição de imunocomplexos nos glomérulos, principalmente formados por IgG, IgM e IgA, ocasionando a inflamação destes - glomerulonefrite lúpica - e podendo chegar a uma insuficiência renal crônica e até a morte do paciente (RAHMAN & ISENBERG, 2008).

Durante o processo de exacerbação do lúpus, diversos mecanismos são desencadeados em momentos e intensidade variados, dentre eles, a inflamação e o estresse oxidativo, que possivelmente agem sinergicamente culminando em lesão renal (BELLOMO et al., 2008).

Uma das muitas consequências desta associação é a elevação dos níveis de lipoproteína de baixa densidade oxidada (LDL-ox) através da peroxidação lipídica gerada pelas espécies reativas do oxigênio (ROS) produzidas principalmente nos períodos de exacerbação da doença, elevando o risco de doença cardiovascular devido à presença de aterosclerose prematura, principalmente em mulheres na faixa etária de 44 a 50 anos (FROSTEGARD et al., 2005, KURIEN & SCOFIELD, 2006a; WANG et al., 2010).

Considerando o potencial risco de dano celular causado pela elevação do estresse oxidativo durante a atividade lúpica, associado à deposição de imunocomplexos no tecido glomerular oriundos do processo inflamatório instalado, o presente estudo propôs-se a avaliar o grau de participação das ROS, seus produtos de oxi-redução, oxidantes e antioxidantes endógenos específicos em diferentes etapas da doença: remissão e atividade com e sem nefrite, para elucidar a importância das ROS no LES e com isso auxiliar na avaliação e controle de atividade do LES, principalmente no que diz respeito ao dano renal, constituindo uma possível ferramenta de monitoramento dos agravos relacionados ao estresse oxidativo.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Lúpus Eritematoso Sistêmico

Define-se lúpus eritematoso sistêmico como uma patologia crônica do tecido conjuntivo, desencadeada pela associação de vários fatores, principalmente genéticos e ambientais, com acometimento a múltiplos órgãos e manifestação clínica extremamente diversificada. Trata-se de uma doença de cunho autoimune provocada pela perda da tolerância aos autoantígenos e consequente produção de inúmeros anticorpos contra os antígenos nucleares circulantes no meio extracelular, resultantes de grande atividade apoptótica (RUMORE & STEINMAN, 1990; WILLIAMS-JR et al., 2001; BOULÉ, 2004).

De etiologia e patogênese ainda não totalmente compreendidas. Sabe-se que muitos fatores estão envolvidos: (a) genéticos; (b) ambientais e/ou ocupacionais (radiação UV, sílica, metais pesados e pesticidas); (c) hormonais (estrógeno e progesterona) e (d) infecciosos (Epstein-Barr Virus, Citomagalovirus, Herpes Zoster vírus, Parvovírus B19 e retrovírus) (PASSOS, 1997; SOUZA et al., 2010).

Associado a estes fatores observa-se uma atividade apoptótica celular exacerbada em linfócitos, queratinócitos e monócitos, com consequente expressão intensa de autoantígenos nucleares que permite a ligação de anticorpos específicos, gerando desequilíbrio imunológico pela formação de depósitos de imunocomplexos e ativação do sistema complemento, dando início aos processos inflamatórios responsáveis pelas manifestações clínicas presentes no LES (SHMERLING, 2003; SINGH & DUBEY, 2007; CARNEIRO-SAMPAIO et al., 2008, LIPHAUS & KISS, 2010).

Apesar de tratar-se de uma doença de ocorrência mundial, apresenta distribuição heterogênea, onde se observa maior incidência em populações urbanas e não-brancas, sugerindo haver influência de fatores raciais e geográficos para a existência de considerável variabilidade nas taxas de LES. (MOLOKHIA et al., 2003; DANCHENKO et al., 2006; D'CRUZ et al., 2007; PONS-ESTEL et al., 2010).

### 2.1.1 Diagnóstico Clínico e Laboratorial

O diagnóstico do Lúpus Eritematoso Sistêmico utiliza-se dos critérios de classificação estabelecidos pelo *American College of Rheumatology* (ACR), de 1982, revisado em 1997, criados com a finalidade de tornar possível a padronização na identificação de pacientes em estudos clínicos, fundamentando-se na exigência de constatação mínima de ao menos 4 dos 11 critérios descritos, em série ou simultaneamente e em qualquer intervalo da avaliação, para confirmação de resultado positivo para LES, conforme pode ser observado no Anexo 2 (TAN et al., 1982; HOCHBERG, 1997; PETRI, 2005).

Uma ferramenta extremamente útil para auxiliar no diagnóstico é a pesquisa de anticorpos antinucleares pela técnica de imunofluorescência indireta (IFI), historicamente conhecido como fator antinucleico (FAN), atualmente utiliza como substrato as células HEp-2 (human epidermoid cancer cells) e passou a ser denominado de “pesquisa de anticorpos contra antígenos celulares” (PAAC). Trata-se de um exame de rastreamento de autoanticorpos com grande sensibilidade. No entanto, por se tratar de um teste com baixa especificidade devido a uma parcela da população aparentemente hígida ou sem evidências de autoimunidade apresentar positividade para PAAC-IFI em HEp-2, exige obrigatoriamente conhecimento extremamente apurado do clínico para uma interpretação correta dos achados sorológicos (DELLAVANCE et al., 2009).

Para suprir esta deficiência, os laboratórios lançam mão de pesquisas para outros autoanticorpos específicos para o LES (anti-dsDNA, anti-Sm e anti-P ribossomal), além de alguns anticorpos também encontrados em outras doenças autoimunes (anti-RNP, anti-Ro/SSA e anti-La/SSB) com a finalidade de auxiliar na definição do perfil clínico do paciente (KURIEN & SCOFIELD, 2006b; BORBA et al., 2008; DELLAVANCE et al., 2009).

Além do exame clínico apurado, é importante verificar possíveis alterações no hemograma (leucopenia, linfopenia, plaquetopenia e/ou anemia), urina (sedimento urinário alterado), proteína C Reativa (PCR), velocidade de hemossedimentação (VHS), dosagem de frações C3 e C4 do complemento sérico e em alguns casos, ureia, creatinina e albumina, (ACR, 1997; BORBA et al., 2008; DELLAVANCE et al., 2009).

### 2.1.2 Avaliação do Índice de Atividade da Doença

Variabilidade na gravidade, ampla possibilidade de manifestações clínicas e sorológicas, curso imprevisivelmente remitente-recorrente e potencialmente debilitante e fatal, são características marcantes do LES. A complexidade do quadro clínico no LES pode ser aumentada pela presença simultânea de manifestações da doença em órgãos vitais, danos crônicos, efeitos colaterais das drogas e comorbidade, principalmente infecções, que levam à necessidade de identificar a variação na atividade da doença, severidade e danos, para que seja possível o ajuste do tratamento em função do curso da doença (GRIFFITHS et al., 2005).

Muitos métodos têm sido amplamente utilizados para este propósito, onde os mais importantes são: Índice de Atividade da Doença no Lúpus Eritematoso Sistêmico (SLEDAI), introduzido em 1985; Índice de Avaliação do Lúpus do Grupo das Ilhas Britânicas (BILAG), publicado em 1988; Medida da Atividade do Lúpus Sistêmico (SLAM), de 1989 e Consenso

Europeu para Medida da Atividade do Lúpus (ECLAM), de 1992 (SYMMONS et al., 1988; LIANG, 1989; BOMBARDIER et al., 1992; VITALI et al., 1992).

O SLEDAI é o instrumento mais antigo, com alta confiabilidade e sensibilidade, com 24 critérios clínicos e laboratoriais específicos, agrupados em nove sistemas: nervoso central (SNC), dermatológico, renal, musculoesquelético, imunológico, vascular, constitucional, seroso e hematológico (Anexo 3). Apresenta três variações: (a) SLEDAI 2000 ou SLEDAI-2K, para melhor registrar a persistência da atividade da doença; (b) SELINA-SLEDAI, para avaliar a concentração de estrogênio; (c) MEX-SLEDAI, uma versão simplificada e mais barata, sem a necessidade de testes imunológicos (GLADMAN, 2002; RAMSEY-GOLDMAN & ISENBERG, 2003; GRIFFITHS et al., 2005).

Seu *score* pode variar de 0 a 105, onde valores acima de 5 indicam necessidade de intervenção terapêutica em mais de 50% dos casos. Esta pontuação pode classificar a atividade como: (a) Sem atividade (SLEDAI = 0); (b) Leve (SLEDAI = 1-5); (c) Moderada (SLEDAI = 6-10); (d) Alta (SLEDAI = 11-19) ou (e) Muito Alta (SLEDAI  $\geq$  20). Tanto o agravamento quanto a melhora são constatados com oscilação do SLEDAI de 3 pontos, enquanto que remissão é verificada quando o SLEDAI é 0 (GLADMAN, 2002; GRIFFITHS et al., 2005).

### 2.1.3 Manifestações Clínicas

O quadro clínico do lúpus comumente inicia com manifestações totalmente inespecíficas: fadiga, linfadenopatia, febre, perda de peso, anorexia; de difícil diagnóstico e exigindo uma intensa investigação para descartar outras possibilidades, como malignidade e infecções (GORDON et al., 2009; SMITH & GORDON, 2010).

O lúpus cutâneo decorre habitualmente da exposição aos raios UV em mais de 80% dos casos. Pode apresentar-se de forma: (a) aguda, eritema malar ou placas eritematosas

difusas; (b) subaguda, placas descamativas psoriasiformes ou anulares ou (c) crônica, lúpus discoide e hipertrófico (PETRI, 2006; WALLING & SONTHEIMER, 2009).

As manifestações musculoesqueléticas importantes são: artrite, tendinite, bursite, mialgia difusa e miosite (em cerca de 10% casos). A necrose avascular dos ossos é uma das principais causas de morbidade, acometendo principalmente tornozelo, quadril, joelho e punhos (PETRI, 2006; GORDON et al., 2009).

A manifestação cardíaca mais comum é a pericardite (cerca de 25% dos pacientes), seguida da miocardite ou vasculopatia coronariana (GORDON et al., 2009; SMITH & GORDON, 2010).

Alterações hematológicas, presentes em cerca de 70% dos pacientes, incluem a anemia normocítica e normocrômica, hemolítica autoimune, associada à reticulocitose, ou hemolítica microangiopática. Além disto, observa-se o teste de Coombs direto positivo, leucopenia, plaquetopenia e linfopenia (OLIVEIRA, 2007a; OLIVEIRA, 2007b; OLIVEIRA, 2007c).

Manifestações neurológicas são diversas, podendo comprometer o sistema nervoso central e/ou periférico, que variam de comprometimento cognitivo até psicose, desordens de movimento, miastenia grave e outros, totalizando 19 síndromes (ACR, 1999; PETRI, 2006).

Nos pulmões, além da pleurisia, observa-se a embolia pulmonar e pneumonite, podendo chegar à fibrose pulmonar e hemorragia ou hipertensão pulmonares (PETRI, 2006).

A manifestação gastrointestinal mais conhecida do LES é ulceração oral (mais de 50% dos pacientes), sendo vasculite entérica a mais séria, devido ao risco de progressão para isquemia e perfuração (SMITH & GORDON, 2010).

Dentre as manifestações mais graves e importantes do LES, cita-se a nefrite lúpica, cuja evolução pode culminar em doença renal crônica e está associada a muitas complicações, como por exemplo, risco de elevação de dano cardiovascular (CUNHA et al., 2008).

Apesar do grande número de órgãos acometidos e das graves manifestações clínicas, o número de mortes prematuras felizmente tem diminuído. Atualmente, pacientes recém-diagnosticados experimentam uma taxa de sobrevivência superior a 90% em 5 anos, e 80% acima de 10 anos, graças ao aprimoramento constante tanto do diagnóstico quanto do tratamento, tornando-os mais precoces, modernos e eficientes (ROSNER et al., 1982; TRAGER & WARD, 2001; ABU-SHAKRA, 2008; PONS-ESTEL et al., 2010).

## **2.2 Acometimento Renal no Lúpus – Nefrite Lúpica**

O acometimento renal no LES continua sendo um fator de risco significativo de morbidade e mortalidade, ocorrendo em cerca de 40 a 60% dos pacientes ao longo da evolução da doença, onde afro caribenhos e certos grupos hispânicos apresentam maior frequência de NL que asiáticos e caucasianos, fator que pode, em parte, explicar o maior índice de mortalidade destas populações (BORCHERS et al., 2004; GORDON et al., 2009; MELO et al., 2009; MORONI et al., 2009; SMITH & GORDON, 2010).

Dos pacientes com NL, cerca de 10% evoluem para insuficiência renal, principalmente aqueles acometidos com a forma proliferativa da doença, e cerca de 40% apresentam hipertensão arterial como a manifestação mais frequente (LAHITA, 2004).

Com relação à faixa etária, a doença renal é mais frequente, mais grave e com prognóstico desfavorável quando o LES inicia na infância e em jovens adultos. Já no LES de início tardio, após 50 anos de idade, a NL mostra-se mais branda, com menor frequência e severidade na manifestação em órgãos vitais, ou com nenhuma diferença significativa em comparação aos adultos, exceto a hipertensão arterial, que é mais frequente principalmente quando associada à NL Classe IV (MOK, 2005; MEINÃO & SATO, 2008; ROVENSKÝ & TUCHYNOVÁ, 2008; ORTEGA et al. 2010).

Na comparação entre sexos, estudos relatam que homens têm NL com maior gravidade e mais frequentemente que mulheres, tendendo a evoluir para insuficiência renal quando esta NL é de Classe IV (SELIGMAN et al., 2002; MOK, 2005; MAK et al., 2007).

A classificação histológica da NL foi criada pela a Organização Mundial de Saúde (OMS) em 1974, revisada em 1982 e em 1995, com seis padrões principais de envolvimento renal. Em 2004, a Sociedade Internacional de Nefrologia (ISN), juntamente com a Sociedade de Patologia Renal (RPS), sugeriu uma nova classificação com uma abordagem mais quantitativa que incorpora a distinção entre lesões ativas e crônicas inativas, como descrito no Quadro 1 (APPEL & VALERI, 1994; WEENING et al., 2004; GORDON et al., 2009).

Quadro 1 – Comparativo entre as Classificações para o Lúpus Renal propostas pela OMS (1995) e ISN/RPS (2004).

<b>Classificação OMS (1995)</b>	<b>Classificação ISN/RPS (2004)</b>
<b>Classe I</b> - Glomérulo Normal	<b>Classe I</b> – Glomerulonefrite Mesangial Mínima
<b>Classe II</b> – Alterações Mesangiais Puras (Mesangiopatia)	<b>Classe II</b> – Glomerulonefrite Mesangial Proliferativa
<b>Classe III</b> – Glomerulonefrite Proliferativa Segmentar Focal (Associada com Hipertensão Leve ou Moderadas Alterações Mesangiais)	<b>Classe III</b> - Glomerulonefrite Proliferativa Focal <b>III (A)</b> - Lesões Ativas <b>III (A / C)</b> - Lesões Ativas e Crônicas <b>III (C)</b> - Lesões Crônicas
<b>Classe IV</b> – Glomerulonefrite Proliferativa Difusa (Mesangial Severa, Proliferação Endocapilar ou Mesangiocapilar e/ou Extensos Depósitos Subendoteliais)	<b>Classe IV</b> - Glomerulonefrite Proliferativa Difusa <b>IV-S (A)</b> - Lesões Ativas: Segmentar Difusa <b>IV-G (A)</b> - Lesões Ativas: Global Difusa <b>IV-S (A/C)</b> - Lesões Ativas e Crônicas: Segmentar Difusa <b>IV-G (A/C)</b> - Lesões Ativas e Crônicas: Global Difusa <b>IV-S (C)</b> - Lesões Crônicas: Segmentar Difusa <b>IV-G (C)</b> - Lesões Crônicas: Global Difusa
<b>Classe V</b> - Glomerulonefrite Membranosa Difusa	<b>Classe V</b> - Glomerulonefrite Membranosa
<b>Classe VI</b> – Glomerulonefrite Esclerosante Avançada	<b>Classe VI</b> - Glomerulonefrite Esclerosante Avançada

Fonte: Weening et al. (2004); Gordon et al. (2009).

A relação entre os achados histológicos e curso clínico da NL tem sido bem aceita. Pacientes com NL Classes II e V geralmente têm um prognóstico renal melhor, com declínio muito lento da função renal. Em contraste, a NL Classes III e IV estão associadas a um curso mais agressivo, com deterioração da função renal e geralmente de pior prognóstico (APPEL & VALERI, 1994; MOK, 2005; ORTEGA et al., 2010).

O diagnóstico da atividade da NL depende da análise do sedimento urinário, para identificação de hematúria, proteinúria e cilindrúria, dosagem de albumina e creatinina séricas e o depuração da creatinina, para avaliar a taxa de filtração glomerular e identificar possível dano da função renal (PETRI, 2006; GORDON et al., 2009; SMITH & GORDON, 2010).

Alterações dos indicadores laboratoriais geralmente apresentam estreita relação com a evolução do dano renal na NL, onde elevados níveis de creatinina associados à síndrome nefrótica recente, hipertensão arterial persistente, baixo hematócrito, baixas taxas de complemento e persistência do quadro durante o primeiro ano de tratamento, exigem maior atenção ao prognóstico (ESDAILE et al., 1994; KORBET et al., 2000; MOK, 2005).

A biópsia renal pode ser necessária em casos onde o sedimento urinário está anormal (com cilindros hemáticos, tubulares, granulosos e/ou mistos, e/ou proteinúria maior que 0,5 g / 24 h) seguindo o padrão histológico estabelecido pela ISN/RPS. No entanto, por se tratar de um procedimento invasivo e não isento de complicações, sua necessidade deve ser avaliada e realizada apenas em pacientes nos quais a clínica justifique (WEENING et al., 2004; DOOLEY, 2007; GORDON et al., 2009; MORONI et al., 2009).

A pesquisa de certos biomarcadores imunológicos é útil para avaliar a atividade do LES, como ocorre com anti-dsDNA e complementos C3, C4 e CH50 que estão associados à doença renal, por geralmente estarem alterados em pacientes com NL em curso. Outro anticorpo recentemente associado à NL é o anti-C1q que, apesar de não ser específico do LES acredita-se que quando presente neste tipo de paciente torna-se mais específico e

sensível do que os biomarcadores clássicos para prever surtos de NL, principalmente Classe III e IV (MARTO et al., 2005; PETRI, 2006; MORONI et al., 2009; MATRAT et al., 2011).

O tratamento da NL ocorre em duas fases: (a) terapia de indução, com aplicação de vigoroso imunossupressor num período de curta duração; (b) terapia de manutenção, menos intensiva, mas utilizada por um período maior para manter a remissão alcançada, onde pode ser utilizada ou não a mesma droga citotóxica (HOUSSIAU et al., 2003; MOROVIĆ-VERGLES & SALAMON, 2009; BOMBACK & APPEL, 2010).

O tratamento de indução consagrado é a associação de ciclofosfamida intravenosa com glicocorticoides, por seis meses. No entanto, apesar de ser muito eficiente, traz consigo efeitos colaterais significativos, onde uma alternativa seria a redução da dose e do intervalo de aplicação da ciclofosfamida, ou a substituição desta pelo micofenolato de mofetil (MMF), por ser menos tóxico (MOK, 2005; SIDIROPOULOS et al., 2005; D'CRUZ et al., 2007; BORBA et al., 2008; MOROVIĆ-VERGLES & SALAMON, 2009; BOMBACK & APPEL, 2010).

Durante a terapia de manutenção, os corticoides são associados ao MMF ou à azatioprina para reduzir o risco de crise nefrítica, sendo que o MMF mostra-se mais eficiente na prevenção de recaídas de surtos e na preservação da função renal (MOK, 2005; MOROVIĆ-VERGLES & SALAMON, 2009; BOMBACK & APPEL, 2010).

Paralelamente ao tratamento específico da nefropatia, realiza-se o controle rigoroso da hipertensão arterial, obesidade e dislipidemia, além da restrição ao uso de anti-inflamatórios não-esteroidais e outras drogas potencialmente nefrotóxicas (BORBA et al., 2008).

Recentemente, novos agentes terapêuticos (drogas imunobiológicas) voltados para o mecanismo patogénico da doença têm sido desenvolvidos, com resultados promissores (maior eficácia e menor toxicidade). Destacam-se como potenciais drogas para o tratamento da NL o rituximabe, o epratuzumabe, o belimumabe, o abetimo, o abatacepte e o ataccepte (D'CRUZ et al., 2007; BORBA et al., 2008; MOROVIĆ-VERGLES & SALAMON, 2009).

Apesar dos avanços terapêuticos, o tratamento da NL permanece um problema clínico desafiante, onde muitos dos pacientes evoluem inevitavelmente para doença renal terminal, restando-lhes apenas a diálise ou o transplante. No caso do transplante, apesar bem tolerado pelo paciente e a recidiva da nefrite ser quase nula, há a necessidade de no mínimo de um ano de remissão do LES para que seja possível sua indicação (FAURSCHOU et al., 2006; BORBA et al., 2008; MOROVIĆ-VERGLES; SALAMON, 2009; ORTEGA et al., 2010).

### **2.3 Estresse Oxidativo**

O estresse oxidativo (EO) ocorre devido a um desequilíbrio entre substâncias pró-oxidantes e antioxidantes em favor das pró-oxidantes, trazendo como possível resultado acúmulo de espécies reativas no organismo e consequente dano direcionado às biomoléculas (SIES, 1985; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2010).

Espécies reativas do oxigênio (ROS) é um termo coletivo utilizado para identificar produtos derivados do metabolismo do oxigênio molecular ( $O_2$ ), sendo estes radicais ou não-radicais, como demonstrado no Quadro 2, onde pode-se observar uma alta reatividade (seletiva ou não), instabilidade eletrônica e/ou meia-vida curta dessas moléculas (DEVASAGAYAM et al., 2004; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2010).

A oxidação é parte fundamental do metabolismo de organismos aeróbicos, portanto, as ROS estão envolvidas em diversos processos importantes, incluindo produção de energia, fagocitose contra infecções e células cancerígenas, apoptose de células defeituosas, regulação do crescimento celular, desintoxicação por xenobióticos, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas. No entanto, o aumento na quantidade destas espécies no organismo, pode causar danos a praticamente todas as moléculas biológicas: DNA, RNA, colesterol,

lipídios, carboidratos, proteínas e enzimas, podendo inclusive resultar em morte celular (DEVASAGAYAM et al., 2004; BARREIROS et al., 2006; ZHANG et al, 2010).

Quadro 2 - Espécies Reativas do Oxigênio de Interesse Biológico

<b>Espécies Reativas do Oxigênio (ROS)</b>	<b>Símbolo</b>	<b>Grupo</b>	<b>Meia-vida</b>	<b>Observação</b>
Ânion Radical Superóxido	$O_2^{\bullet -}$	Radicalar	$10^{-6}s$	Gerado na mitocôndria, em sistema cardiovascular e outros.
Radical Hidroxila	$HO^{\bullet}$	Radicalar	$10^{-9}s$	Altamente reativo, gerado durante sobrecarga de ferro no organismo.
Peróxido de Hidrogênio	$H_2O_2$	Não-Radicalar	Estável	Formado no corpo através de grande número de reações, gerando radicais potentes, como o $HO^{\bullet}$ .
Radical Peroxila	$ROO^{\bullet}$	Radicalar	Segundos	Reativo, formado a partir de lipídeos, proteínas DNA e açúcares, durante o dano oxidativo.
Radical Alcoxila	$RO^{\bullet}$	Radicalar	$10^{-9}s$	Participa principalmente na peroxidação lipídica
Ácido Hipocloroso	$HClO$	Não-Radicalar	Estável	Poderoso oxidante produzido pela mieloperoxidase durante a fagocitose.
Hidroperóxido Orgânico	$ROOH$	Não-Radicalar	Estável	Reage com íons metálicos formando espécies reativas.
Oxigênio Singlete	$^1O_2$	Não-Radicalar	$10^{-6}s$	Altamente reativo, formado por fotossensibilização e reações químicas.
Ozônio	$O_3$	Não-Radicalar	Segundos	Presente como poluente atmosférico, pode reagir com várias moléculas produzindo $^1O_2$ .

Fonte: Adaptado de Devasagaya et al. (2004) e Halliwell & Gutteridge (2010).

A produção de ROS a partir do  $O_2^{\bullet -}$  é catalisada endogenamente por enzimas, como as flavoenzimas (xantina oxidase, citocromo P450 oxidase, lipoxigenase, e cicloxigenase), as peroxidases e a NADPH oxidase, durante a ativação máxima de células fagocitárias (neutrófilos, macrófagos, monócitos e eosinófilos), e principalmente nas cristas mitocondriais, pelo vazamento de elétrons da cadeia transportadora de elétrons durante a respiração celular. Já as fontes exógenas mais importantes são: radiação, poluição atmosférica, tabagismo, infecção ou injúria (ROVER-JÚNIOR et al., 2001; ZHAO et al., 2007; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2010; GIL, 2010; KELLEY et al., 2010).

Como pode ser visto na Figura 1, o  $O_2$  sofre a redução de um elétron, formando  $O_2^{\cdot-}$ , e a partir deste, ocorrem reduções sucessivas com a formação de intermediários reativos, como o  $H_2O_2$  e  $HO^{\cdot}$ , que podem ou não serem neutralizados por sistemas antioxidantes (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; BARREIROS et al., 2006).

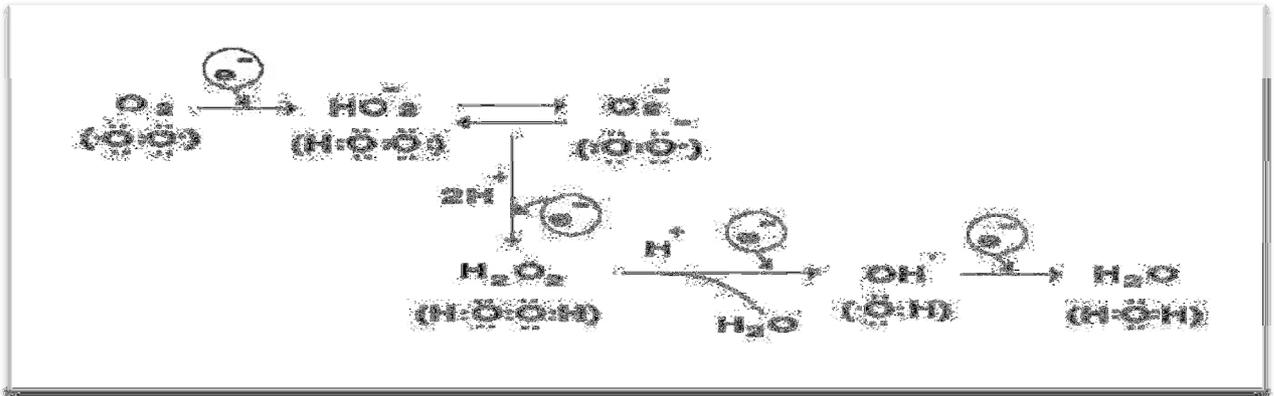


Figura 1 – Redução tetraivalente do oxigênio molecular ( $O_2$ ) até a formação da água.  
Fonte: Ferreira & Matsubara (1997).

O  $O_2^{\cdot-}$  é o precursor de todas as demais ROS, através de sua habilidade de liberar o íon ferroso ( $Fe^{++}$ ) das proteínas de armazenamento (ferritina) e de ferro-sulfoproteínas (aconitase), além de participar da geração de produtos com forte atividade oxidativa: ácido hipocloroso, peróxido de hidrogênio e peroxinitrito. No entanto, de modo positivo, ele age em processos antioxidantes, como por exemplo, na oxidação do grupo sulfidril ( $-SH$ ) no processo de ativação e desativação de enzimas que contenham metionina (BABIOR, 1997; BARREIROS et al., 2006, ZHAO et al., 2007; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2010).

O  $H_2O_2$  é gerado a partir da dismutação do  $O_2^{\cdot-}$  pelas enzimas oxidases ou pela  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos. No entanto, sua principal fonte é o interior das mitocôndrias, pela ação da superóxido dismutase (SOD), sendo liberado para o meio citoplasmático quando a eliminação deste for pouco eficiente pelas enzimas catalase (CAT) e glutatona peroxidases (GPx) (BARREIROS et al., 2006, HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2010).

Trata-se de uma molécula que tem meia-vida longa e praticamente inócua isoladamente, mas é capaz de atravessar as camadas lipídicas das membranas celulares e nucleares, tornando-se potencialmente tóxica às células caso reaja com metais de transição ( $\text{Cu}^+$  e  $\text{Fe}^{++}$ ), com a formação do radical hidroxila ( $\text{HO}^*$ ) (BENZIE, 1996; FERREIRA & MATSUBARA, 1997; BARREIROS et al., 2006, HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2010).

O radical hidroxila ( $\text{OH}^*$ ) é a ROS mais deletéria ao organismo, de meia-vida muito curta, não-seletiva e altamente reativa em virtude de possuir uma estrutura muito instável, o que dificulta *in vivo* sua detecção e sequestro por antioxidantes, deixando apenas duas alternativas de controlar sua presença no organismo: impedindo sua formação e/ou reparando os danos provocados por ela (BENZIE, 1996, FERREIRA & MATSUBARA, 1997; SILVEIRA, 2004; BARREIROS et al., 2006).

### 2.3.1 Sistemas Antioxidantes, Oxidantes e Marcadores do Estresse Oxidativo

Para combater os danos causados pelo excesso de ROS, os organismos aeróbicos desenvolveram um sofisticado sistema (enzimático e não enzimático) de defesa antioxidante, que é qualquer substância capaz de eliminar, prevenir ou remover o dano oxidativo da molécula alvo e com isto, manter a homeostase fisiológica, como está esquematizado na Figura 2 (BARBOSA et al., 2010; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2010).

As ações antioxidantes podem ser alcançadas por meio de diferentes mecanismos. No entanto, os antioxidantes atuam basicamente em dois principais níveis de proteção: (a) defesa contra as espécies reativas e contra a sua formação e (b) reparo das lesões causadas pelas espécies reativas. Onde o seu desempenho depende de alguns fatores determinantes: (a) o tipo de espécies reativas a ser formado, (b) o sítio e o mecanismo de formação das espécies

reativas, (c) a dose ideal para obtenção de proteção eficiente contra as espécies reativas e (d) o alvo do dano oxidativo (BARBOSA et al., 2010; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2010).

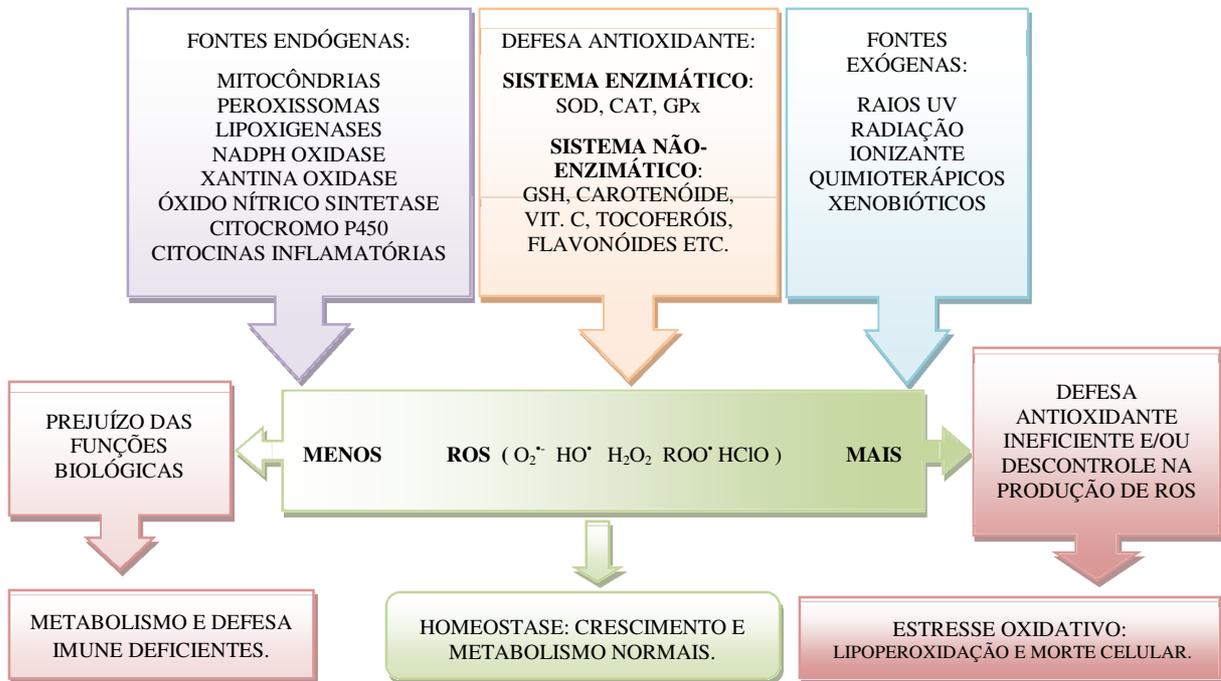


Figura 2 – Fontes e respostas celulares às Espécies Reativas do Oxigênio (ROS)

Fonte: Adaptado de Finkel & Holbrook (2000); Vasconcelos et al. (2007).

Usualmente, esse sistema é dividido em enzimático (macromoléculas) e não enzimático (micromoléculas), neste último caso, constituído por grande variedade de substâncias, que podem ter origem endógena ou através da dieta (BARREIROS et al., 2006; BARBOSA et al., 2010).

O sistema enzimático tem como finalidade primordial degradar as espécies reativas que são geradas como resultado do metabolismo intracelular na mitocôndria e peroxissomas. As principais enzimas deste sistema são: a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx) (FINKEL; HOLBROOK, 2000; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2010).

A SOD é uma enzima que provoca dismutação do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio ( $2\text{O}_2^{\cdot-} + 2\text{H}^+ \xrightarrow{\text{SOD}} \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$ ), com uma alta eficiência de conversão deste radical em oxidantes não-radicalares (JONES, 2008).

Esta enzima corresponde a uma família com diferentes grupos prostéticos em sua composição. Nos sistemas eucariontes existem três formas de SOD: (a) SOD-Cobre-Zinco (Cu/Zn-SOD) ou SOD-1, presente no citoplasma e núcleo; (b) SOD-Manganês (Mn-SOD) ou SOD-2, localizada na mitocôndria de órgãos como: rim, fígado e miocárdio; e (c) SOD-Extracelular (Ec-SOD) ou SOD-3, semelhante à SOD-1, mas atua especificamente nos espaços extracelulares e fluidos, tais como plasma e linfa (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; BABIOR, 1997, 2000; CECARINI et al., 2007).

A CAT é uma hemeproteína citoplasmática tetramérica, particularmente ativa nos peroxomas do fígado, pulmão, rim e eritrócitos. Catalisa a redução de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em  $\text{H}_2\text{O}$ , em dependência de NADPH, de maneira semelhante à GPx ( $2\text{H}_2\text{O}_2 \xrightarrow{\text{CAT}} 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ ) (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; CECARINI et al., 2007; JONES, 2008).

A GPx é uma enzima antioxidante que atua no citosol e nas mitocôndrias ( $\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{GSH} \xrightarrow{\text{GPx}} 2\text{H}_2\text{O} + \text{GSSG}$ ). A família de GPx é composta por quatro seleno-proteínas caracterizadas por diferenças na localização e estrutura molecular: glutathione peroxidase citosólica (c-GPx), glutathione peroxidase plasmática (p-GPx), glutathione peroxidase gastrointestinal (GI-GPx), e a fosfolípídeo hidroperóxido glutathione peroxidase (GPx-PH) (CECARINI et al., 2007).

A GPx remove peróxido de hidrogênio pela oxidação da glutathione reduzida (GSH) em glutathione oxidada (GSSG). Em situações em que o sistema de oxi-redução está íntegro, haverá recuperação da GSH pela ação da glutathione redutase (GR) que atua em parceria com a GPx ( $\text{GSSG} + \text{NADPH} + \text{H}^+ \xrightarrow{\text{GR}} 2\text{GSH} + \text{NADP}^+$ ). Entretanto, em condição de

excesso de agentes oxidantes e/ou deficiência do sistema protetor, haverá desequilíbrio entre o consumo de GSH e a produção de GSSG, o que caracteriza o EO (CECARINI et al., 2007).

A xantina oxidase (XO), uma fonte importante de ROS glomerular, é formada irreversivelmente durante injúria celular pela ação de proteases e oxidantes sobre a xantina desidrogenase. Trata-se de uma enzima amplamente distribuída, que promove a formação de algumas ROS durante a oxidação da hipoxantina à xantina e de xantina em ácido úrico (BABIOR, 2000; GAERTNER et al., 2002; HARRISON, 2004).

O ácido úrico, resultante da ação da XO, é reconhecido como um antioxidante efetivo nos sistemas biológicos, capaz de proteger o DNA e lipídios contra ROS, onde em meio aquoso atua facilmente tanto reagindo com o HO<sup>•</sup>, ROO<sup>•</sup>, quanto quelando metais de transição. Durante este processo, o urato é então convertido em alantoína. (BARREIROS et al., 2006; VASCONCELOS, 2007).

A alantoína atualmente tem sido muito empregada como marcador da atividade oxidante em diversas patologias, como por exemplo, insuficiência renal, artrite reumatoide, síndrome de Down, doença de Wilson e doença pulmonar crônica neonatal, por ser estável, não sofrer ação enzimática e de possível detecção tanto através do método colorimétrico quanto por HPLC (YARDIM-AKAYDIN, 2004; MURATSUBAKI et al., 2008).

O MDA é um aldeído de cadeia curta, produto secundário da lipoperoxidação, derivado da deterioração oxidativa de ácidos graxos polinsaturados com mais de duas duplas ligações, tais como ácido linoléico, araquidônico e docosaexanóico, que pode acarretar alterações na estrutura e permeabilidade de membranas celulares, provocando perda da seletividade em trocas iônicas e liberação de conteúdo celular, como por exemplo, enzimas hidrolíticas dos lisossomos, com formação de produtos citotóxicos. Sua quantificação é um parâmetro importante para a avaliação do EO nos sistemas biológicos (BENZIE, 1996, LIMA

& ABDALLA, 2001; VASCONCELOS et al., 2007; ANTUNES, 2008; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2010).

#### **2.4 Estresse Oxidativo no Lúpus e na Nefrite Lúpica**

O LES é caracterizado pela intensa atividade de autoanticorpos contra ácido nucléico, principalmente nos períodos de exacerbação da doença, onde o processo inflamatório está intrinsecamente presente e isto implica na possibilidade da existência de um estado de EO, que possui particular importância quando se trata da nefrite lúpica, devido à grande deposição de imunocomplexos na região dos glomérulos (EVANS, 2000).

Além disso, têm-se demonstrado que esse sistema de defesa antioxidante é constitutivamente carente em pacientes com doenças crônico-degenerativas, especialmente inflamatórias-imunomediadas, onde o EO desempenha um papel crucial como desencadeador do dano tecidual e dissociação de íons de ferro ou compostos que contêm ferro (heme) que podem até mesmo induzir o aparecimento de novas especificidades antigênicas devido à exposição dos anticorpos a estes íons (DIMITROV et al., 2008).

Um recente estudo mostrou que os níveis de indicadores de EO, tais como, produtos de ácido nucléico e oxidação lipídica, não só estão elevados em pacientes com LES em comparação a indivíduos saudáveis, mas também acompanham a oscilação do SLEDAI ao longo da doença, tornando possível a avaliação da sua progressão através dos marcadores de estresse oxidativo e nitrosativo, bem como possibilita o estudo do papel destes marcadores na patogênese do LES (WANG et al., 2010). Além disso, outro estudo demonstrou que as ROS além de apresentarem uma estreita relação com o aumento da gravidade e progressão do lúpus de modo geral também atuam como mediadores da injúria glomerular (FROSTEGARD et al., 2005).

Diversas condições clínicas, especialmente as imunomediadas, têm sido associadas não só com o EO relacionado ao aumento de ROS, mas também com a capacidade antioxidante prejudicada, principalmente em termos de redução dos níveis de GSH e reduzido potencial redox celular, além da oxidação de tióis e formação de peroxinitritos. Com isso, o desequilíbrio no estado redox não só pode ser diretamente responsável pelos danos aos tecidos, como pode promover o desenvolvimento da autoimunidade através do desequilíbrio da tolerância imunológica pela geração de neodeterminantes antigênicos (CRANE & LOW, 2008; FAULK & McINTYRE, 2008; FERNANDEZ & PERL, 2009; PERRICONE et al., 2009).

Estudos longitudinais dos níveis séricos de óxido nítrico associados aos marcadores de atividade tanto do LES de modo geral, quanto da nefrite lúpica proliferativa especificamente, forneceram uma base para o estudo de alvos terapêuticos, como é o caso do MMF, conhecido por induzir a remissão da NL possivelmente através da inibição da transcrição da óxido nítrico sintetase e consequente redução na produção de óxido nítrico (TANG et al., 2005; OATES et al., 2008). Inversamente ao que ocorre com a ciclofosfamida, que apresenta como efeito colateral a produção de radicais livres através do seu metabólito tóxico, a acroleína, com consequente dano aos tecidos renais (SENTHILKUMAR et al., 2006).

As ROS estão envolvidas, inclusive, no aumento da peroxidação lipídica em pacientes com LES, onde seus aldeídos derivados, tais como MDA e 4-Hidroxi nonenal (4-HNE), podem contribuir para a patogênese da doença supostamente pela formação de neoantígenos e pela deposição, à longo prazo, de complexos imunes (WANG et al., 2007).

Um estudo realizado por Alves et al. (2008) demonstrou que o aumento da produção de ânion superóxido pelos neutrófilos de paciente com LES, principalmente naqueles com manifestações clínicas relacionadas à imunocomplexos (ex., nefrite) associadas à

autoanticorpos (ex., anemia hemolítica) poderiam refletir em uma ruptura do equilíbrio redox envolvendo a NADPH oxidase e/ou a SOD, gerando uma superprodução de ROS.

Outros estudos demonstram associação entre atividade inflamatória intensa, estresse oxidativo e lesão renal em modelo animal. Na nefropatia membranosa humana, o citocromo P450 mostrou desempenhar um papel importante na produção significativamente elevada de ROS, através do aumento da disponibilidade do ferro e consequente produção de MDA, além da produção de superóxido através da ativação da NADPH oxidase presente na membrana das células dos glomérulos, danificando sua parede capilar e refletindo na exacerbação da proteinúria (CYBULSKY et al., 2005; LIU et al., 2010; CYBULSKY, 2011).

Em pacientes com dano renal, observa-se um aumento na peroxidação lipídica, associada a uma queda na atividade das enzimas antioxidantes SOD, GPx e CAT presentes tanto nos glomérulos ( em pacientes com glomerulonefrite) quanto na membrana dos eritrócitos (em pacientes com insuficiência renal crônica), além de diminuição da GSH plasmática. Nos pacientes submetidos à hemodiálise, a redução da capacidade antioxidante proporciona de forma mais proeminente a alteração nas propriedades da membrana, o que possivelmente contribui para o desenvolvimento de anemia e doenças cardiovasculares nestes pacientes (DURAK et al., 1994; McGRATH et al., 1995; GAERTNER, et al., 2002).

As alterações no metabolismo dos lipídios em pacientes com LES estão associadas à doença cardiovascular prematura e severa, onde se observa um aumento da concentração de marcadores de peroxidação lipídica além de uma reduzida capacidade antioxidante total (TAC). Os mecanismos que levam a este estado antioxidante prejudicado, ainda não foram esclarecidas e podem estar relacionadas a uma deficiência no sistema antioxidante ou a um excesso de atividade oxidativa (NUTTALL et al., 2003; TURGAY et al., 2007).

Em um estudo realizado por Morgan et al. (2009), foi observado que as concentrações de tióis protéicos tinham sua concentração sérica cronicamente diminuída em pacientes com

LES, enquanto proteínas carboniladas e glicina estavam cronicamente aumentadas. Além de constatar que os níveis séricos de oxidação protéica destes pacientes se correlacionavam com a atividade da doença.

Em outro estudo mais recente, Shah et al. (2012) observou que a severidade do LES está diretamente associada à elevação do estado oxidante total (TOS), com aumento tanto no consumo de GSH quanto na produção de produtos de peroxidação lipídica (MDA), e que estes fatores podem estar relacionados com a modulação da apoptose no LES e desempenhar um papel vital na patogênese desta doença.

## **3. OBJETIVOS**

### **3.1 Objetivo Geral**

Avaliar a associação do estresse oxidativo com a lesão renal de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES).

### **3.2 Objetivos Específicos**

3.2.1 Identificar quais marcadores de estresse oxidativo participam na atividade do LES.

3.2.2 Comparar os níveis de marcadores de estresse oxidativo entre pacientes com e sem LES, bem como pacientes com e sem atividade lúpica.

3.2.3 Avaliar os níveis dos marcadores de estresse oxidativo entre pacientes com e sem atividade renal, subdivididos segundo classificação OMS da lesão renal e tipo de tratamento.

3.2.4 Correlacionar os marcadores de estresse oxidativo com o índice de atividade do LES (SLEDAI), uso de medicamento, tempo de doença, dosagens bioquímica e de complementos C3 e C4.

## **4. METODOLOGIA**

### **4.1 Modelo de Estudo**

Tratou-se de um estudo descritivo, transversal do tipo detecção de caso (screening), no qual amostras biológicas de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico foram submetidas à dosagem de marcadores de estresse oxidativo (mediados pelo ânion radical superóxido).

### **4.2 Universo de Estudo**

#### 4.2.1 População de Estudo

Fizeram parte da pesquisa os pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES), atendidos no setor de Reumatologia do Ambulatório Araújo Lima do Hospital Universitário Getúlio Vargas (HUGV) da cidade de Manaus-AM, que atenderam a no mínimo quatro dos onze critérios de classificação estabelecidos e revisados pela ACR (1997), conforme descrito no Anexo 2. Além destes, foram selecionados para compor um grupo de referência, funcionários e/ou alunos do HUGV e UFAM que não possuíam LES.

#### 4.2.2 Participantes

Todos os pacientes do sexo feminino que, no período de setembro de 2011 a junho de 2012, receberam atendimento regular no setor de Reumatologia do Ambulatório Araújo Lima

do HUGV, na cidade de Manaus-AM, para tratamento de LES com ou sem lesão renal confirmada e que, após abordagem direta pela pesquisadora no horário de funcionamento da instituição, aceitaram o convite para participar do estudo, foram selecionados para compor os grupos estudo: controle (C), com nefrite lúpica (NL) e lúpus ativo sem nefrite lúpica(LA).

Para compor o grupo sem LES (S) foram convidados funcionários e alunos que, no mesmo período, estavam presentes no AAL, HUGV ou na Faculdade de Farmácia da UFAM e apresentavam características de sexo e idade semelhantes aos grupos de estudo anteriores, mas que não possuíam LES.

#### 4.2.3 Amostragem

A população de estudo foi definida por método não-probabilístico, com amostragem por conveniência e consecutiva, onde todos os pacientes, funcionários e/ou alunos presentes no período da pesquisa que se encaixaram nos critérios de inclusão pré-estabelecidos foram selecionados e enquadrados em um dos grupos do estudo.

#### 4.2.4 Critérios de Elegibilidade

##### 4.2.4.1 Critérios de Inclusão

Foram considerados aptos à inclusão todos os pacientes com diagnóstico confirmado para LES, segundo a ACR, do sexo feminino, pós-menarca e idade máxima de 50 anos, que consentiram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE (Apêndice 1 ou 2).

Para uma melhor avaliação do papel do estresse oxidativo (mediado pelo  $O_2^{\bullet-}$ ) no desenvolvimento de lesão renal dos pacientes com LES, a população de estudo foi dividida em três grupos: LES inativo e sem lesão renal (grupo controle - C), LES ativo com nefrite lúpica (grupo NL) e LES ativo sem lesão renal (grupo LA).

O grupo C foi constituído por aqueles indivíduos que não apresentaram atividade lúpica (SLEDAI = 0) por no mínimo um ano e que não apresentaram resultados laboratoriais característicos de lesão renal. O grupo NL foi composto por pacientes que apresentaram LES ativo, com SLEDAI  $\geq 8$ , que desenvolveram nos últimos seis meses anteriores à seleção critérios sugestivos de classificação preferencialmente III ou IV para nefrite, segundo preconizado pela OMS em 1995 (WEENING et al., 2004; GORDON et al., 2009). O grupo LA foi composto por pacientes com LES ativo, com SLEDAI  $\geq 4$ , sem quaisquer manifestações renais.

O instrumento usado para avaliar atividade lúpica foi o *Systemic Lupus Erythematosus Activity Index*, SLEDAI, demonstrado no Anexo 3, que foi aplicado por um médico reumatologista a cada paciente para definição de *score* juntamente com a classificação para o dano renal através da clínica (classificação OMS) ou por biópsia renal (classificação INS/RPS), caso o paciente já tenha sido submetido anteriormente (BOMBARDIER et al., 1992; GLADMAN et al., 2002; WEENING et al., 2004).

#### 4.2.4.2 Critérios de Exclusão

Foram excluídos aqueles pacientes que apresentaram SLEDAI incompatível com o grupo ao qual foram selecionados, aqueles que apresentaram alteração renal de classe VI e alguma doença, estado ou comportamento que influenciasse a produção de ROS: doenças infecciosas, diabetes primária, HIV, doença renal crônica, tabagismo e gravidez. Os pacientes

com hipertensão arterial não foram excluídos dos grupos de estudo, em virtude da inevitável inter-relação clínica com a lesão renal, nem os pacientes com LES que estavam fazendo uso de antioxidantes em virtude da obrigatoriedade destes no protocolo de tratamento, principalmente no caso dos pacientes internados.

Os pacientes que, no momento da abordagem, não estavam em jejum mínimo de 8 horas ou aqueles cujas amostras apresentaram características que pudessem interferir nas análises bioquímicas, como hemólise, contaminação ou alterações de qualquer natureza proveniente de problemas de acondicionamento e transporte, foram convidados a agendar nova coleta.

#### **4.3 Informações Éticas**

O presente estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UFAM para avaliação quanto à adequação ao disposto na Resolução CNS nº196/96 e Complementares, do qual obteve deferimento para realização da pesquisa, assegurando os direitos e deveres aos pacientes, à comunidade e ao Estado, conforme protocolo CAAE nº 0286.0.115.000-11 (Anexo 1).

Apenas após aprovação no CEP, foi dado início à coleta do material biológico necessário, mediante consentimento por escrito da instituição e dos pacientes selecionados ou de seus responsáveis legais (menores de 18 anos) de participação no estudo, conforme Apêndices 1 e 2.

Todos os pacientes selecionados foram atendidos pelos médicos pesquisadores do HUGV e participantes da equipe científica.

#### 4.4 Fluxo de Procedimentos

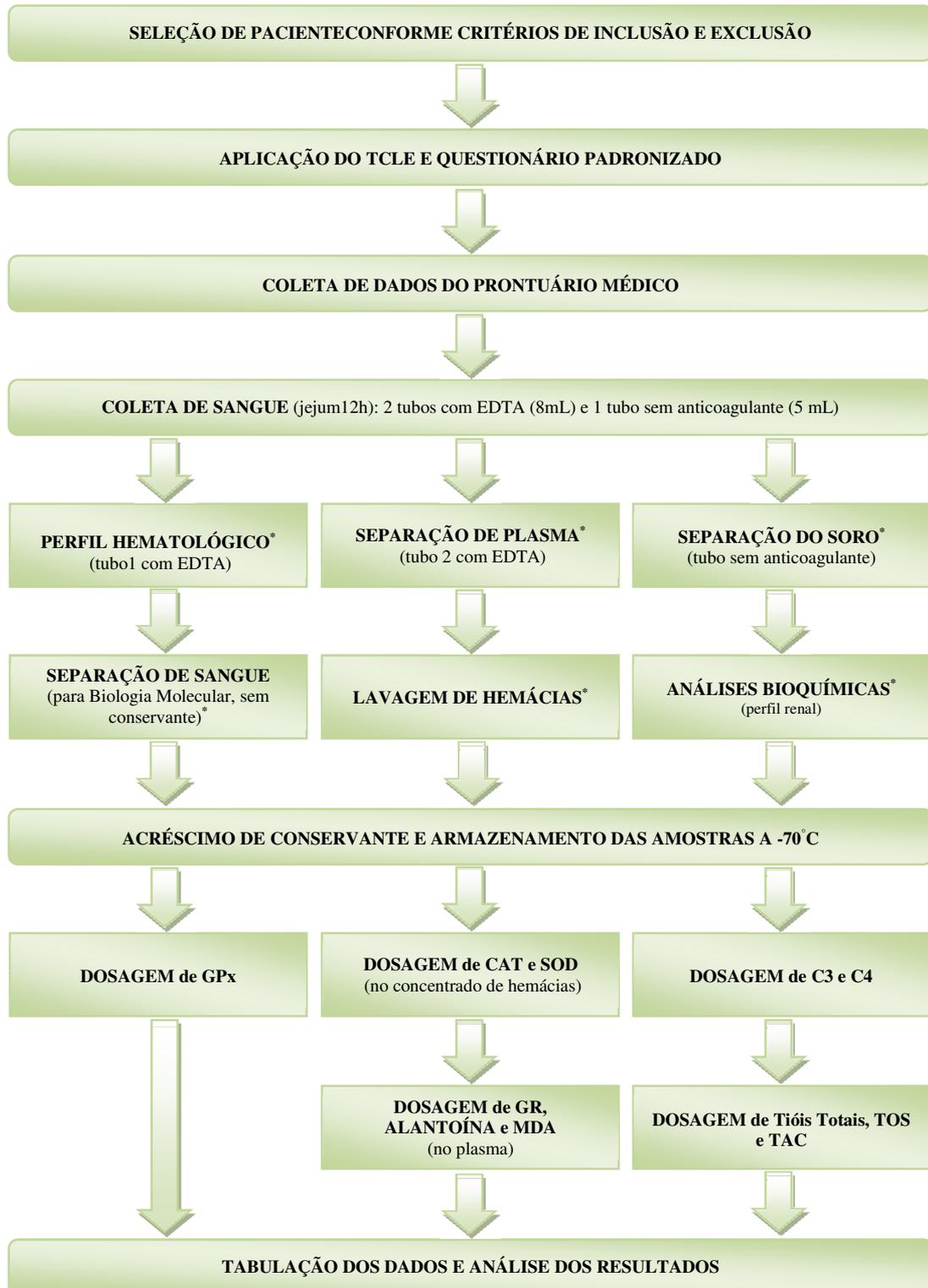


Figura 3 – Fluxo de Procedimentos para avaliação do perfil de estresse oxidativo em pacientes participantes do estudo.

\*Material a ser processado e analisado no dia da coleta impreterivelmente.

#### 4.5 Detalhamento dos Procedimentos

Foi coletado sangue total dos pacientes (em jejum prévio) com material estéril e descartável, por punção venosa cubital, utilizando seringa de 20 ml, totalizando 13 mL de amostra que foi distribuída em 3 tubos: dois tubos contendo K<sub>4</sub>EDTA a 1 g.dL<sup>-1</sup> (4 mL cada), para análise de perfil hematológico e para dosagem da atividade de alguns dos marcadores de estresse oxidativo, e um tubo sem anticoagulante (5 mL), para separação do soro, onde foram realizados alguns dos exames bioquímicos necessários para a determinação do perfil renal, dosagens de complementos C3 e C4, bem como de outros marcadores de estresse oxidativo.

A coleta foi realizada de forma lenta para que não ocorresse a ativação celular por turbulência de fluxo e, em seguida, as amostras foram homogeneizadas de forma igualmente lenta para total distribuição do anticoagulante.

Cada tubo foi identificado com o número de registro recebido no momento da entrevista que antecedeu a coleta, com as iniciais do nome do participante e a data. As amostras biológicas, bem como os formulários preenchidos de acordo com cada paciente, receberam uma identificação arábica em ordem crescente à medida que foram admitidos no estudo.

As amostras coletadas foram acondicionadas em embalagens de transporte com refrigeração e levadas ao laboratório de análise em no máximo 1 hora após a coleta.

Seguindo o procedimento para cada dosagem, as amostras que poderiam ser processadas posteriormente foram separadas em alíquotas suficientes para a sua realização em duplicata, colocadas em microtubos de volume apropriado, acondicionadas em caixas diferenciadas por grupo e armazenadas em freezer à temperatura de 70°C negativos. Já aquelas que exigiam leitura imediata, foram processadas no dia da coleta, sendo armazenado apenas o material restante para possível confirmação (Apêndice 4).

Todas as análises laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Atividade Biológica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UFAM. Com relação às amostras biológicas coletadas, todas foram armazenadas no Laboratório de Atividade Biológica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UFAM, para confirmação dos resultados obtidos, caso necessário, e/ou para a realização de estudos moleculares em pesquisas posteriores, seguindo a presente linha de pesquisa, exclusivamente.

#### 4.5.1 Coleta de Informações

Os indivíduos que concordaram em participar do estudo assinaram o TCLE após o conhecimento dos objetivos e da metodologia da pesquisa. Foi aplicado um questionário (Apêndice 3) para cada participante responder individualmente ou acompanhado do responsável legal, quando fosse o caso, com o intuito de obter informações que auxiliassem na interpretação dos resultados obtidos nas dosagens realizadas. O questionário era composto de 7 itens com perguntas do tipo múltipla escolha, com possibilidade de múltiplas respostas. Cada participante recebeu um código de identificação sequencial, para garantir o caráter confidencial das informações prestadas.

#### 4.5.2 Preparação das Amostras Clínicas

##### 4.5.2.1 Separação do Soro

O tubo sem anticoagulante (soro) foi centrifugados por 10 min a 3500 rpm em centrífuga Nova Técnica. Em seguida, o sobrenadante obtido foi distribuído em microtubos

previamente identificados, foi acrescido 5  $\mu\text{L}$  para cada mililitro de soro de uma solução conservante (Quadro 3), e guardado sob refrigeração negativa de  $70^{\circ}\text{C}$  para posterior análise.

#### 4.5.2.2 Separação do Plasma

Um dos tubos contendo  $\text{K}_4\text{EDTA}$  a  $1 \text{ g.dL}^{-1}$  foi centrifugados por 10 min a 3500 rpm em centrífuga Nova Técnica para separação de plasma. Em seguida, o sobrenadante obtido foi distribuído em microtubos previamente identificados, foi acrescido 5  $\mu\text{L}$  para cada mililitro de plasma de uma solução conservante (Quadro 3), e guardado sob refrigeração negativa de  $70^{\circ}\text{C}$  para posterior análise.

#### 4.5.2.3 Lavagem de Concentrado de Hemácias

Após a retirada do plasma, o sedimento sofreu três lavagens sucessivas com uma solução tampão fosfato a 0,1M e pH 7,4 em centrifugação a 3500 rpm por 10 min em centrífuga Nova Técnica. Em seguida, o sedimento obtido foi distribuído em microtubos previamente identificados, foi acrescido 5  $\mu\text{L}$  de uma solução conservante (Quadro 3) para cada mililitro de concentrado de hemácias, e guardado sob refrigeração negativa de  $70^{\circ}\text{C}$  para posterior análise.

#### 4.5.2.4 Processamento do Sangue Total

No outro tubo contendo  $\text{K}_4\text{EDTA}$  a  $1 \text{ g.dL}^{-1}$  foi realizado o procedimento de determinação do perfil hematológico e, posteriormente, a separação do sangue total em dois microtubos distintos e previamente identificados para dosagem de estresse oxidativo e ensaios

de biologia molecular, onde apenas no microtubo destinado às dosagens de estresse oxidativo foi acrescido 5 µL de uma solução conservante (Quadro 3) para cada mililitro de sangue total. Todas as alíquotas obtidas foram guardadas sob refrigeração negativa de 70°C para posterior análise.

Quadro 3 – Solução Conservante utilizada para análise de estresse oxidativo.

<b>Constituinte</b>	<b>Concentração</b>	<b>Finalidade</b>
Butil-Hidroxitolueno 0,2% (BHT)	1mM	Retarda a oxidação através do impedimento na formação de peróxidos.
Desferroxamina (DFO)	1mM	Quelante de metal
Phenylmethanesulfonylfluoride (PMSF)	1mM	Inibidor de protease
Etanol 96%	-	Veículo

#### 4.5.3 Análise das Amostras Clínicas

##### 4.5.3.1 Determinação do Perfil Hematológico

A análise hematológica completa das amostras coletadas foi realizada por meio do contador automático de células sanguíneas (leucócitos, eritrócitos e plaquetas), modelo KX-21 N da marca SYSMEX, a partir do sangue total conservado com K<sub>4</sub>EDTA, que foi processado no dia da coleta para evitar perda de material por hemólise ou contaminação.

##### 4.5.3.2 Determinação do Perfil Renal

As análises adotadas como parâmetro de avaliação do comprometimento renal, foram:

**a. Clínica:** análise dos registros em prontuário dos pacientes referentes a edema, oligúria e hipertensão arterial;

**b. Laboratorial:** foram coletados os dados do último exame laboratorial registrado no prontuário dos pacientes apenas aqueles referentes à microscopia do sedimento urinário, proteinúria de 24h e dosagem de creatinina sérica, segundo preconizado pela American College of Rheumatology (1997).

As análises nos soros dos pacientes para detecção de ureia, creatinina, proteínas totais, albumina e ácido úrico foram realizadas utilizando-se kits comercializados pela fabricante Labtest Diagnóstica Ltda, acordo com técnica descrita para o aparelho automatizado COBAS Mira Plus<sup>®</sup>. As especificações de cada método, bem como a expressão dos resultados estão descritos no Quadro 4.

Quadro 4 – Especificações dos kits para Dosagens Bioquímicas.

Substância	Metodologia	Resultado
Ácido Úrico Liquiform (Rf. 73)	Enzimático-Trinder	mg/dL
Albumina (Rf. 19)	Verde de Bromocresol	g/dL
Creatinina (Rf. 35)	Reação de Jaffé	mg/dL
Proteínas Totais (Rf. 99)	Biureto	g/dL
Ureia (Rf. 27)	Urease	mg/dL

**c. Biópsia Renal:** foram analisados os prontuários dos pacientes participantes do estudo para identificação de registro de realização de biópsia renal. Este procedimento foi considerado como instrumento de classificação nos grupos de estudo apenas se o paciente já o tivesse realizado, caso contrário, a classificação foi determinada de acordo com a clínica e os exames laboratoriais apresentados no momento da consulta.

#### 4.5.3.3 Dosagem de Complemento

As determinações quantitativas dos Complementos C3 e C4 no soro dos pacientes foram realizadas segundo protocolos de métodos turbidimétricos de ponto final descritos para o aparelho automatizado COBAS Mira Plus<sup>®</sup> e comercializados sob a forma de kits, ambos pelo fabricante In Vitro Diagnóstica Ltda. As concentrações foram expressas em mg/dL.

#### 4.5.3.4 Dosagem do Malondialdeído (MDA)

O malondialdeído (MDA) presente no soro das amostras foi medido através da reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA), para estimar a intensidade da peroxidação lipídica, através da formação de um cromógeno de cor rosa cuja absorção foi lida através de técnica espectrofotométrica, segundo descrito originalmente por Ohkawa et al. (1979).

Para que esta análise fosse possível, primeiramente, procedeu-se o preparo da amostra, onde 3 mL de um complexo de reação composto de TBA 0,76%, ácido clorídrico 0,25N e ácido tricloracético a 10 % foram adicionados em 200 µL de soro e em seguida agitados em vortex. Logo após a agitação, a amostra foi tampada com bolas de gude para impedir a evaporação dos reagentes e incubada a 100°C por 45 minutos. Ao final da incubação, a amostra foi resfriada em banho de gelo por cerca de 5 minutos e centrifugada a 3500 rpm por 10 minutos e, em seguida, procedeu-se a leitura do sobrenadante em absorvância de 535 nm em epectrofotômetro T70 UV/VIS PG Instruments Ltda. Os níveis de MDA total da amostra foram calculados através da razão entre a absorvância da amostra e uma solução padrão de MDA (1,1,3,3-tetrahidroxipropano), multiplicada pela concentração da solução padrão. Os resultados foram expressos em µmol/L.

#### 4.5.3.5 Dosagem de Alantoína

A alantoína é formada a partir da oxidação do ácido úrico pela ação de ROS, e este, por sua vez é obtido no final do processo de conversão da xantina durante o metabolismo das purinas. Sua dosagem no plasma foi obtida seguindo o método colorimétrico descrito por Young & Conway (1942).

A hidrólise em meio alcalino a 100°C da alantoína da amostra deu o início à reação, através do acréscimo de 625 µL de água e 125 µL de hidróxido de sódio 0,5M em 125 µL de plasma, que deu como produto o ácido alantóico. Em seguida, a amostra reagiu com hidrocloreto de fenilhidralazina (125 µL a 23 mM) em meio ácido, pH 2 - 3 a 100°C, produzindo fenilhidrazona que, por sua vez formou um cromóforo, quando reagiu com o ferricianeto de potássio (125 µL a 0,05 M) ainda em meio ácido (375 µL de HCl 11,4N), detectável em espectrofotômetro T70 UV/VIS PG Instruments Ltda em absorvância em  $\lambda$  de 522 nm. A concentração de alantoína no plasma é determinada pela correlação da absorvância da amostra plotada em curva padrão previamente elaborada com soluções de alantoína de 0 a 60 mg/dL.

#### 4.5.3.6 Dosagem de Tióis Totais

Tióis são antioxidantes endógenos eficientes na proteção celular contra os danos induzidos por ROS (ATMACA, 2004). Concentração sérica de tióis totais ou grupos sulfidrilo (-SH) foi dosada segundo método descrito originalmente por Elman (1959), modificado por Hu (1994) e adaptado a um analisador bioquímico automático por Costa et al. (2006).

Uma alíquota de soro (5 µL) foi misturada a 200 µL de tampão Tris-EDTA (0,25 mM de Tris base + 20 mM de EDTA, pH 8,2) que posteriormente reagiu com 2,5 µL de uma

solução a 10mM do ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) em metanol, formando um ânion altamente colorido. Após incubação de 15 minutos à temperatura ambiente, e o resultado foi lido em absorvância de  $\lambda$  de 412 nm, em aparelho automatizado COBAS Mira Plus<sup>®</sup>. A concentração de tióis totais no soro foi calculada usando a GSH como padrão e expressa em mmol/L.

#### 4.5.3.7 Dosagem da Capacidade Antioxidante Total (TAC)

Diversas moléculas endógenas e exógenas agem sinergicamente no processo antioxidante e podem ser medidas no soro (ou plasma) de forma global, denominada de capacidade antioxidante total (MILLER et al., 1993).

Segundo protocolo descrito por Erel (2004), o processo iniciou com o preparo de uma solução de ABTS (ácido 2,2'-azino-bis[3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico]) 7mM em água deionizada, seguida da adição de persulfato de potássio 5mM e repouso no escuro à temperatura ambiente durante 12-16 h antes da utilização. Após este repouso, a solução estoque de ABTS oxidada foi diluída para obter uma absorvância de  $1.000 \pm 0,1$  em  $\lambda$  de 630 nm em leitor de Elisa (DTX 800 Multimode Detector, Beckman Couter). Em seguida adicionou-se 300  $\mu$ L do ABTS diluído e 10  $\mu$ L de soro, em microplaca 96 poços e fundo chado para leitura da absorvância após incubação no escuro à temperatura ambiente por 15 minutos. A concentração de TAC foi calculada usando como padrão solução de 1mmol/L de Trolox<sup>®</sup> (ácido 2-carboxílico-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano) e os resultados do ensaio foram expressos em mmol Trolox/L.

#### 4.5.3.8 Dosagem do Estado Oxidante Total (TOS)

As moléculas oxidantes presentes no soro (ou plasma) podem ser medidas de forma global, denominada de estado oxidante total (TOS), segundo protocolo descrito por Erel (2005), onde estas moléculas presentes em 35  $\mu\text{L}$  de soro oxidaram o ferro presente em 11  $\mu\text{L}$  de solução reagente de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  25mM contendo: o-dianisidina dicloridrato 10mM + sulfato ferroso 5 mM, na presença de 225  $\mu\text{L}$  solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  25mM contendo: xilenol laranja 150  $\mu\text{M}$ , NaCl 140 mM + glicerol 1,35M, pH 1,75. Neste meio ácido, os íons férricos formaram um complexo colorido com o xilenol de intensidade proporcional à concentração total de moléculas oxidantes presentes na reação. Após 4 minutos de incubação a 37°C, a leitura da absorvância foi tomada em  $\lambda$  de 560 nm em leitor de Elisa (DTX 800 Multimode Detector, Beckman Couter). A concentração de TOS foi calculada com base na curva padrão traçada com solução padrão de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e os resultados do ensaio foram expressos em  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{L}$ .

#### 4.5.3.9 Determinação do Índice de Estresse Oxidativo (IEO)

Partindo-se do princípio de que um estado oxidativo reflete o desequilíbrio entre produção e depleção de agentes oxidantes, a utilização de um índice que traduza esta relação parece mais útil do que a análise individual de TOS e TAC (VASSALLE et al., 2008).

O índice de stress oxidativo (IEO) foi adotado, segundo Aycicek et, al. (2005), para expressar esta razão percentual entre os níveis de TOS e TAC, no entanto, para realizar o cálculo, a unidade de resultado de TAC (mmol equivalente Trolox /L), foi convertida para  $\mu\text{mol}$  equivalente Trolox /L e o valor do IEO foi calculado como se segue:  $\text{IEO} (\%) = [(\text{TOS}, \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Equivalente/L}) / (\text{TAC}, \mu\text{mol Trolox Equivalente/L}) \times 100]$ .

#### 4.5.3.10 Dosagem da Atividade da Enzima Superóxido Dismutase (SOD)

Esta enzima também tem papel antioxidante, já que acelera a dismutação do ânion radical superóxido em  $H_2O_2$  e  $O_2$ , na presença do hidrogênio. Sua atividade no concentrado de hemácias foi determinado seguindo a metodologia estabelecida pelo fabricante do kit Ransod (SD125) da marca Randox<sup>®</sup>, onde foi empregada xantina e xantina oxidase para gerar radicais superóxidos que reagiram com cloreto de 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolium (INT) para formar um composto vermelho formazan. A atividade da SOD foi medida através do grau de inibição da reação, onde a inibição da taxa de redução do INT pela SOD foi lida em absorbância em  $\lambda$  de 505 nm, de acordo com técnica padronizada para leitura em aparelho automatizado COBAS Mira Plus<sup>®</sup>. Os valores encontrados foram posteriormente convertidos através da multiplicação pelo fator de diluição e a concentração de SOD foi expressa em U/mL.

#### 4.5.3.11 Dosagem da Atividade da Enzima Catalase (CAT)

A determinação da atividade da catalase (CAT) é um importante marcador de defesa antioxidante, devido à sua atividade de decomposição do peróxido de hidrogênio em oxigênio e água. A atividade desta enzima foi determinada através de leitura espectrofotométrica da absorbância produzida durante a oxidação do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e consequente produção de oxigênio, como descrito por Aebi (1984), que possui como princípio de reação o acompanhamento da diminuição da absorbância em  $\lambda$  de 240 nm.

A amostra foi inicialmente hemolisada pela adição de 500  $\mu$ L de água gelada em 500  $\mu$ L de concentrado de hemácias. Em seguida, foi adicionando de 4,9 mL de tampão fosfato 0,1M pH 7,0 em 100  $\mu$ L do hemolisado, formando uma diluição 1:500. Deste preparado

foram retirados 500  $\mu$ L e acrescidos em 2,5 mL de tampão fosfato 50 mM pH 7,0; o qual foi adicionado de 1 mL de solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 30% e monitorada diminuição da absorbância entre 0 e 15 segundos em espectrofotômetro T70 UV/VIS PG Instruments Ltda. Para estimar a atividade da catalase presente na amostra, os resultados obtidos foram expressos em k/gh/min.

#### 4.5.3.12 Dosagem da Atividade da Enzima Glutationa Peroxidase (GPx)

A dosagem da atividade da GPx em sangue total foi realizada seguindo as orientações do fabricante do kit Ransel (RS 505) da marca Randox<sup>®</sup>, baseado na metodologia de Paglia & Valentine (1967), que consiste no seguinte princípio: a GPx catalisa a redução de GSH a GSSG pelo hidroperóxido de cumeno. A determinação da atividade da GPx foi feita de acordo com técnica padronizada para leitura em aparelho automatizado COBAS Mira Plus<sup>®</sup>, pela diferença da absorbância em  $\lambda$  de 340 nm, entre as três leituras com intervalo de 1 minuto entre elas. O resultado foi multiplicado por um fator de diluição e expresso em U/L.

#### 4.5.3.13 Dosagem da Atividade da Enzima Glutationa Redutase (GR)

A dosagem da atividade da GR em plasma foi realizada seguindo as orientações do fabricante do kit Glut Red (GR 2368) da marca Randox<sup>®</sup>, onde a GR catalisa a redução de GSSG a GSH através da oxidação simultânea da NADPH em NADP<sup>+</sup>. A determinação de GR foi feita de acordo com técnica padronizada para leitura em aparelho automatizado COBAS Mira Plus<sup>®</sup>, pela diferença da absorbância em  $\lambda$  de 340 nm, entre as cinco leituras com intervalo de 1 minuto entre elas. O resultado foi multiplicado por um fator de diluição e expresso em U/L.

#### 4.6 Análises Estatísticas dos Resultados

Todas as informações coletadas e resultados encontrados dos pacientes deste estudo foram tabulados em planilha Microsoft Excel 2010 do Laboratório de Atividade Biológica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas – UFAM.

Os dados foram inicialmente analisados descritivamente e apresentados em tabelas, sob a forma de média e desvio-padrão, no caso dos dados quantitativos, e sob a forma de frequência absoluta simples e relativa, no caso dos dados qualitativos.

Todos os dados analisados foram inicialmente classificados quanto à normalidade de distribuição determinada segundo o teste de Shapiro-Wilk.

Para a análise descritiva dos dados quantitativos, a determinação do  $p$  foi realizada segundo a ANOVA ou teste de Kruskal-Wallis, já no caso dos dados qualitativos a determinação do  $p$  foi realizada segundo análise de contingência do teste Chi-quadrado.

Para análise de múltiplas comparações dos grupos com dados com distribuição normal, foi utilizada a análise de variância (ANOVA) para estimar a significância, com aplicação do pós-teste de Tukey; caso contrário, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, com a aplicação do pós-teste de Dunns.

As correlações entre as variáveis foram estabelecida pelo cálculo de coeficientes de correlação do teste de Spearman, onde foi utilizada a determinação do valor de  $p$  bicaudal e intervalo de confiança de 95%.

O nível de significância utilizado para todos os testes foi de 5%.

Os cálculos estatísticos, as edições dos dados e as confecções das planilhas e gráficos foram executados com a utilização dos aplicativos GraphPad Prism 6 for Windows versão 6.01 (GraphPad Software, San Diego, CA).

## 5. RESULTADOS

Inicialmente procedeu-se a caracterização clínica e laboratorial dos pacientes para em seguida realizar as análises estatísticas.

### 5.1 Caracterização dos Grupos de Estudo

A população de estudo foi constituída de 93 pacientes do sexo feminino, com idade entre 15 e 49 anos, apresentando características clínicas e laboratoriais descritas nas Tabelas 1 e 2, respectivamente, e enquadradas em cada grupo, segundo critérios elegibilidade predefinidos.

Os pacientes apresentaram ACR entre 4 e 9; SLEDAI de 0 a 24, sendo que o grupo C apresentou SLEDAI = 0, o grupo NL oscilou o SLEDAI entre 8 e 24 e o grupo LA entre 6 e 20. A duração da doença oscilou entre 15 e 256 meses no grupo C, entre 1 e 252 meses no grupo NL e entre 1 e 192 meses no grupo LA. Com relação ao tempo de lesão, os grupos NL e LA apresentaram entre 1 e 6 meses, enquanto o grupo C estava sem atividade lúpica por um período de 12 a 96 meses.

Em se tratando de comorbidades, 4 (13%) pacientes no grupo C, 21 (68%) no grupo NL, e 5 (24%) no grupo LA apresentaram hipertensão. Foi verificado que de 32 (34%) pacientes em toda a população de estudo apresentou alguma outra doença associada.

Dentre os pacientes pertencentes ao grupo NL 15 (48%) tiveram sua classificação OMS determinada por biópsia, os outros 16 (52%) foram classificados segundo critérios clínicos e laboratoriais descritos por Melo et al. (2009), que incluiu: presença de hipertensão

arterial, análise do sedimento urinário (hematúria e leucocitúria) e dosagens de proteinúria de 24 horas, de creatinina sérica e de complemento C3.

Tabela 1 - Características Clínicas dos Pacientes dos Grupos Controle, Nefrite Lúpica, Lúpus Ativo e Sem Lúpus.

Características Clínicas	Controle (C) (n=30)	Nefrite Lúpica (NL) (n=31)	Lúpus Ativo (LA) (n=21)	Sem LES (S) (n=11)	<i>p</i>
Idade (anos), M ± DP	31,67 ±7,91	28,29 ±6,06	30,05 ±5,97	32,73 ±8,86	0,488
Número de Critérios ACR, M ± DP	5,33 ±1,42 <sup>a</sup>	5,87 ±0,96 <sup>a</sup>	6,00 ±1,34	-	0,025*
SLEDAI ( <i>score</i> ), M ± DP	0 <sup>a, b</sup>	13,74 ±4,02 <sup>a, c</sup>	9,10 ±3,52 <sup>b, c</sup>	-	<0,001*
Duração da Doença (meses), M ± DP	97,87 ±61,36 <sup>a, b</sup>	51,71 ±55,12 <sup>a</sup>	51,81 ±50,89 <sup>b</sup>	-	0,001*
Tempo de Lesão (meses), M ± DP	-	3,07 ±1,53	2,91 ±1,55	-	0,675
Prednisona, n (%)	21 (70)	29 (94)	21 (100)	-	0,007*
Cloroquina/Hidroxicloroquina, n (%)	23 (77)	19 (61)	17 (81)	-	0,149
Azatioprina, n (%)	5 (17)	3 (10)	4 (19)	-	0,594
Metotrexato, n (%)	1 (3)	1 (3)	2 (10)	-	0,551
Micofenolato de Mofetil/Sódio, n (%)	1 (3)	8 (26)	3 (14)	-	0,044*
Ciclofosfamida, n (%)	0 (0)	13 (42)	1 (5)	-	<0,001*
Metilprednisolona, n (%)	0 (0)	5 (16)	2 (10)	-	0,080
NL Classe III (OMS), n (%)	-	9 (29)	-	-	-
NL Classe IV (OMS), n (%)	-	20 (65)	-	-	-
NL, exceto Classe III e IV (OMS), n (%)	-	2 (6)	-	-	-
Tratamento A (NL, Classes III), n (%)	-	2 (22)	-	-	-
Tratamento B (NL, Classes III), n (%)	-	7 (78)	-	-	-
Tratamento A (NL, Classes IV), n (%)	-	4 (2)	-	-	-
Tratamento B (NL, Classes IV), n (%)	-	16 (80)	-	-	-
Tratamento A (NL, exceto Classe III e IV), n (%)	-	2(100)	-	-	-

M = Média; DP = Desvio Padrão; n= número de pacientes; \*Valor de significativo *p* (<0,05). Letras sobrescritas semelhantes indicam comparação estatisticamente significativa.

A medicação prescrita aos pacientes com LES englobou, principalmente, glicocorticoides, antimaláricos e imunossupressores. No caso dos pacientes com NL, buscou-se agrupá-los de acordo com a agressividade da medicação, para verificar o efeito do

tratamento na produção de ROS, conforme Quadro 5. Foi considerado sob tratamento A apenas aqueles pacientes que tomavam exclusivamente algum dos medicamentos classificados neste grupo, ao contrário daqueles sob tratamento B, que poderiam ou não tomar algum medicamento do tratamento A associadamente.

Quadro 5 – Grupos de Tratamentos para o LES conforme agressividade.

<b>Tratamento A</b>	<b>Tratamento B</b>
Cloroquina/Hidroxicloroquina	Azatioprina
Metotrexato	Ciclofosfamida
Prednisona	Metilprednisolona
	Micofenolato de Mofetil/ Sódio

As dosagens bioquímicas (ureia, creatinina, proteínas totais, albumina e ácido úrico) e imunológicas (complementos C3 e C4) se mostraram estatisticamente diferentes entre todos os grupos estudados e, com exceção da dosagem de C4, o grupo NL apresentou as alterações mais significativas (Tabela 2).

Tabela 2 - Dosagens Laboratoriais dos Pacientes dos Grupos Controle, Nefrite Lúpica, Lúpus Ativo e Sem Lúpus.

<b>Dosagens</b>	<b>Controle (n=30)</b>	<b>Nefrite Lúpica (n=31)</b>	<b>Lúpus Ativo (n=21)</b>	<b>Sem LES (n=11)</b>	<b><i>p</i></b>
<b>Bioquímicas</b>					
Ureia (mg/dL), M ± DP	31,87 ±5,38 <sup>a</sup>	67,40 ±43,26 <sup>a, b</sup>	37,80 ±9,66	28,45 ±6,41 <sup>b</sup>	<0,001 <sup>*</sup>
Creatinina Sérica (mg/dL), M ± DP	0,61 ±0,16 <sup>a</sup>	1,27 ±0,41 <sup>a, b, c</sup>	0,59 ±0,18 <sup>b</sup>	0,60 ±0,13 <sup>c</sup>	<0,001 <sup>*</sup>
Proteínas Totais (g/dL), M ± DP	6,48 ±0,66 <sup>a</sup>	5,59 ±0,85 <sup>a, b, c</sup>	7,01 ±0,82 <sup>b</sup>	7,01 ±0,35 <sup>c</sup>	<0,001 <sup>*</sup>
Albumina (g/dL), M ± DP	4,51 ±0,36 <sup>a</sup>	3,47 ±0,60 <sup>a, b, c</sup>	4,23 ±0,52 <sup>b, d</sup>	4,99 ±0,25 <sup>c, d</sup>	<0,001 <sup>*</sup>
Ácido Úrico (mg/dL), M ± DP	4,58 ±0,99 <sup>a</sup>	7,40 ±2,29 <sup>a, b</sup>	5,78 ±1,84	4,29 ±1,10 <sup>b</sup>	<0,001 <sup>*</sup>
<b>Imunológicas</b>					
C3 (g/dL), M ± DP	143,90 ±50,11 <sup>a</sup>	74,13 ±58,08 <sup>a, b</sup>	101,20 ±77,64	168,10 ±39,66 <sup>b</sup>	<0,001 <sup>*</sup>
C4 (g/dL), M ± DP	23,27 ±10,70	24,26 ±11,43	16,52 ±12,25 <sup>a</sup>	30,27 ±14,91 <sup>a</sup>	0,017 <sup>*</sup>

M = Média; DP = Desvio Padrão; n= número de pacientes; <sup>\*</sup>Valor de significativo *p* (<0,05). Letras sobrescritas semelhantes indicam comparação estatisticamente significativa.

## 5.2 Análises das Dosagens de Marcadores de Estresse Oxidativo

No que diz respeito ao estresse oxidativo, a maioria dos marcadores apresentaram níveis condizentes a uma atividade fisiológica oxidante existente nos pacientes com LES, independente da ocorrência ou não de atividade da doença, como pode ser constatado pelas análises das médias (com desvios padrões) dos grupos estudados e descritos nas Tabelas 3 e 4.

Tabela 3 - Dosagens de Marcadores de Estresse Oxidativo em Pacientes com e sem LES, com LES com e sem Atividade Lúpica.

Dosagens de Marcadores de Estresse Oxidativo	Sem LES (n=11)	LES (n=82)	LES Controle (n=30)	LES em Atividade (n=52)	<i>p</i>
SOD (U/mL), M ± DP	684,63 ±191,42	654,45 ±234,86	687,43 ±260,75	635,05 ±218,60	0,858
CAT (k/gHb/min), M ± DP	2,74 ±1,49	2,74 ±1,65	2,25 ±0,79	3,02 ±1,93	0,723
GPx (U/L), M ± DP	4436,49 ±1142,00	5064,68 ±1556,11	5893,11 ±1710,68 <sup>a</sup>	4494,68 ±1061,43 <sup>a</sup>	0,002*
GR (U/L), M ± DP	27,59 ±17,71	30,89 ±19,33	22,57 ±11,51 <sup>a</sup>	34,59 ±20,53 <sup>a</sup>	0,033*
TOS (µmol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /L), M ± DP	8,29 ±2,94	9,79 ±5,30	11,35 ±5,93 <sup>a</sup>	8,85 ±4,70 <sup>a</sup>	0,036*
TAC (mmol Trolox/L), M ± DP	1,01 ±0,10	0,83 ±0,25	0,84 ±0,16	0,82 ±0,29	0,061
IEO (%), M ± DP	0,84 ±0,30	1,46 ±1,29	1,45 ±0,93	1,47 ±1,47	0,143
Tióis Totais (µmol/L), M ± DP	262,78 ±63,17 <sup>a, b</sup>	160,51 ±94,83 <sup>a</sup>	256,36 ±65,06 <sup>c</sup>	104,09 ±53,64 <sup>b, c</sup>	<0,001*
Alantoína (mg/L), M ± DP	3,43 ±0,83 <sup>a, b, c</sup>	6,52 ±2,43 <sup>a</sup>	5,95 ±1,93 <sup>b</sup>	7,04 ±2,95 <sup>c</sup>	<0,001*
MDA (µmol/L), M ± DP	4,03 ±0,95	3,99 ±1,45	3,12 ±0,50 <sup>a</sup>	4,45 ±1,58 <sup>a</sup>	<0,001*

M = Média; DP = Desvio Padrão; n= número de pacientes; \*Valor de significativo *p* (<0,05). Letras sobrescritas semelhantes indicam comparação estatisticamente significativa.

Apenas as dosagens da atividade de SOD e CAT apresentaram diferenças inexpressivas, e por isto, estas enzimas não serão detalhadamente analisadas nos tópicos seguintes, onde será dada ênfase às outras enzimas antioxidantes e os marcadores de estresse oxidativo que apresentaram, em alguma das análises entre os grupos, significativas diferenças estatísticas.

Tabela 4 - Dosagens de Marcadores de Estresse Oxidativo em Pacientes dos Grupos Controle, Nefrite Lúpica, Lúpus Ativo e Sem Lúpus.

Dosagens de Marcadores de Estresse Oxidativo	Controle (C) (n=30)	Nefrite Lúpica (NL) (n=31)	Lúpus Ativo (LA) (n=21)	Sem LES (S) (n=11)	<i>p</i>
SOD (U/mL), M ± DP	687,40 ± 260,74	621,43 ± 244,55	654,43 ± 179,07	684,64 ± 191,47	0,784
CAT (k/gHb/min), M ± DP	2,25 ± 0,79	2,97 ± 1,76	3,09 ± 2,20	2,74 ± 1,50	0,642
GPx (U/L), M ± DP	5893,00 ± 1710,68 <sup>a</sup>	4859,97 ± 1363,30	4183,41 ± 930,56 <sup>a</sup>	4436,49 ± 1142,00	<0,001*
GR (U/L), M ± DP	22,57 ± 11,51 <sup>a</sup>	31,97 ± 18,32	38,51 ± 23,41 <sup>a</sup>	27,59 ± 17,71	0,028*
TOS (μmol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /L), M ± DP	11,35 ± 5,93 <sup>a</sup>	7,58 ± 3,90 <sup>a, b</sup>	10,75 ± 5,25 <sup>b</sup>	8,29 ± 2,94	<0,001*
TAC (mmol Trolox/L), M ± DP	0,84 ± 0,16	0,93 ± 0,25 <sup>a</sup>	0,68 ± 0,27 <sup>a, b</sup>	1,00 ± 0,10 <sup>b</sup>	<0,001*
IEO (%), M ± DP	1,45 ± 0,93 <sup>a</sup>	1,01 ± 0,81 <sup>a, b</sup>	2,17 ± 1,96 <sup>b</sup>	0,84 ± 0,30	0,001*
Tióis Totais (μmol/L), M ± DP	256,40 ± 65,06 <sup>a, b</sup>	84,50 ± 36,55 <sup>a, c</sup>	133,5 ± 62,17 <sup>b, d</sup>	262,8 ± 63,17 <sup>c, d</sup>	<0,001*
Alantoína (mg/L), M ± DP	5,95 ± 1,93 <sup>a</sup>	7,61 ± 3,21 <sup>b</sup>	5,89 ± 1,90 <sup>c</sup>	3,43 ± 0,83 <sup>a, b, c</sup>	<0,001*
MDA (μmol/L), M ± DP	3,12 ± 0,50 <sup>a</sup>	3,81 ± 1,42 <sup>b</sup>	5,41 ± 1,31 <sup>a, b</sup>	4,03 ± 0,95	<0,001*

M = Média; DP = Desvio Padrão; n= número de pacientes; \*Valor de significativo *p* (<0,05). Letras sobrescritas semelhantes indicam comparação estatisticamente significativa.

A representação gráfica das dosagens de cada marcador foi feita em quatro etapas, conforme descrito a seguir:

- Gráfico (A): Comparação múltipla do grupo sem LES (Grupo S) com todas as pacientes com LES (Grupos C, NL e LA agrupados), com as pacientes com LES controle (Grupo C) e com as pacientes com alguma atividade lúpica (Grupos NL e LA agrupados); bem como entre as pacientes com LES controlado e com atividade lúpica.
- Gráfico (B): Comparação múltipla entre as pacientes com LES, ou seja, Grupo C x Grupo NL, Grupo C x Grupo LA e Grupo NL x Grupo LA.
- Gráfico (C): Comparação múltipla entre as pacientes com LES, semelhantemente ao que foi feito no Gráfico (B), sendo que no grupo com NL procedeu-se a subdivisão deste em Classe III e Classe IV.

- Gráfico (D): Comparação múltipla entre as pacientes com LES, semelhantemente ao que foi feito no Gráfico (B), sendo que o grupo NL, neste caso, foi subdividido conforme o tratamento, onde as pacientes foram agrupadas no subgrupo Tratamento A (Classes III e IV) ou no subgrupo Tratamento B (Classes III e IV).

### 5.2.1 Estudo da Atividade da Enzima Glutathiona Peroxidase (GPx)

As dosagens da atividade da GPx não apresentaram diferença significativa entre pacientes com LES e pacientes sem LES, houve diferença apenas quando realizou-se a comparação entre pacientes do grupo LES Controle (LES em remissão) e pacientes com alguma atividade lúpica (grupos NL e LA agrupados), com  $p < 0,01$ , como pode ser visto no Gráfico (A) da Figura 4.

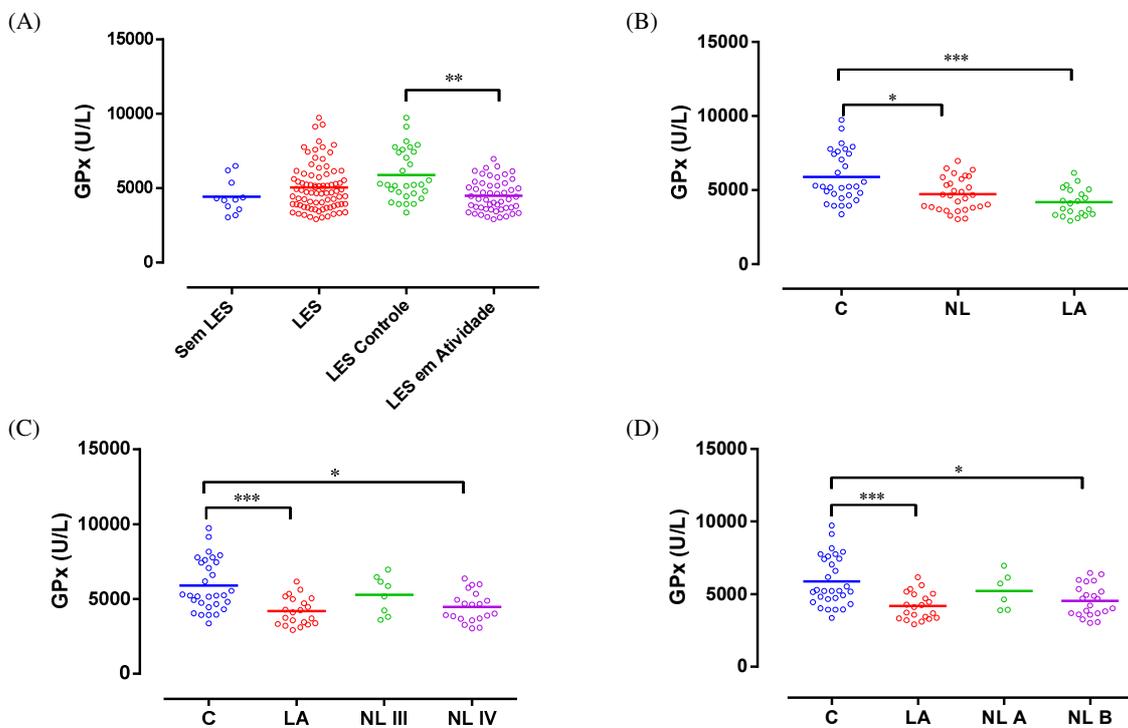


Figura 4 – Gráficos de análise de variância entre a atividade da GPx nos diferentes grupos de estudo. Valores significativos: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ .

Quando se procedeu a análise apenas entre os pacientes lúpicos, observou-se diferença significativa entre o grupo C e o grupo NL ( $p < 0,05$ ), e mais intensamente entre o grupo C e LA ( $p < 0,001$ ). No entanto, não houve diferença entre os grupos de LES com atividade, demonstrando que esta enzima tem sua atividade diminuída na atividade lúpica independente do órgão-alvo (Gráfico (B) – Figura 4).

Quando se analisou mais profundamente o grupo NL, verificou-se que a redistribuição por classe de nefrite revelou que a diminuição na atividade da GPx nas amostras biológicas deste grupo foi devido à apenas o subgrupo Classe IV e Tratamento B (ambos com  $p < 0,05$ ) e que o subgrupo Classe III e Tratamento A se comportou quase que exatamente como o Grupo C, o que leva a crer que agravamento da nefrite provoca diminuição da atividade desta enzima, mas sem influência do tratamento (Gráficos (C) e (D) – Figura 4).

### 5.2.2 Estudo da Atividade da Enzima Glutathiona Redutase (GR)

As dosagens da atividade da GR, semelhantemente ao que ocorreu com as dosagens de GPx, não apresentaram diferença significativa entre pacientes com LES e pacientes sem LES, observou-se elevação de sua atividade pacientes com alguma atividade lúpica (grupos NL e LA agrupados) apenas quando realizou-se comparação entre pacientes do grupo C (LES controlado), com  $p < 0,05$ , como pode ser visto no Gráfico (A) da Figura 5.

Durante a análise entre apenas os pacientes lúpicos, observou-se que houve uma elevação da atividade de GR nas amostras biológicas dos pacientes com atividade, no entanto, à primeira vista, esta diferença em relação ao grupo C só foi suficientemente significativa no grupo LA ( $p < 0,05$ ), como mostra o Gráfico (B) da Figura 5.

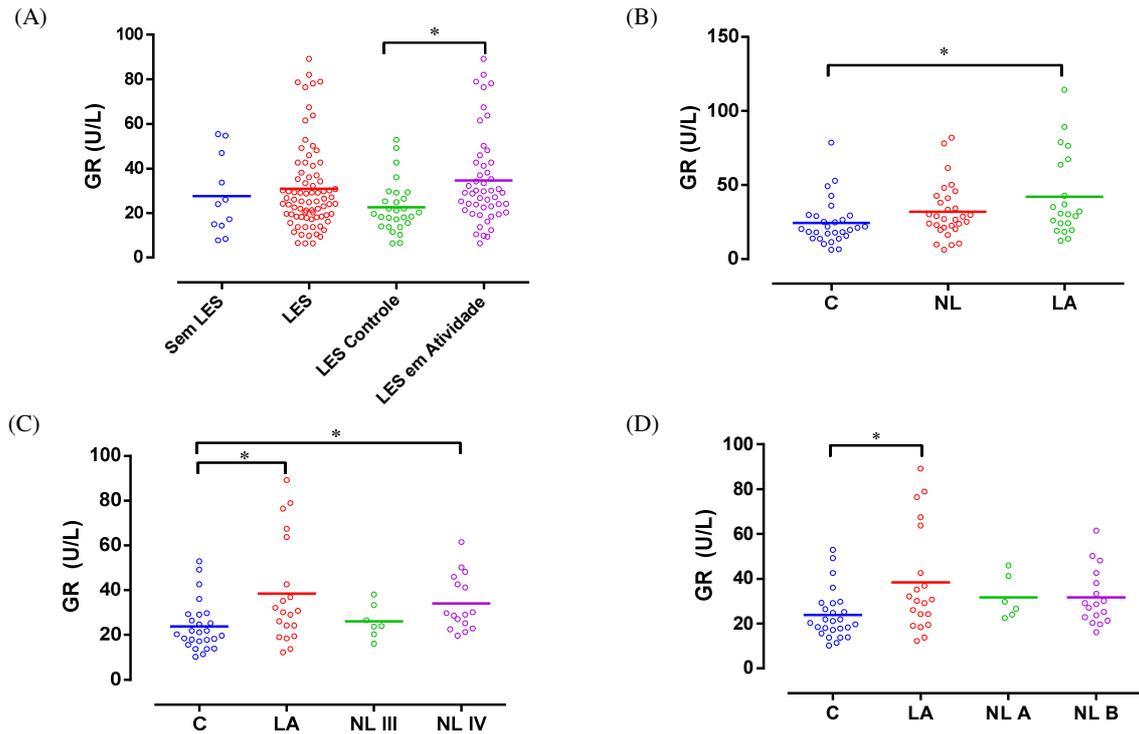


Figura 5 – Gráficos de análise de variância entre as dosagens de GR nos diferentes grupos de estudo. Valores significativos: \*  $p < 0,05$ .

Esta observação levou a acreditar-se não haver alteração na atividade da GR na NL. No entanto, ao analisá-lo mais profundamente, verificou-se que há um aumento discreto, mas significativo, nas amostras do subgrupo NL Classe IV ( $p < 0,05$ ), demonstrado no Gráfico (C) da Figura 5.

Com relação ao tratamento, a diferença que outrora foi observada na NL Classe VI desaparece e demonstra que esta enzima tem sua atividade elevada na no LES com atividade extrarrenal e renal Classe IV em relação ao grupo C, independentemente do tratamento adotado na NL (Gráfico (D) – Figura 5).

### 5.2.3 Estudo do Estado Oxidante Total (TOS)

As dosagens de TOS se comportaram como nas dosagens anteriores, sem diferença significativa entre pacientes com LES e pacientes sem LES. Houve diferença apenas quando

foi realizada a comparação entre pacientes do grupo C e pacientes com alguma atividade lúpica, com uma queda da concentração de TOS ( $p < 0,05$ ) no grupo LES em atividade (Gráfico (A) – Figura 6).

Na análise apenas entre os pacientes lúpicos, observou-se diferença significativa entre o grupo NL e o grupo LA ( $p < 0,05$ ), e mais intensamente entre o grupo NL e o grupo C ( $p < 0,001$ ). No entanto, não houve diferença entre o grupo LA e o grupo C, demonstrando que a produção de ROS foi inesperadamente mais elevado nos paciente com LES sem atividade do que nos pacientes com LA e mais expressivamente elevado quando comparado ao grupo NL (Gráfico (B) – Figura 6).

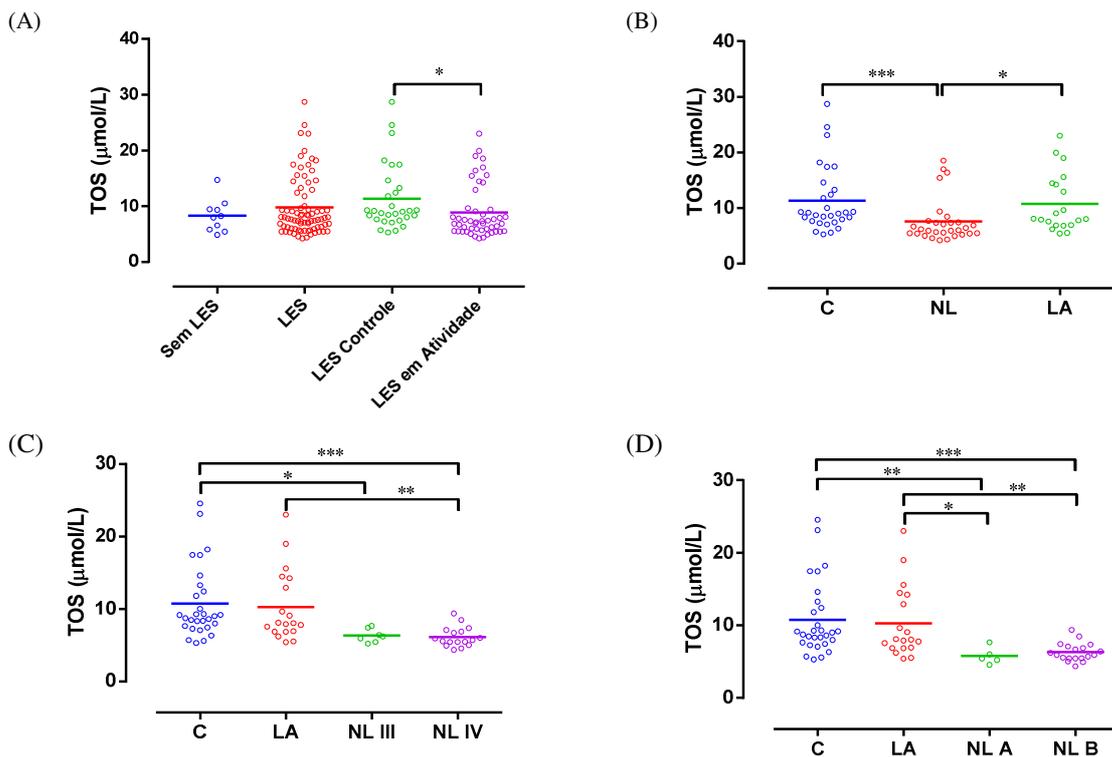


Figura 6 – Gráficos de análise de variância entre as dosagens de TOS nos diferentes grupos de estudo. Valores significativos: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ .

Ao se analisar mais profundamente o grupo NL, verificou-se que tanto nos pacientes agrupado segundo a classificação da NL (Classes III e IV), quanto segundo ao tratamento (A

e B) houve uma diminuição em relação ao grupo C, com menor intensidade no grupo NL Classe III ( $p < 0,05$ ) e Tratamento A ( $p < 0,01$ ) do que em relação ao grupo NL Classe IV e Tratamento B (ambos com  $p < 0,001$ ). Já na comparação com o grupo LA, depois destes desmembramentos observou-se uma diferença significativa entre este e o grupo NL Classe IV e Tratamentos A ( $p < 0,05$ ) e Tratamento B ( $p < 0,01$ ). Estas últimas análises indicaram haver maior diminuição do estado oxidativo nos pacientes com NL Classe IV, submetidos principalmente ao Tratamento B. (Gráficos (C) e (D) – Figura 6).

#### 5.2.4 Estudo da Capacidade Antioxidante Total (TAC)

As dosagens da TAC no grupo de indivíduos sem LES foi superior às dosagens de todos os outros grupos demonstrados no Gráfico (A) da Figura 7, no entanto esta diferença não foi suficientemente significativa. Além desta, na comparação entre LES com e sem atividade, ambos os grupos se comportam de maneira muito semelhante, sugerindo que a atividade antioxidante de pacientes com LES permanece inalterada mesmo durante a atividade lúpica.

A análise exclusiva dos pacientes lúpicos revelou que, na verdade ocorre uma variação entre as dosagens da TAC conforme a atividade lúpica, onde pacientes do grupo LA apresentaram uma diminuição da TAC em relação ao grupo C, mas sem significância estatística, e em relação ao grupo NL ( $p < 0,001$ ), enquanto que o grupo NL mostrou-se com a maior TAC em comparação aos outros grupos (Gráfico (B) – Figura 7).

Ao se analisar mais detalhadamente o grupo NL, verificou-se que a diferença entre os seus subgrupos (Classes III e IV) e o grupo LA permaneceu, no entanto apenas a Classe IV ( $p < 0,01$ ) foi significativa. Em relação ao grupo C, apesar de ambos os subgrupos da NL

apresentarem médias de TAC superiores, estas não foram suficientemente significativas (Gráfico (C) – Figura 6).

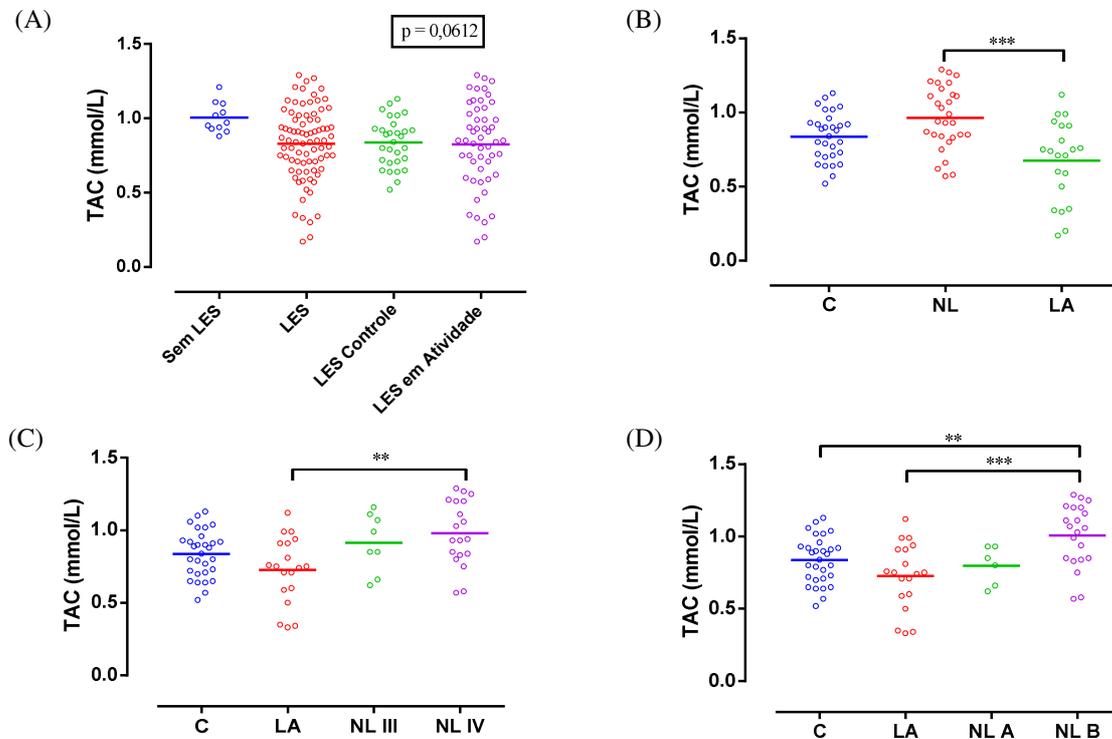


Figura 7 – Gráficos de análise de variância entre as dosagens de TAC nos diferentes grupos de estudo. Valores significativos: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ .

Quando se realizou a comparação entre os Tratamentos (A e B) para NL, as dosagens de TAC distribuíram-se de forma a demonstrar que os pacientes sob Tratamento B apresentaram a mais elevada média de TAC, e significativamente superior a todos os outros grupos demonstrados no Gráfico (D) da Figura 7. Isto mostra que, em se tratando de atividade antioxidante, tanto os pacientes com LA quanto os pacientes com NL - Tratamento A apresentam uma diminuição em relação aos pacientes em remissão (grupo C) e que o tratamento B para NL mostrou-se eficiente na elevação das concentrações plasmáticas de TAC.

### 5.2.5 Estudo da Determinação do Índice de Estresse Oxidativo (IEO)

As determinações do IEO no grupo de indivíduos sem LES foi inferior às dosagens de todos os outros grupos demonstrados no Gráfico (A) da Figura 8. No entanto, esta diferença não foi suficientemente significativa. Além desta, na comparação entre LES com e sem atividade, o grupo LES em atividade mostrou-se ligeiramente inferior ao grupo sem atividade, refletindo a diminuição do TOS nos pacientes com LES ativo em relação ao grupo LES controle descrita anteriormente, mas também sem significância estatística.

Na análise apenas entre os pacientes lúpicos, observou-se a mesma diminuição estatisticamente significativa do grupo NL em relação tanto ao grupo LA ( $p < 0,01$ ), quanto em relação ao grupo C ( $p < 0,01$ ). Quanto ao grupo LA, apesar de ter se apresentado mais elevado que o grupo C, não houve diferença significativa entre eles (Gráfico (B) – Figura 8).

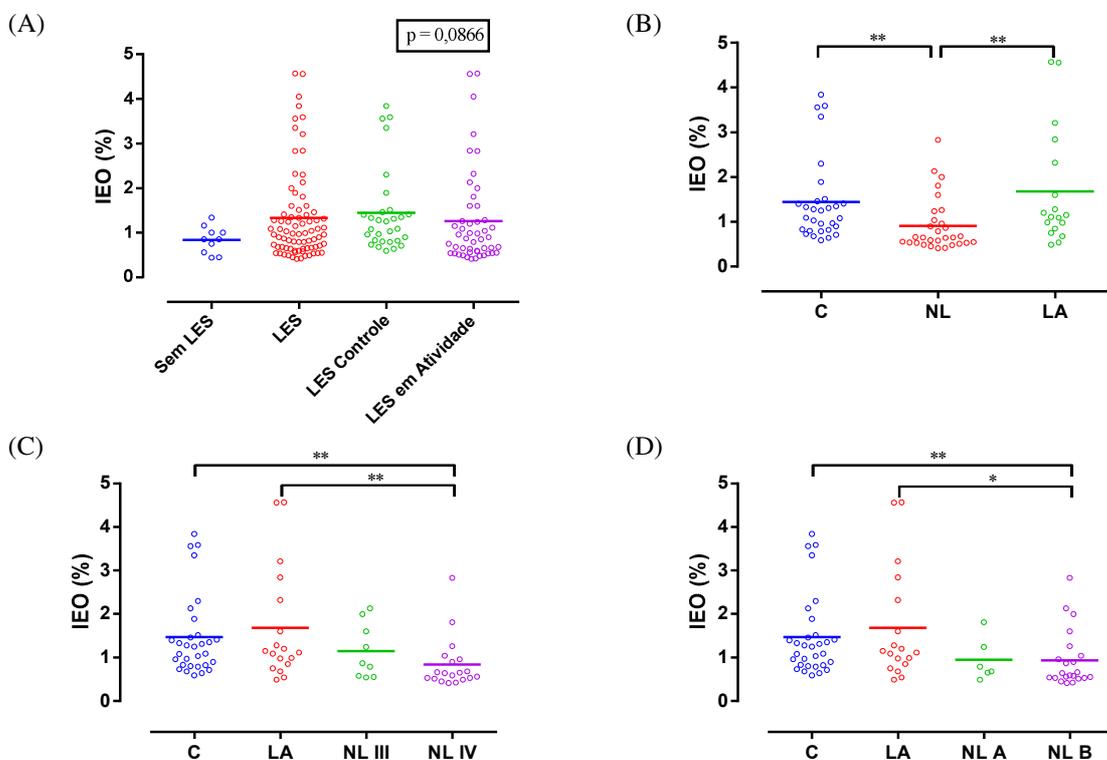


Figura 8 – Gráficos de análise de variância entre as dosagens de IEO nos diferentes grupos de estudo. Valores significativos: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ .

Ao se analisar mais profundamente o grupo NL, semelhantemente ao que foi demonstrado no estudo do TOS, verificou-se que tanto nos pacientes agrupados segundo a classificação da NL (Classes III e IV), quanto segundo ao tratamento (A e B) houve uma diminuição do IEO tanto em relação ao grupo C, quanto em relação ao grupo LA. No entanto, apenas as relações entre o grupo NL Classe IV e Tratamento B permaneceram significativamente diferentes em relação ao grupo C (ambos com  $p < 0,01$ ) e LA ( $p < 0,01$  e  $p < 0,05$  respectivamente) reforçando o que foi verificado nos estudos de TOS e TAC, que, em se tratando de atividade antioxidante, o tratamento B para NL mostrou-se eficiente na elevação das concentrações plasmáticas de TAC e consequente redução de TOS (Gráficos (C) e (D) – Figura 8).

#### 5.2.6 Estudo das Dosagens de Tióis Totais

Em se tratando das dosagens de Tióis Totais, facilmente se observa uma grande variância em suas concentrações entre os grupos estudados. Inicialmente observou-se que houve diminuição significativa no grupo com LES em relação ao grupo sem LES ( $p < 0,05$ ), devido principalmente ao grupo LES em atividade, que apresentou uma diminuição muito mais acentuada relação ao mesmo grupo ( $p < 0,0001$ ) e em relação ao grupo LES controle ( $p < 0,0001$ ), como pode ser visto no Gráfico (A) da Figura 9.

No estudo entre os grupos com LES, tanto o grupo NL quanto o grupo LA apresentaram diminuição significativa nas dosagens médias de Tióis Totais em relação ao grupo C ( $p < 0,0001$ ). Observou-se também que a média do grupo NL apresentou-se diminuída em relação ao grupo LA, no entanto não foi significativa. Isto indica que as concentrações de Tióis Totais são sensíveis ao agravamento da atividade lúpica, já que, em

geral, o grupo NL apresenta média de SLEDAI superior e menor média de concentração deste marcador em relação ao grupo LA (Gráfico (B) – Figura 9).

Ao se analisar mais profundamente o grupo NL, verificou-se que tanto os subgrupos Classe III ( $p < 0,01$ ) e Tratamento A ( $p < 0,001$ ) quanto os subgrupos Classe IV e Tratamento B (ambos com  $p < 0,0001$ ) apresentaram diminuição nas dosagens de Tióis Totais em relação ao grupo C, sugerindo haver um maior estado oxidante na nefrite lúpica classe IV que ocasiona uma maior necessidade de consumo deste antioxidante endógeno (Gráficos (C) e (D) – Figura 9).

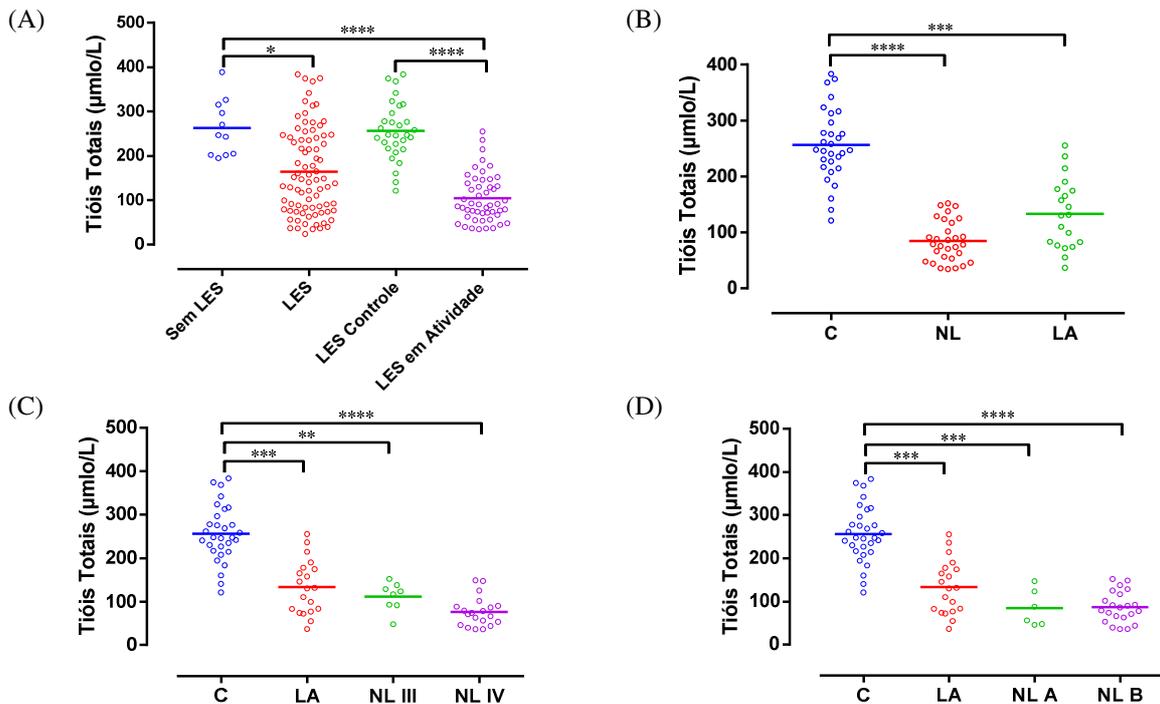


Figura 9 – Gráficos de análise de variância entre as dosagens de Tióis Totais nos diferentes grupos de estudo. Valores significativos: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$  e \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

Já na comparação com o grupo LA, observou-se uma sutil queda da Classe III e mais evidente da Classe IV em relação ao grupo LA, mas com nenhuma significância, o que não é observado quando os pacientes são separados por tratamento (A e B), onde ambos os

subgrupos se assemelham e demonstram não haver qualquer influência do tratamento quanto ao consumo deste antioxidante (Gráficos (C) e (D) – Figura 9).

### 5.2.7 Estudo das Dosagens de Alantoína

Nas dosagens de Alantoína, pôde-se observar que houve uma grande variância nas concentrações dos grupos estudados em relação ao grupo sem LES, com aumento significativo no grupo com LES ( $p < 0,001$ ), isto devido principalmente ao grupo LES em atividade que apresentou a mesma diferença relação com o grupo sem LES ( $p < 0,001$ ), além do grupo LES controle que também apresentou dosagem média de Alatoína superior ao grupo sem LES ( $p < 0,01$ ), como pode ser visto no Gráfico (A) da Figura 10.

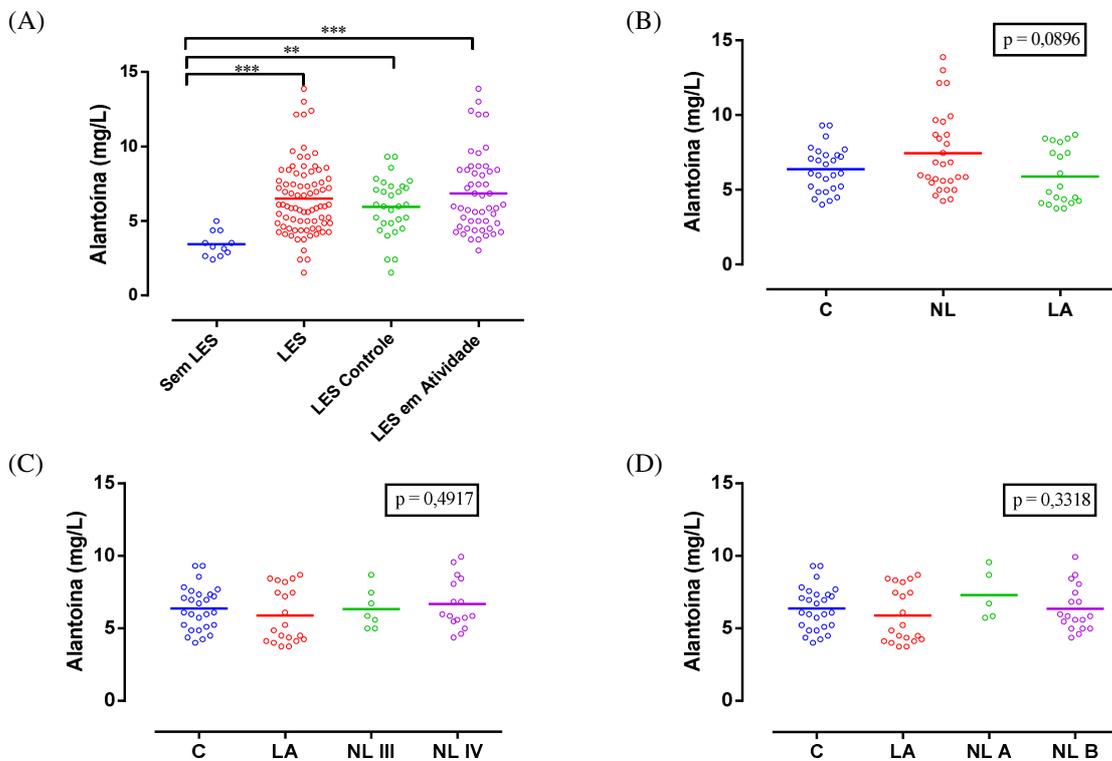


Figura 10 – Gráficos de análise de variância entre as dosagens de Alantoína nos diferentes grupos de estudo. Valores significativos: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ .

No entanto, apesar das médias das dosagens de Alantoína do grupo LES em atividade terem se mostrado superiores ao grupo LES controle, e que esta elevação deveu-se ao grupo NL, independente da classe e sob tratamento A, esta diferença não foi suficientemente significativa, em nenhuma das análises comparativas realizadas posteriormente. Permitindo apenas afirmar que a Alantoína teve sua concentração elevada nos pacientes lúpicos, independente do órgão-alvo ou da intensidade da atividade, apesar de sua estreita relação com a elevação de ácido úrico e esperada alteração exclusivamente na nefrite (Gráficos (B), (C) e (D) – Figura 10).

#### 5.2.8 Estudo das Dosagens de Malondialdeído (MDA)

As dosagens de MDA não apresentaram praticamente nenhuma diferença significativa entre os grupos com e sem LES. Houve elevação significativa apenas na média da concentração de MDA nos grupos com LES em atividade ( $p < 0,001$ ) em comparação ao grupo LES controle (Gráfico (A) – Figura 11).

Na análise apenas entre os pacientes lúpicos, observou-se diferença significativa entre o grupo LA tanto entre o grupo C quanto entre o grupo NL (ambos com  $p < 0,0001$ ). No entanto, a diferença entre o grupo NL e o grupo C não foi suficientemente significativa, demonstrando que a peroxidação lipídica ocorre mais acentuadamente na atividade lúpica, sendo mais acentuada na atividade extrarrenal (Gráfico (B) – Figura 11).

Ao se analisar mais esmiuçadamente o grupo NL, verificou-se que praticamente não havia diferença entre os seus subgrupos (Classes III e IV), mas havia entre eles e o grupo LA, no entanto, apenas a Classe IV ( $p < 0,001$ ) foi significativamente inferior. Em relação ao grupo C, apesar de ambos os subgrupos da NL apresentarem médias de MDA superiores, estas não foram suficientemente significativas (Gráfico (C) – Figura 6).

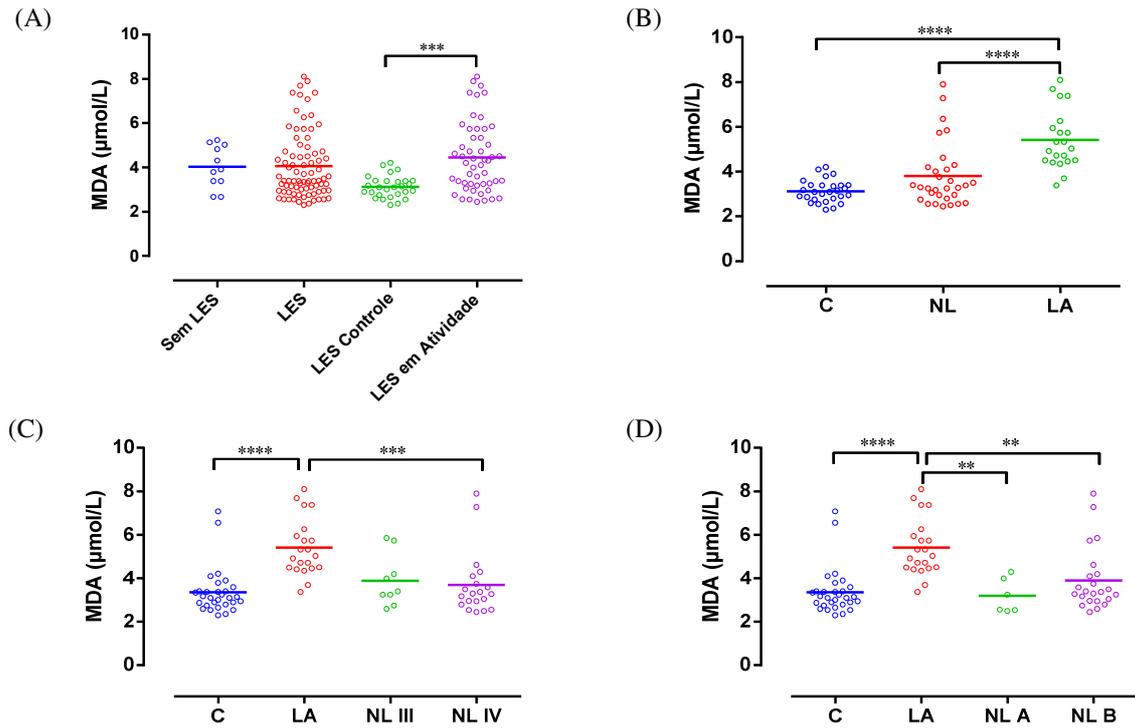


Figura 11 – Gráficos de análise de variância entre as dosagens de MDA nos diferentes grupos de estudo. Valores significativos: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  e \*\*\*\*  $p < 0,001$ .

Quando se realizou a comparação entre os tratamentos (A e B) para NL, as dosagens de MDA distribuíram-se de forma a demonstrar que os pacientes sob Tratamento tanto A quanto B apresentaram reduzida média de MDA em relação ao grupo LA (ambos com  $p < 0,001$ ), demonstrados no Gráfico (D) da Figura 11.

### 5.3 Correlação entre Marcadores de Estresse Oxidativo e Características Clínicas e Laboratoriais

Para melhor avaliar a significância do estresse oxidativo no LES e, mais especificamente na nefrite lúpica, analisou-se a relação entre as dosagens de seus marcadores e vários aspectos clínicos e laboratoriais característicos desta doença, conforme descrito na Tabela 5.

Foram considerados válidos para a análise de correlação apenas os marcadores de estresse oxidativo e parâmetros clínicos/ laboratoriais do LES que se mostraram significativos nas análises anteriores.

Tabela 5 - Correlação dos Marcadores de Estresse Oxidativo com os Parâmetros Clínicos e Laboratoriais dos Pacientes dos Grupos Controle, Lúpus Ativo e Nefrite Lúpica.

	SOD	CAT	GPx	GR	TOS	TAC	IEO	Tióis Totais	Alantoína	MDA
<b>SLEDAI, r (p)</b>	-0,071 (0,527)	0,121 (0,278)	<b>-0,294</b> <b>(0,007)*</b>	<b>0,224</b> <b>(0,043)*</b>	<b>-0,391</b> <b>(&lt;0,001)*</b>	0,173 (0,120)	<b>-0,325</b> <b>(0,003)*</b>	<b>-0,730</b> <b>(&lt;0,001)*</b>	0,184 (0,097)	<b>0,226</b> <b>(0,041)*</b>
<b>Duração da Doença, r (p)</b>	-0,130 (0,360)	-0,002 (0,992)	0,170 (0,220)	-0,047 (0,743)	0,110 (0,441)	-0,077 (0,589)	0,049 (0,728)	0,088 (0,533)	-0,029 (0,836)	-0,016 (0,911)
<b>Prednisona, r (p)</b>	0,051 (0,671)	0,164 (0,172)	-0,144 (0,230)	<b>0,285</b> <b>(0,016)*</b>	<b>-0,484</b> <b>(&lt;0,001)*</b>	0,177 (0,139)	<b>-0,395</b> <b>(&lt;0,001)*</b>	<b>-0,642</b> <b>(&lt;0,001)*</b>	0,186 (0,120)	0,150 (0,213)
<b>Ureia, r (p)</b>	-0,089 (0,430)	0,086 (0,444)	-0,161 (0,147)	<b>0,264</b> <b>(0,016)*</b>	-0,011 (0,919)	0,058 (0,604)	-0,015 (0,891)	<b>-0,316</b> <b>(0,004)*</b>	<b>0,330</b> <b>(0,003)*</b>	0,069 (0,539)
<b>Creatinina, r (p)</b>	0,034 (0,764)	0,111 (0,320)	-0,008 (0,940)	0,118 (0,289)	<b>-0,382</b> <b>(0,002)*</b>	<b>0,400</b> <b>(0,004)*</b>	<b>-0,429</b> <b>(0,002)*</b>	<b>-0,569</b> <b>(&lt;0,001)*</b>	<b>0,257</b> <b>(0,020)*</b>	-0,064 (0,566)
<b>Proteínas Totais, r (p)</b>	0,136 (0,224)	-0,010 (0,932)	0,002 (0,987)	-0,118 (0,289)	<b>0,275</b> <b>(0,018)*</b>	<b>-0,504</b> <b>(&lt;0,001)*</b>	<b>0,409</b> <b>(&lt;0,001)*</b>	<b>0,454</b> <b>(&lt;0,001)*</b>	<b>-0,244</b> <b>(0,027)*</b>	<b>0,346</b> <b>(0,002)*</b>
<b>Albumina, r (p)</b>	0,167 (0,134)	-0,014 (0,902)	<b>0,298</b> <b>(0,007)*</b>	-0,206 (0,064)	<b>0,378</b> <b>(0,003)*</b>	-0,041 (0,713)	<b>0,298</b> <b>(0,007)*</b>	<b>0,592</b> <b>(&lt;0,001)*</b>	<b>-0,314</b> <b>(0,004)*</b>	-0,106 (0,345)
<b>Ácido Úrico, r (p)</b>	-0,046 (0,683)	-0,027 (0,809)	-0,005 (0,962)	0,131 (0,239)	-0,043 (0,703)	0,102 (0,364)	-0,038 (0,732)	<b>-0,255</b> <b>(0,021)*</b>	<b>0,280</b> <b>(0,001)*</b>	0,112 (0,315)
<b>C3, r (p)</b>	0,172 (0,122)	-0,113 (0,312)	0,157 (0,158)	<b>-0,289</b> <b>(0,009)*</b>	0,122 (0,275)	-0,127 (0,255)	0,155 (0,165)	<b>0,426</b> <b>(&lt;0,001)*</b>	-0,129 (0,249)	-0,037 (0,740)
<b>C4, r (p)</b>	0,055 (0,621)	0,167 (0,134)	0,006 (0,957)	-0,202 (0,069)	0,056 (0,061)	-0,006 (0,958)	0,074 (0,508)	0,980 (0,381)	0,106 (0,342)	-0,164 (0,142)

r = coeficiente de correlação de Spearman. \* Valor significativo de  $p$  ( $<0,05$ ), em negrito.

Apesar da duração da doença ( $p = 0,003$ ) e as dosagens de C4 ( $p = 0,017$ ) terem se mostrado significativas na análise descritiva do grupo de estudo, ambas não apresentaram nenhuma correlação significativa com os marcadores de estresse oxidativo e, portanto, não serão estudadas.

### 5.3.1 Estudo das Correlações da Enzima Glutationa Peroxidase (GPx)

Foram observadas duas correlações significativas com a atividade da GPx. A primeira delas foi com os *scores* de SLEDAI dos pacientes ( $r = -0,294$  e  $p = 0,007$ ), seguida pela correlação com as dosagens séricas de Albumina ( $r = 0,298$  e  $p = 0,007$ ). Estes resultados podem ser analisados nos Gráficos (A) e (B), respectivamente, da Figura 12.

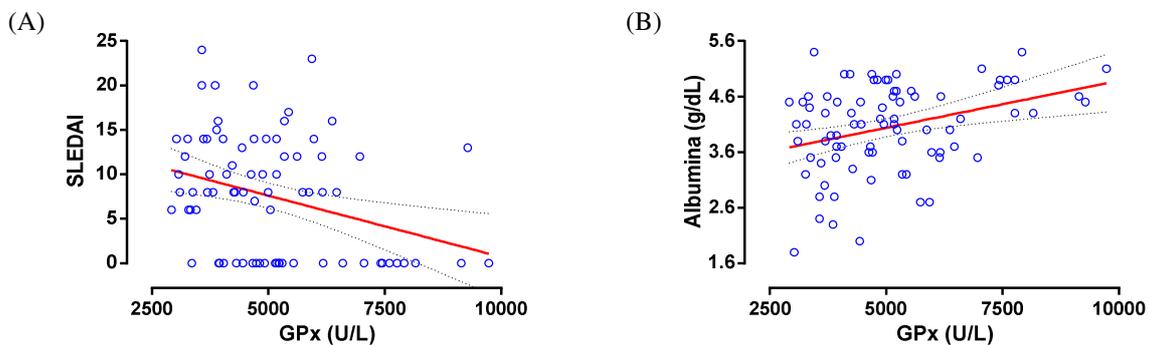


Figura 12 – Gráficos de Dispersão (análise de correlação de Spearman) entre as dosagens de GPx e o SLEDAI ( $r = -0,294$  e  $p = 0,007$ ). e as dosagens de Albumina ( $r = 0,298$  e  $p = 0,007$ ).

### 5.3.2 Estudo das Correlações da Enzima Glutationa Redutase (GR)

Observaram-se quatro correlações significativas com a atividade da GR. A primeira delas foi com os *scores* de SLEDAI dos pacientes ( $r = 0,224$  e  $p = 0,043$ ), seguida pela relação com as dosagens de prednisona prescritas ( $r = 0,285$  e  $p = 0,016$ ), com as dosagens séricas de ureia ( $r = 0,264$  e  $p = 0,016$ ) e, por fim, com as concentrações de complemento C3 ( $r = -0,289$  e  $p = 0,009$ ). Estes resultados podem ser analisados nos Gráficos (A) a (D), respectivamente, da Figura 13.

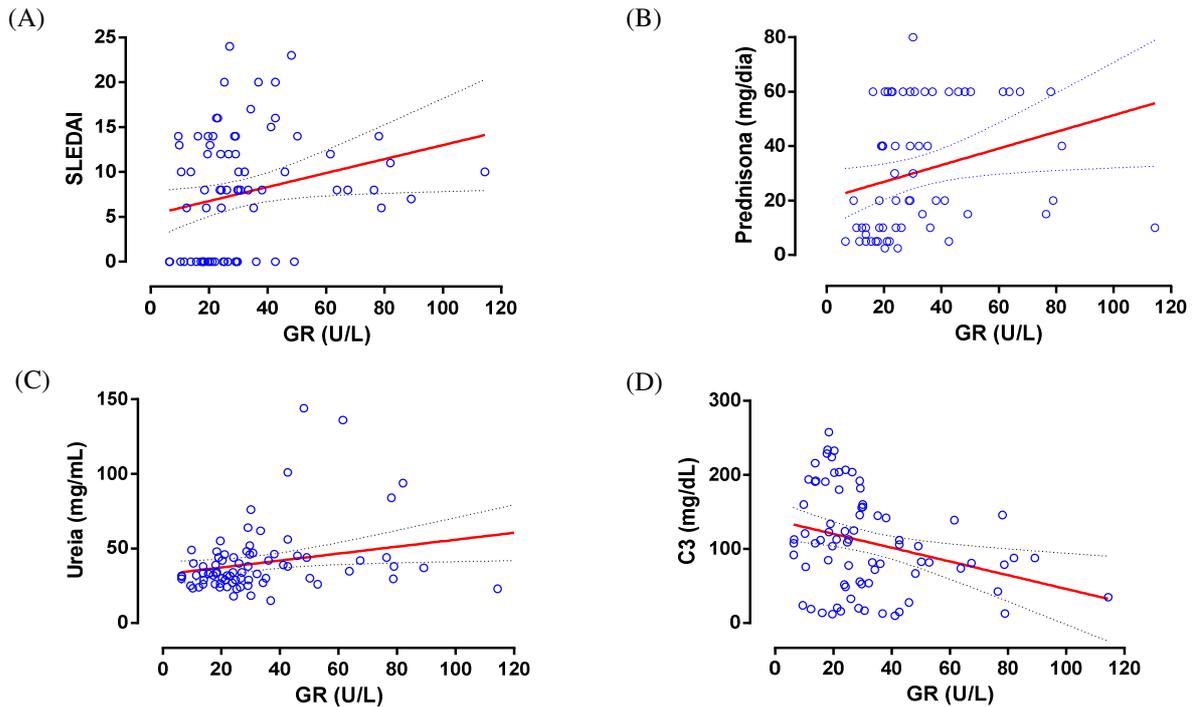


Figura 13 – Gráficos de Dispersão (análise de correlação de Spearman) entre as dosagens de GR e o SLEDAI ( $r = 0,224$  e  $p = 0,043$ ) as dosagens de prednisona ( $r = 0,285$  e  $p = 0,016$ ), as dosagens de Ureia ( $r = 0,289$  e  $p = 0,008$ ) e C3 ( $r = -0,289$  e  $p = 0,009$ ).

### 5.3.3 Estudo das Correlações do Estado Oxidante Total (TOS)

Observaram-se três correlações significativas com as dosagens de TOS. A primeira delas foi com os *scores* de SLEDAI dos pacientes ( $r = -0,391$  e  $p < 0,001$ ), seguida pela relação com as dosagens de prednisona prescritas ( $r = -0,484$  e  $p < 0,001$ ), com as dosagens séricas de creatinina ( $r = -0,382$  e  $p = 0,002$ ), de proteínas totais ( $r = 0,275$  e  $p = 0,018$ ) e, por fim, de albumina ( $r = 0,378$  e  $p = 0,003$ ). Estes resultados podem ser analisados nos Gráficos (A) a (E), respectivamente, da Figura 14.

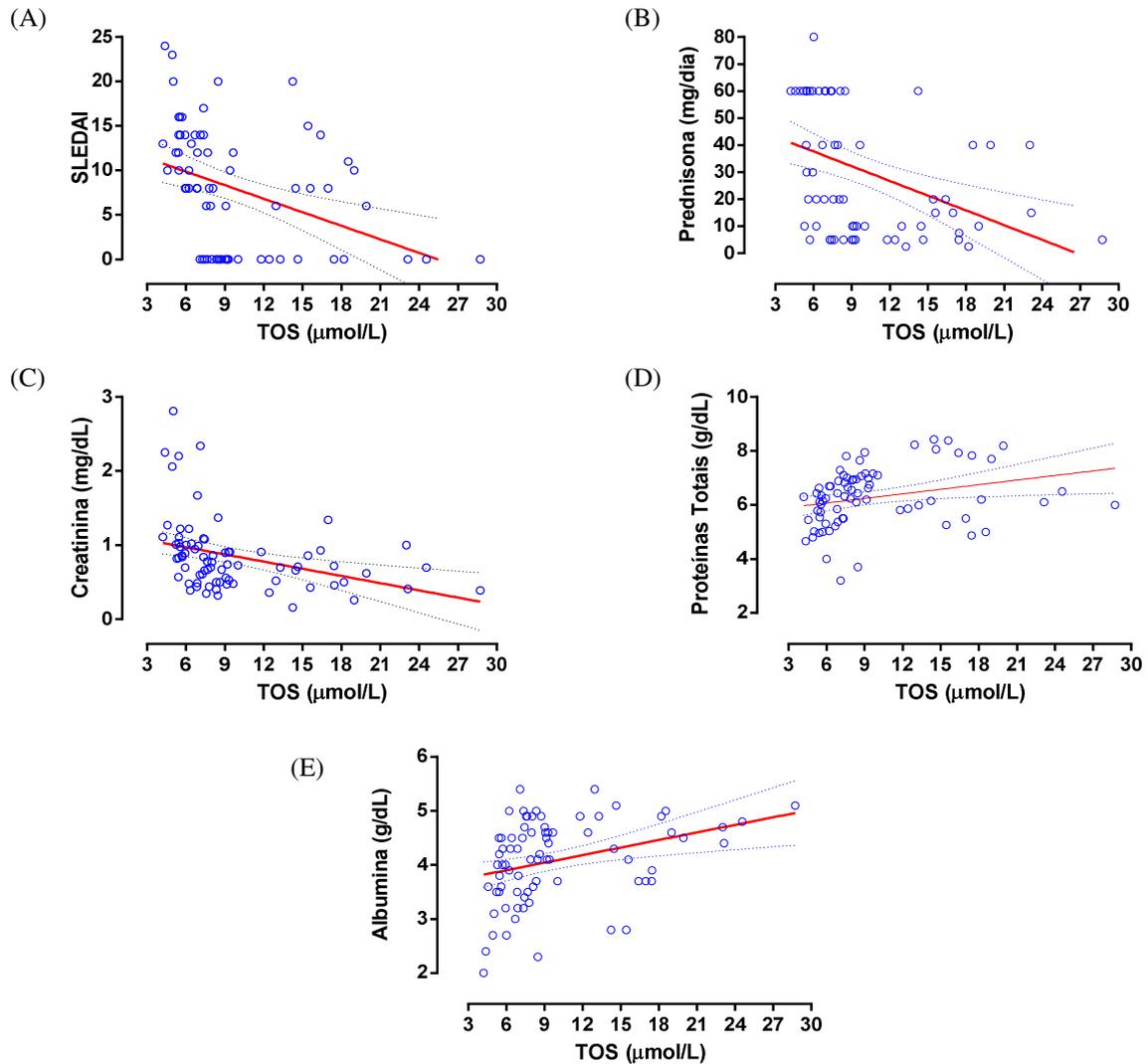


Figura 14 – Gráficos de Dispersão (análise de correlação de Spearman) entre as dosagens de TOS e o SLEDAI ( $r = -0,391$  e  $p < 0,001$ ), a concentração de Prednisona ( $r = -0,484$  e  $p < 0,001$ ) e as dosagens de Creatinina ( $r = -0,382$  e  $p = 0,002$ ), Proteínas Totais ( $r = 0,275$  e  $p = 0,018$ ) e Albumina ( $r = 0,378$  e  $p = 0,003$ ).

#### 5.3.4 Estudo das Correlações da Capacidade Antioxidante Total (TAC)

Observaram-se duas correlações significativas com as dosagens de TAC. A primeira delas foi com as dosagens séricas de creatinina ( $r = 0,400$  e  $p = 0,004$ ), seguida pela relação

com as dosagens de proteínas totais ( $r = -0,504$  e  $p < 0,001$ ). Estes resultados podem ser analisados nos Gráficos (A) e (B), respectivamente, da Figura 15.

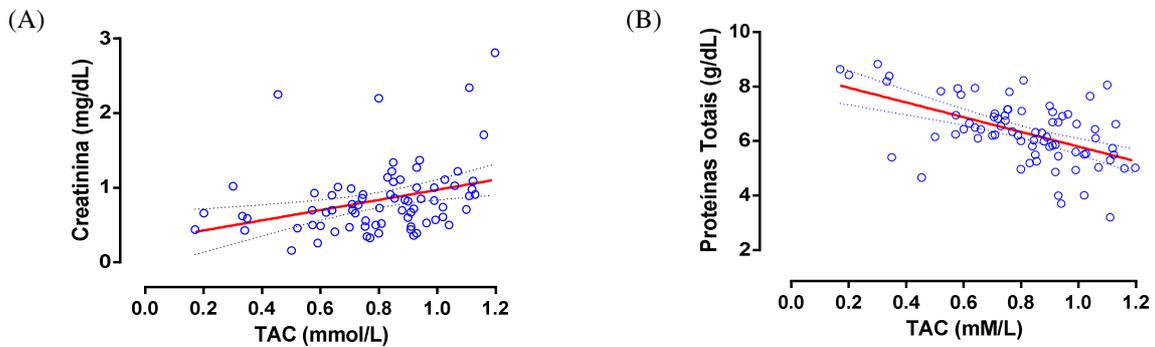


Figura 15 – Gráficos de Dispersão (análise de correlação de Spearman) entre as dosagens de TAC e as dosagens de Creatinina ( $r = 0,400$  e  $p = 0,004$ ) e Proteínas Totais ( $r = -0,504$  e  $p < 0,001$ ).

### 5.3.5 Estudo das Correlações do Índice de Estresse Oxidativo (IEO)

Observaram-se quatro correlações significativas com as determinações do IEO. A primeira delas foi com os *scores* de SLEDAI dos pacientes ( $r = -0,325$  e  $p = 0,003$ ), seguida pela relação com as dosagens de prednisona prescritas ( $r = -0,395$  e  $p < 0,001$ ), depois com as dosagens de creatinina sérica ( $r = -0,429$  e  $p = 0,002$ ), com as dosagens de proteínas totais ( $r = 0,409$  e  $p < 0,001$ ) e, por fim, com as dosagens de albumina ( $r = 0,298$  e  $p = 0,007$ ). Estes resultados podem ser analisados nos Gráficos (A) a (E), respectivamente, da Figura 16.

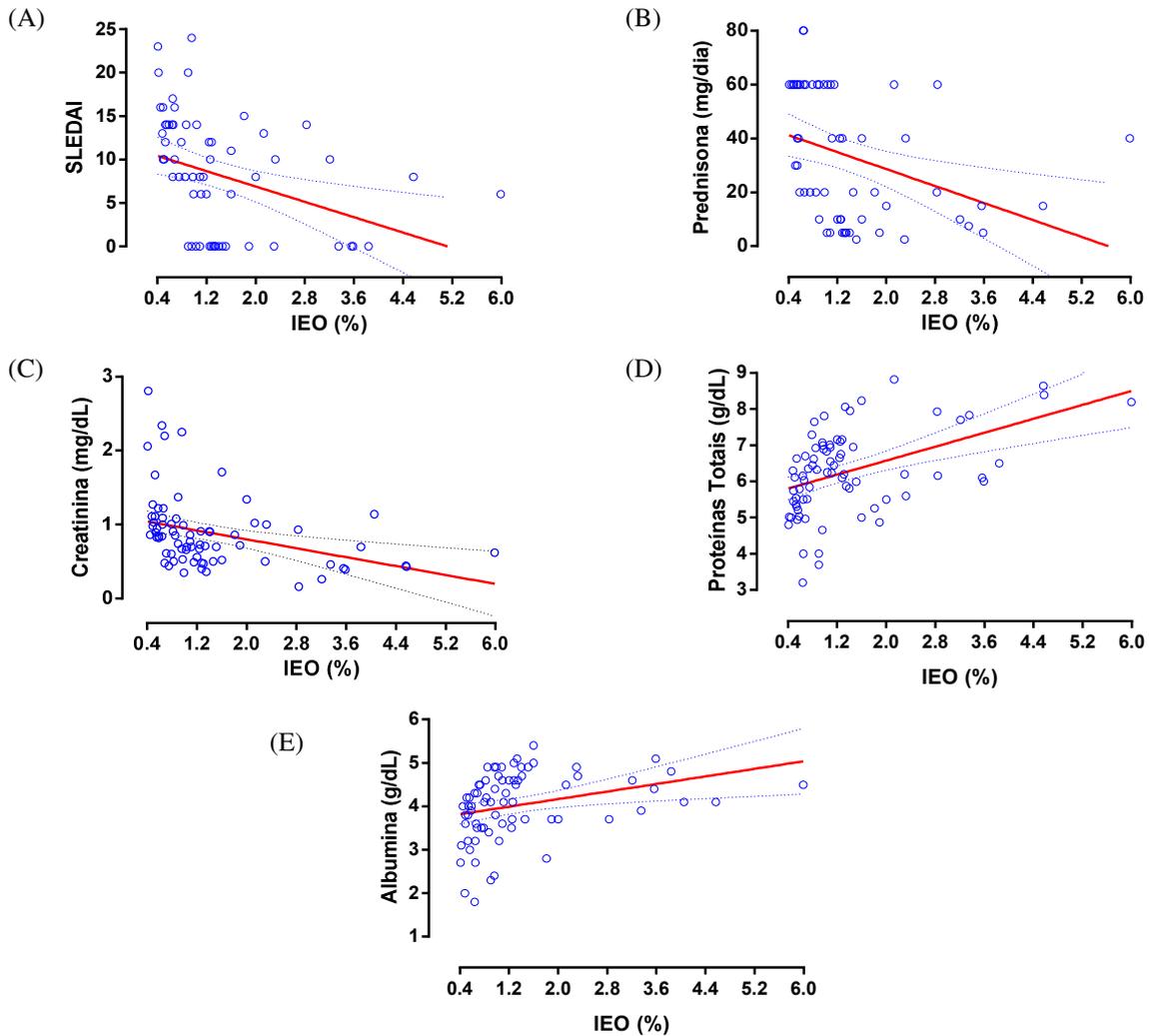


Figura 16 – Gráficos de Dispersão (análise de correlação de Spearman) entre as determinações de IEO e o SLEDAI ( $r = -0,325$  e  $p = 0,003$ ), as dosagens de prednisona ( $r = -0,395$  e  $p < 0,001$ ), as dosagens de Creatinina ( $r = -0,429$  e  $p = 0,002$ ), Proteínas Totais ( $r = 0,409$  e  $p < 0,001$ ) e Albumina ( $r = 0,298$  e  $p = 0,007$ ).

### 5.3.6 Estudo das Correlações de Tióis Totais

Observaram-se sete correlações significativas com as dosagens de Tióis Totais. A primeira delas foi com os *scores* de SLEDAI dos pacientes ( $r = -0,730$  e  $p < 0,001$ ), seguida pela relação com as dosagens de prednisona prescritas ( $r = -0,642$  e  $p < 0,001$ ), depois com as dosagens séricas de ureia ( $r = -0,316$  e  $p = 0,004$ ), com as de creatinina ( $r = -0,569$  e  $p < 0,001$ ), com as de proteínas totais ( $r = 0,454$  e  $p < 0,001$ ), com as de Albumina ( $r = 0,592$  e  $p < 0,001$ ) com as de ácido úrico ( $r = -0,255$  e  $p = 0,021$ ) e, por fim, com as concentrações de

C3 ( $r = 0,426$  e  $p < 0,001$ ). Estes resultados podem ser analisados nos Gráficos de (A) a (H), respectivamente, da Figura 17.

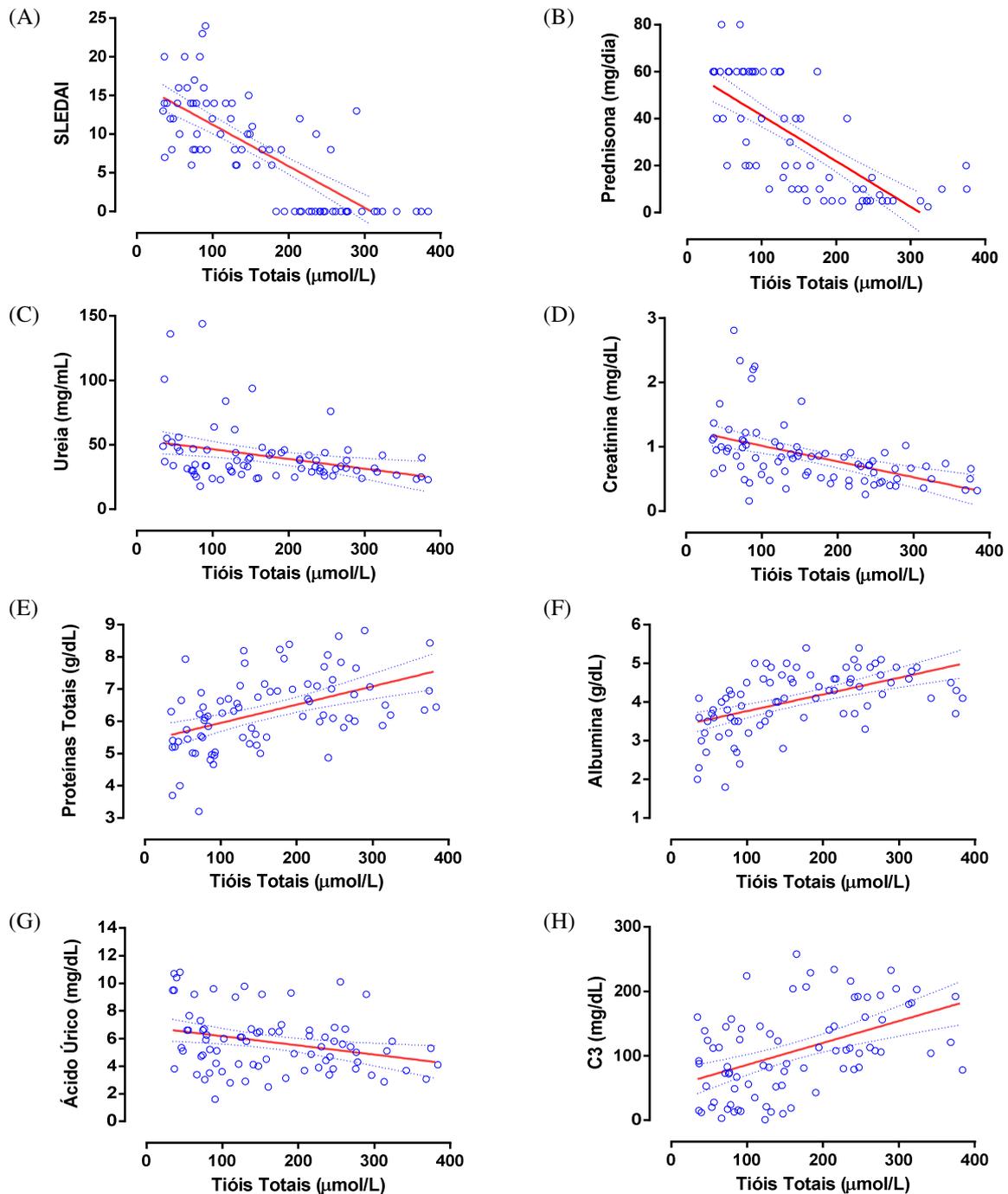


Figura 17 – Gráficos de Dispersão (análise de correlação de Spearman) entre as dosagens de Tióis Totais e o SLEDAI ( $r = -0,730$  e  $p < 0,001$ ), as dosagens de prednisona ( $r = -0,642$  e  $p < 0,001$ ), as dosagens séricas de Ureia ( $r = -0,316$  e  $p = 0,004$ ), Creatinina ( $r = -0,569$  e  $p < 0,001$ ), Proteínas Totais ( $r = 0,454$  e  $p < 0,001$ ), Albumina ( $r = 0,592$  e  $p < 0,001$ ) Ácido Úrico ( $r = -0,255$  e  $p = 0,021$ ) e C3 ( $r = 0,426$  e  $p < 0,001$ ).

### 5.2.7 Estudo das Correlações de Alantoína

Observaram-se três correlações significativas com as dosagens de Alantoína. A primeira delas foi com as dosagens séricas de ureia ( $r = 0,330$  e  $p = 0,003$ ), seguida da relação com as dosagens de creatinina ( $r = 0,257$  e  $p = 0,020$ ), com as dosagens de proteínas totais ( $r = -0,244$  e  $p = 0,027$ ), com as de albumina ( $r = -0,314$  e  $p = 0,004$ ) e, por fim, com as dosagens de ácido úrico ( $r = 0,280$  e  $p = 0,001$ ). Estes resultados podem ser analisados nos Gráficos (A) a (E), respectivamente, da Figura 18.

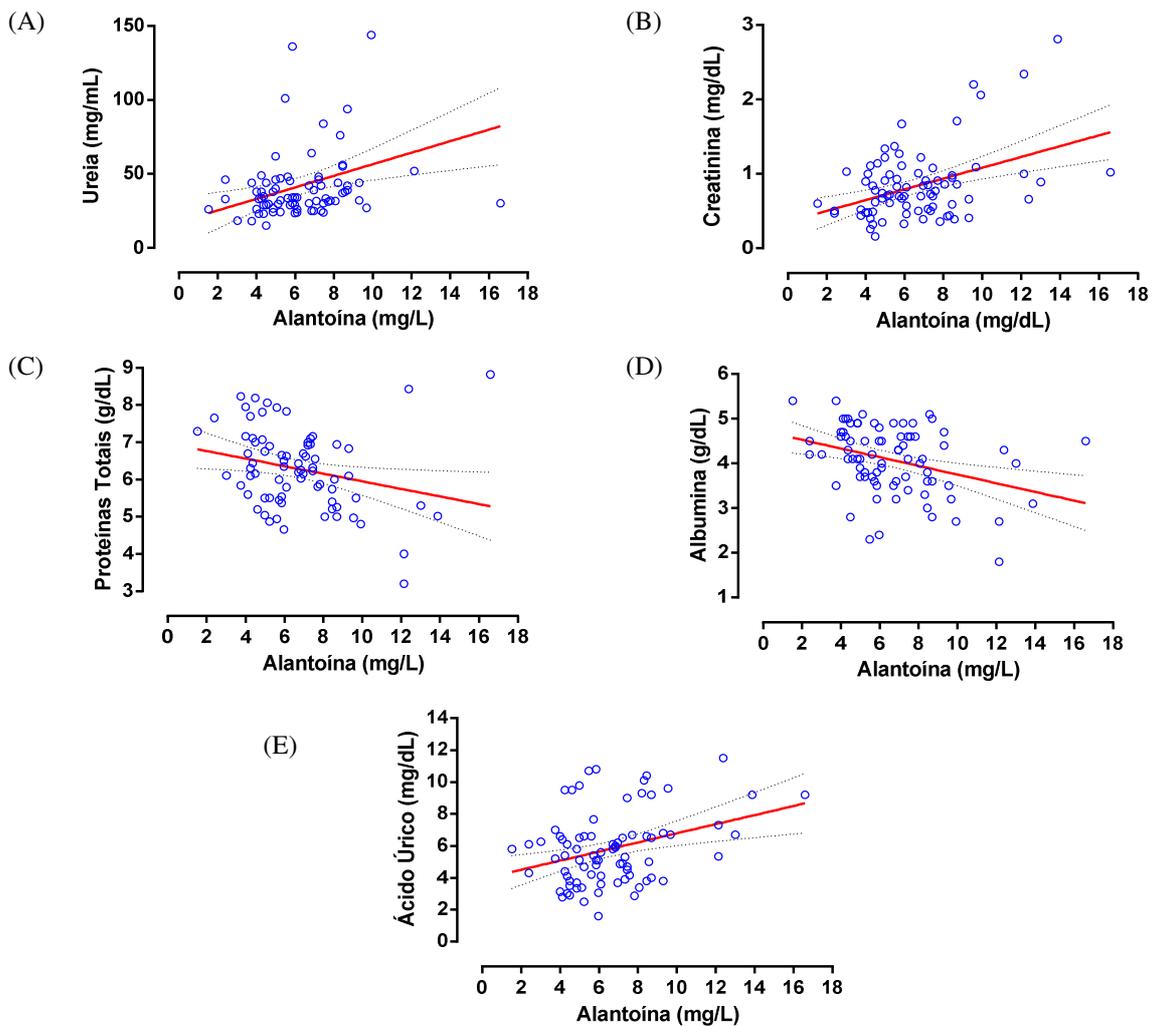


Figura 18 – Gráficos de Dispersão (análise de correlação de Spearman) entre as dosagens de Alantoína e as dosagens de Ureia ( $r = 0,330$  e  $p = 0,003$ ), Creatinina ( $r = 0,257$  e  $p = 0,020$ ), Proteínas Totais ( $r = -0,244$  e  $p = 0,027$ ), Albumina ( $r = -0,314$  e  $p = 0,004$ ) e Ácido Úrico ( $r = 0,280$  e  $p = 0,001$ ).

### 5.2.8 Estudo das Correlações de Malondialdeído (MDA)

Observaram-se duas correlações significativas com as dosagens de MDA. A primeira delas foi com os *scores* de SLEDAI dos pacientes ( $r = 0,226$  e  $p = 0,041$ ), seguida pela correlação com as dosagens de Proteínas Totais ( $r = 0,346$  e  $p = 0,002$ ). Como pode ser visto nos Gráficos (A) e (B), respectivamente, na Figura 19.

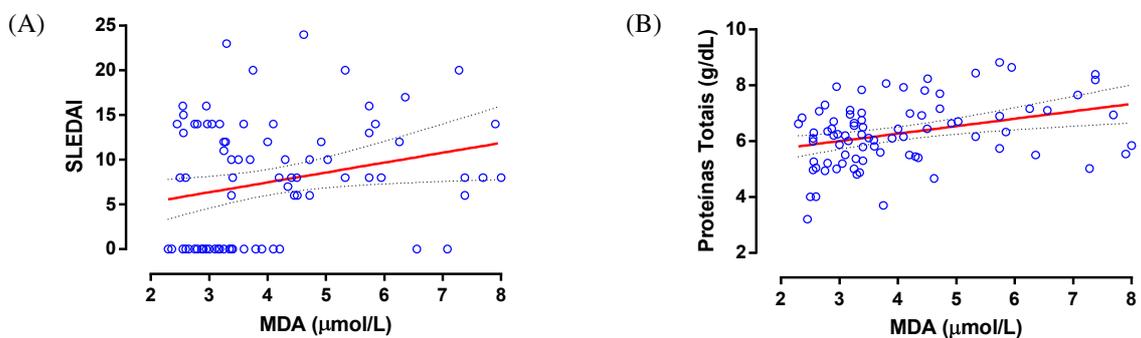


Figura 19 – Gráficos de Dispersão (análise de correlação de Spearman) entre as dosagens de MDA e o SLEDAI ( $r = 0,226$  e  $p = 0,041$ ) e as dosagens de Proteínas Totais ( $r = 0,346$  e  $p = 0,002$ ).

## 6. DISCUSSÃO

A formação de ROS e o controle enzimático e não enzimático dessas moléculas é um processo fisiológico contínuo, onde apenas a quebra do equilíbrio entre a sua formação e a atividade antioxidante pode resultar em danos celulares. (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2010).

O LES é uma doença crônica autoimune complexa com manifestação multissistêmica, onde o processo inflamatório desencadeado pelo grande número de autoanticorpos contra estruturas celulares (núcleo, membrana ou citoplasma) provoca severos danos teciduais e onde se observa a produção excessiva de ROS e que seus produtos de oxi-redução podem estar relacionados com a patogênese do LES, assim como em uma variedade de outras doenças, inclusive autoimunes (KURIEN & SCOFIELD, 2003).

Neste estudo, buscou-se avaliar a participação das espécies reativas de oxigênio no LES em diferentes estágios: remissão e em atividade com e sem lesão renal, através da dosagem de diversos marcadores de estresse oxidativo e posterior determinação das correlações destes com outros parâmetros rotineiramente utilizados no acompanhamento da evolução clínica da doença, para ampliar a compreensão do LES no que tange a avaliação de sua atividade, principalmente no que diz respeito ao dano renal.

### 6.1 Antioxidantes Enzimáticos e Não Enzimáticos

Apenas SOD e CAT não apresentaram diferença de atividade estatisticamente significativa entre os grupos de estudo, demonstrando que a atividade da doença nestes pacientes não foi suficiente para alterar a atividade destas enzimas, mesmo havendo aumento

de EO. Além disto, nenhuma correlação significativa foi encontrada entre as dosagens de SOD / CAT e os parâmetros clínicos/ laboratoriais do LES.

A atividade diminuída da SOD nos pacientes com LES em atividade poderia ser justificada por uma possível ação autoimune que esteja bloqueando a atividade desta enzima, conforme foi observado por Kurien & Scofield (2003), onde a presença de anticorpos IgG anti-SOD em pacientes com LES estava diretamente associada a uma diminuição da atividade da SOD em relação ao controle, com consequente aumento do acúmulo do ânion radical superóxido e elevação do dano oxidativo mediado por ROS.

Associado a este fator, tem-se a possibilidade da existência de infecção pelo Epstein-Barr Virus, um dos fatores envolvidos na patogênese do LES, que provoca a elevação dos títulos de anticorpos anti-SOD, segundo estudos dirigidos por Ritter et al. (1994), corroborando a afirmação de que pacientes com LES, são potenciais produtores de anticorpos contra SOD.

No que diz respeito à CAT, não houve qualquer alteração na atividade desta enzima nas amostras dos pacientes com LES em relação ao grupo sem LES, contrariamente ao que foi relatado por outros estudos que verificaram uma queda sua atividade enzimática (TAYSI et al., 2002; SHAH et al., 2010; SHAH et al., 2011).

Nos pacientes com alguma atividade lúpica (grupos NL e LA) observou-se elevação da atividade da CAT, tanto em relação aos pacientes em remissão quanto em relação àqueles sem LES, assemelhando-se ao descrito por Mansour et al. (2008). No entanto estes dados não apresentaram valor estatístico, o que implica na necessidade de ampliar o número de amostras para esta análise especificamente ou investigar a participação de anticorpos específicos para esta enzima, levando-se em consideração as observações de Mansour et al. (2008), que verificou a presença de autoanticorpos IgG em amostras sorológicas de pacientes com LES contra CAT, bem como uma correlação positiva entre a anti-CAT e anti-SOD, onde a

elevação de anticorpos contra uma das enzimas antioxidante acarretou na elevação de anticorpos contra a outra enzima, mas que a presença destes anticorpos não foram considerados a causa do estresse oxidativo instalado nestes pacientes e sim a elevada produção de ROS.

Neste estudo, quando analisada de forma global, a GPx apresentou atividade superior nos pacientes com LES em relação aos pacientes sem LES, mas dentro da faixa de normalidade determinada pelo fabricante do Kit adotado (4.171 – 10.881 U/L). No entanto, quando analisado apenas os pacientes com LES, esta atividade apresentou-se reduzida nos pacientes com LES em atividade em relação àqueles em remissão, semelhantemente ao que foi observado em estudos realizados por Taysi et al. (2002), Zhang et al. (2010) e Shah et al. (2010). Além das observações anteriores, pudemos identificar que a redução da atividade desta enzima ocorreu mais especificamente nos pacientes com lúpus ativo sem lesão renal e naqueles com lesão renal classe IV, onde a queda mais expressiva foi nos pacientes com lúpus ativo sem lesão renal.

O  $H_2O_2$  é uma ROS lipofílica que permeia membranas lipídicas e que pode ser facilmente convertido em ácido hipocloroso (HOCl) e/ou radical hidroxila ( $HO^{\bullet}$ ) pelas peroxidases presente nos fagócitos e ativadas durante o processo inflamatório presente no LES (ORTONA et al., 2008). Não se sabe ao certo qual a causa da atividade reduzida da GPx em pacientes com LES, mas tem sido sugerido que pode ser devido à inativação desta enzima pelo excesso de produção de  $H_2O_2$ . O que se sabe é que a redução na atividade de enzimas antioxidantes (SOD, GPx e CAT) associada ao aumento na atividade das peroxidases torna provável a ocorrência de danos oxidativos (SERBAN et al., 1996; ZHANG et al., 2010; SHAH et al. 2011).

A atividade da enzima GPx se correlacionou positivamente com os níveis séricos de albumina e, semelhantemente ao observado por Taysi et al. (2002), Zhang et al. (2010) e

Hassan et al. (2011), negativamente com o índice de atividade da doença (SLEDAI) dos pacientes com LES.

A atividade da GR neste estudo pareceu opor-se à da GPx quando analisada durante a atividade lúpica, ou seja, apresentou elevação nos pacientes com LES em atividade em relação àqueles em remissão, mais especificamente nos pacientes com lúpus ativo sem lesão renal e aqueles com lesão renal classe IV, onde foi mais expressiva nos pacientes com lúpus ativo sem lesão renal. Este comportamento parece estar de acordo com o esperado, já que se observa um estado oxidativo aumentado, principalmente devido ao grande consumo de tióis, cujo principal deles é a GSH, e consequente elevação na produção e oferta de GSSG, que necessita ser reduzida à GSH pela GR para que possa novamente atuar como antioxidante principalmente convertendo  $H_2O_2$  em  $H_2O$  (CECARINI et al., 2007; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2010).

Apesar de ser classificada como um antioxidante secundário, por não agir diretamente sobre os radicais livres, a GR é uma parte indispensável no processo antioxidante enzimático. No presente estudo, observou-se uma correlação positiva entre a atividade desta enzima e o índice de atividade da doença (SLEDAI), a dosagem de prednisona prescrita e os níveis séricos de ureia, além de apresentar uma correlação negativa com as concentrações séricas de C3 dos pacientes com LES. (CAROCHO & FERREIRA, 2013).

Em se tratando do consumo dos antioxidantes endógenos, os níveis séricos de tióis totais, quando analisados de forma global, apresentaram-se diminuídos nos pacientes com LES em relação aos pacientes sem LES. Já nos pacientes com LES em atividade, estes níveis apresentaram-se consideravelmente comprometidos tanto em relação àqueles em remissão quanto àqueles sem LES. Especificamente em relação aos pacientes com LES, todas as atividades lúpicas estudadas (com e sem acometimento renal) apresentaram acentuada queda na concentração de tióis, mas principalmente nos pacientes com lesão renal classe IV,

concordando com as observações de diversos autores (MORGAN et al., 2009; ZHANG et al., 2010; PÉREZ et al., 2012 e SHAH et al., 2012).

Num estudo de seguimento realizado por Morgan et al. (2007), foi demonstrado que os níveis séricos de tióis em pacientes com nefrite lúpica estão significativamente diminuídos em comparação com os pacientes sem LES. No entanto, estes níveis não variaram significativamente em relação à pacientes com LES em atividade sem comprometimento renal, demonstrando que o processo de oxidação proteica está intimamente envolvido com a lesão crônica de órgãos e concordando completamente com os dados obtidos em nosso estudo.

Além destes achados, nos pacientes com LES, observamos que as dosagens de tióis totais se correlacionaram positivamente com os níveis séricos de proteínas totais, albumina e C3, e negativamente com a dosagem de prednisona prescrita, os níveis séricos de ureia, creatinina e ácido úrico e, semelhantemente ao observado por Morgan et al. (2005), Zhang et al. (2010) e Shah et al. (2012), o índice de atividade da doença (SLEDAI).

Tewthanom et al. (2008) quando correlacionou as dosagens GSH e a atividade do LES (SLEDAI) em pacientes fazendo uso de imunossupressores e antimaláricos, também observou uma correlação negativa entre estes parâmetros, apesar de acreditar-se que esta correlação deveria ser positiva em função da diminuição da inflamação provocada pelo tratamento. O que nos leva a crer na ausência de influência do tratamento na modulação destes antioxidantes endógenos.

Serban et al. (1996) não conseguiu identificar uma correlação significativa entre os níveis de GSH e a proteinúria presente em pacientes com NL, mas nossos estudos mostraram uma boa correlação negativa das dosagens de tióis totais tanto com as dosagens de proteínas totais quanto com as de albumina, sugerindo que a dosagens séricas de proteínas, principalmente a albumina, mostram-se sensíveis à ação oxidante das ROS, possivelmente

devido ao grupamento –SH presente em sua molécula associada à excessiva perda desta proteína durante o dano renal, assim como observado por Morgan et al. (2007) e Morgan et al. (2009).

## **6.2 Balanço Oxidantes/Antioxidantes Plasmáticos**

As análises do estado oxidante total (TOS), da capacidade antioxidante total (TAC) e da determinação do índice de estresse oxidativo (IEO) são importantes na avaliação global do balanço oxidativo na doença, permitindo acompanhar a interação entre os componentes pró e antioxidantes durante os diferentes estágios do LES (remissão e atividade). No entanto, a análises de correlação realizadas neste estudo se mostrou coerente com um estado oxidante apenas quando foram confrontados pacientes lúpicos com o grupo sem LES, inviabilizando a adoção destes marcadores como monitoramento da atividade do LES.

Verificou-se neste estudo, sob uma análise geral, que os pacientes com LES apresentam uma reduzida capacidade antioxidante, frente à elevada produção de ROS, com possível capacidade reduzida para resistir aos danos oxidativos. Os pacientes com lúpus ativo sem acometimento renal e sob as condições terapêuticas no período do estudo, bem como os pacientes em remissão, refletiram com maior fidelidade o balanço oxidativo de uma doença que apresenta um processo inflamatório crônico associado a uma produção elevada de ROS e um sistema antioxidante enzimático comprometido, em consonância com as observações de Taysi et al. (2002), Nuttall et al. (2003) e Shah et al. (2012).

Uma análise mais aprofundada nos pacientes com nefrite lúpica revelou um comportamento destoante em relação aos outros pacientes, com uma elevada capacidade antioxidante, principalmente na NL Classe IV e sob uso de azatioprina, metilprednisolona, ciclofosfamida e MMF, sugerindo haver uma influência fortemente positiva do tratamento

para a nefrite no sentido de diminuir a atividade inflamatória do LES associada à atividade antioxidante do MMF, com conseqüente redução na produção de ROS e possível atenuação dos danos provocados pelo estresse oxidativo nestes pacientes (KAWAMURA et al., 1991; TURGAY et al., 2007; OATES et al., 2008; DALMARCO et al., 2009).

As dosagens de TOS e do IEO se correlacionam positivamente com os níveis séricos de proteínas totais e albumina, e negativamente com o índice de atividade da doença (SLEDAI), com a dosagem de prednisona prescrita e com os níveis séricos de creatinina. As dosagens de TAC se correlacionam positivamente com os níveis séricos de creatinina e negativamente com os níveis séricos de proteínas totais. Estes dados, também sugerem uma interferência do tratamento na inversão das correlações entre estes marcadores e as dosagens bioquímicas e o índice de atividade da doença, principalmente devido à correlação negativa entre a produção de ROS e a dosagem da prednisona administrada aos pacientes (DALMARCO et al., 2009; SHAH et al., 2012).

Poucos estudos foram realizados sobre a dosagem de alantoína em pacientes com LES. Neste estudo, observou-se que além da correlação positiva com os níveis séricos de ureia, creatinina e ácido úrico, e da correlação negativa com os níveis séricos de proteínas totais e albumina, a alantoína mostrou ser um marcador eficiente de estresse oxidativo da doença, diferenciando-se claramente nos pacientes com LES (com e sem atividade) em relação aos pacientes sem LES. No entanto esta eficiência não pôde ser reproduzida no estudo da atividade do LES, o que torna a utilização deste marcador de EO limitada a apenas identificar o estado patológico, em concordância ao que foi verificado em dois diferentes estudos realizado por Tam et al. em 2001 e em 2005, e onde as comparações entre as dosagens de alantoína entre pacientes lúpicos não apresentaram diferenças significativas.

Em relação à peroxidação lipídica, as análises realizadas neste estudo, apesar de não significativa, mostraram que os pacientes com LES apresentaram dosagens de MDA

inferiores ao grupo sem LES, o que não era esperado, haja vista as análises anteriores terem indicado um estado oxidativo nestes pacientes, levando a se esperar também haver peroxidação lipídica mais elevada nos pacientes com LES independente da atividade/remissão da doença. No entanto, Turgay et al.(2007) quando realizou um estudo onde foram selecionados pacientes com LES com e sem atividade, obteve a mesma relação entre estes pacientes e igualmente não significativa.

Já quando as análises se restringiram aos pacientes com LES apenas, ficou clara a ocorrência da elevação da peroxidação lipídica em pacientes com atividade lúpica, indicando tratar-se de um marcador eficiente para acompanhamento de atividade da doença, diferentemente do que ocorre com a alantóina e como pôde ser observado em diversos outros estudos (TAYSI et al., 2002; KURIEN & SCOFIELD, 2003; TURGAY et al., 2007; MANSOUR et al., 2008; SHAH et al., 2010; SHAH et al., 2011; SHAH et al., 2012; PÉREZ et al., 2012).

Em se tratando dos pacientes com NL, independente da classe da nefrite e do tratamento aplicado, este estudo identificou um aumento da peroxidação lipídica (MDA) em função do aumento da produção de ROS quando comparamos com os pacientes do grupo em remissão, apesar não significativo estatisticamente. Observamos ainda que esta mesma relação mostrou-se significativamente inferior em relação aos outros pacientes com LA, demonstrando que a peroxidação lipídica está presente na atividade lúpica, mas contrariamente ao que afirmaram de Shah et al. (2010) e Hassan et al. (2011), que identificaram uma elevada produção de MDA em pacientes com nefrite lúpica em relação aos que não apresentavam acometimento renal.

No que tange à expressiva diminuição da dosagem de MDA na Classe IV, isto sugere influência do tratamento por MMF exclusivo para esta Classe do Grupo NL, em sintonia ao

publicado por Herrera et al. (2006) e Turgay et al. (2007), que atribuíram ao tratamento com Micofenolato os baixos níveis de MDA dos pacientes estudados.

As dosagens de MDA nos pacientes com LES se correlacionam positivamente com o índice de atividade da doença (SLEDAI), assim como observado por Taysi et al. (2002), Shah et al. (2010), Hassan et al. (2011), Shah et al. (2011) e Shah et al. (2012), e com os níveis séricos de proteínas totais, sugerindo que a peroxidação lipídica está envolvida no agravamento do dano tecidual causado pelo LES (SHAH et al., 2011). Para reforçar esta observação, Wang et al. (2010) identificou uma forte correlação entre os níveis séricos de anticorpos anti-MDA e o índice de atividade da doença, estabelecendo uma associação entre a peroxidação lipídica, a formação de anticorpos para MDA e a atividade da doença, chegando à conclusão de que quanto maior o stress oxidativo maior a possibilidade de elevar-se o score do SLEDAI.

### **6.3 Considerações Finais e Perspectivas Futuras**

A grande variação no comportamento dos marcadores de estresse oxidativo nos pacientes lúpicos sofre influência direta do caráter multifatorial e imprevisível da doença, bem como da resposta metabólica específica de cada paciente, principalmente com o comprometimento da função renal.

O aumento do nível de peroxidação lipídica e do índice de estresse oxidativo foi mais proeminente nos pacientes com lúpus ativo sem lesão renal, enquanto que a redução do nível de tióis totais e albumina, bem como o aumento do nível de alantoína e ácido úrico se mostrou mais significativo na nefrite lúpica. Estes resultados sugerem que a atividade lúpica relaciona-se de múltiplas maneiras com os diversos marcadores de estresse oxidativo, variando inclusive conforme o órgão acometido pela doença e o tratamento aplicado, e que, independente da forma com ocorre esta relação, estudos longitudinais são necessários para

avaliar a influência do tratamento com antioxidantes como modulador do dano oxidativo nos pacientes acometidos com esta patologia.

Independente do tipo de atividade do LES, as dosagens de tióis totais demonstraram refletir de forma significativa o dano oxidativo, além de apresentar uma forte associação com a modulação do índice de atividade da doença, tornando-se uma forte candidata a estudos complementares a fim de identificar sua capacidade de desempenhar o papel de preditor da progressão da doença.

## 7. CONCLUSÕES

- 7.1 Pacientes com lúpus eritematoso sistêmico, independente do órgão-alvo e em qualquer grau da atividade da doença apresentaram alteração do estresse oxidativo, possivelmente devido a um elevado consumo de antioxidantes endógenos e reduzida atividade de antioxidantes enzimáticos.
- 7.2 Pacientes com nefrite lúpica apresentam melhora no índice de estresse oxidativo, sugerindo possível atividade antioxidante do Micofenolato de Monofetil presente no esquema terapêutico exclusivamente da nefrite lúpica classe IV.
- 7.3 Pacientes com lúpus eritematoso sistêmico com acometimento extrarrenal apresentam maior índice do estresse oxidativo e produção de malondialdeído, possivelmente devido a uma capacidade antioxidante total comprometida.
- 7.4 A alantoína mostrou ser um marcador útil na identificação do estresse oxidativo em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico, mas sem a mesma eficiência no acompanhamento da oscilação da atividade da doença.
- 7.5 Os níveis séricos de tióis totais em pacientes com nefrite lúpica relacionaram-se com fidelidade tanto com a avaliação bioquímica do dano renal, quanto com a oscilação de atividade da doença, sem sofrer interferência dos medicamentos prescritos.
- 7.6 Diversos marcadores de estresse oxidativo se relacionaram com a oscilação da atividade da doença e com a corticoterapia consagrada para o tratamento do lúpus eritematoso sistêmico, com isso novos estudos poderão aprofundar o conhecimento sobre os possíveis benefícios da inclusão de antioxidantes no protocolo de tratamento desta doença.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABU-SHAKRA, M.; Do Improved Survival Rates of Patients with SLE Reflect a Global Trend? **The Journal of Rheumatology**, v. 35, n. 10, p. 1906-1908, 2008.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121-127, 1984.

ALVES, C. M.; MARZOCCHI-MACHADO, C. M.; LOUZADA-JUNIOR, P.; AZZOLINI, A. E.; POLIZELLO, A. C.; CARVALHO, I. F.; LUCISANO-VALIM, Y. M. Superoxide Anion Production by Neutrophils is Associated with Prevalent Clinical Manifestations in Systemic Lupus Erythematosus. **Clinical Rheumatology**, v. 27, n. 7, p. 701-708, 2008.

AMERICAN COLLEGE OF RHEUMATOLOGY. **1997 Update of the 1982 American College of Rheumatology Revised Criteria for Classification of Systemic Lupus Erythematosus**, 1997. Disponível em: <<http://www.rheumatology.org/practice/clinical/classification/index.asp>>. Acesso em: 13 jan. 2011.

AMERICAN COLLEGE OF RHEUMATOLOGY. The American College of Rheumatology Nomenclature Case Definitions for Neuropsychiatric Lupus Syndromes. **Arthritis and Rheumatism**, v. 42, n. 4, p. 599-608, 1999.

ANTUNES, M. V.; LAZZARETTI, C.; GAMARO, G. D.; LINDEN, R. Estudo Pré-analítico e de Validação para Determinação de Malondialdeído em Plasma Humano por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, após Derivatização com 2,4-Dinitrofenilhidrazina. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.44, n.2, p.279-287, 2008.

APPEL, G. B.; VALERI, A. The Course and Treatment of Lupus Nephritis. **Annual Review of Medicine**, v. 45, p. 525-537, 1994.

ATMACA, G. Antioxidant Effects of Sulfur-Containing Amino Acids. **Yonsei Medical Journal**, v. 45, n. 5, p. 776-788, 2004.

AYCICEK, A.; EREL, O.; KOCYIGIT, A. Decreased Total Antioxidant Capacity and Increased Oxidative Stress in Passive Smoker Infants and their Mothers. **Pediatrics International**, v. 47, n. 1, p. 635-639, 2005.

BABIOR, B. M. Superoxide: a Two-Edged Sword. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 30, n. 2, p. 141-155, 1997.

BABIOR, B. M. Phagocytes and Oxidative Stress. **American Journal of Medicine**, v. 109, n. 1, p. 33-44, 2000.

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; DE PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse Oxidativo: Conceito, Implicações e Fatores Modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.

- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse Oxidativo: Relação entre Geração de Espécies Reativas e Defesa do Organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.
- BELLOMO, R.; AURIEMMA, S.; FABBRI, A.; D'ONOFRIO, A.; KATZ, N.; MCCULLOUGH, P. A.; RICCI, Z.; SHAW, A.; RONCO, C. The Pathophysiology of Cardiac Surgery-Associated Acute Kidney Injury (CSA-AKI). **The International Journal of Artificial Organs**, v. 31, n. 2, p. 166-178, 2008.
- BENZIE, I. F. F. Lipid Peroxidation: A Review of Causes, Consequences, Measurement and Dietary Influences. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 47, n. 3, p. 233-261, 1996.
- BOMBACK, A. S.; APPEL, G. B. Updates on the Treatment of Lupus Nephritis. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 2, n. 12, p. 2028-2035, 2010.
- BOMBARDIER, C.; GLADMAN, D. D.; UROWITZ, M. B.; CARON, D. CHANG, C. H. Derivation of the SLEDAI. A Disease Activity Index for Lupus Patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE. **Arthritis and Rheumatism**, v. 35, n. 6, p. 630-640, 1992.
- BOULÉ, M. W.; BROUGHTON, C.; MACKAY, F.; AKIRA, S.; MARSHAK-ROTHSTEIN, A.; RIFKIN, I. R. Toll-like Receptor 9-Dependent and -Independent Dendritic Cell Activation by Chromatin-Immunoglobulin G Complexes. **Journal of Experimental Medicine**, v. 199, n. 12, p. 1631-1640, 2004.
- BORBA, E. F.; LATORRE, L. C.; BRENOL, J. C. T.; KAYSER, C.; SILVA, N. A.; ZIMMERMANN, A. F.; PÁDUA, P. M.; COSTALLAT, L. T. L.; BONFÁ, E.; SATO, E. I. Consenso de Lúpus Eritematoso Sistêmico. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 48, n. 4, p. 196-207, 2008.
- BORCHERS, A. T.; KEEN, C. L.; SHOENFELD, Y.; GERSHWIN, M. E. Surviving the Butterfly and the Wolf: Mortality Trends in Systemic Lupus Erythematosus. **Autoimmunity Reviews**, v. 3, n. 6, p. 423-453, 2004.
- CARNEIRO-SAMPAIO, M.; LIPHAUS, B. L.; JESUS, A. A.; SILVA, C. A.; OLIVEIRA, J. B.; KISS, M. H. Understanding Systemic Lupus Erythematosus Physiopathology in the Light of Primary Immunodeficiencies. **Journal of Clinical Immunology**, v. 28, n. 1, p. 34-41, 2008.
- CAROCHO, M.; FERREIRA, I. C. F. R. A Review on Antioxidants, Pro-Oxidants and Related Controversy: Natural and Synthetic Compounds, Screening and Analysis Methodologies and Future Perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, v. 51, n.1, p. 15-25, 2013.
- CECARINI, V.; GEE, J.; FIORETTI, E.; AMICI, M.; ANGELETTI, M.; ELEUTERI, A. M.; KELLER, J. N. Protein Oxidation and Cellular Homeostasis: Emphasis on Metabolism. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1773, n. 2, p. 93-104, 2007.

CERVERA, R.; KHAMASHTA, M. A.; FONT, J.; SEBASTIANI, G. D.; GIL, A.; LAVILLA, P.; MEJÍA, J.C.; Aydıntug, A. O.; CHWALINSK-SADOWSKA, H.; RAMÓN, E.; FERNÁNDEZ-NEBRO, A.; GALEAZZI, M.; VALEN, M.; MATHIEU, A.; HOUSSIAU, F.; CARO, N.; ALBA, P.; RAMOS-CASALS, M.; INGELMO, M.; HUGHES, G. R. Morbidity and Mortality in Systemic Lupus Erythematosus During a 10-year Period: A comparison of early and late manifestations in a cohort of 1.000 patients. **Medicine**, v. 82, n. 5, p. 299-308, 2003.

CRANE, F. L.; LOW, H. Reactive Oxygen Species Generation at the Plasma Membrane for Antibody Control. **Autoimmunity Reviews**, v.7, n. 7, p. 518-522, 2008.

COSTA, C. M; SANTOS, R. C. C.; LIMA, E. S. A Simple Automated Procedure for Thiol Measurement in Human Serum Samples. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 42, n. 5, p. 345-350, 2006.

CUNHA, B. M.; KLUMB, E. M.; MOURA, J. Q.; SANTOS, A.; PINHEIRO, G. R. C.; ALBUQUERQUE, E. M. N.; LEVY, R. A. Frequency of Metabolic Syndrome in Patients with Lupus Nephritis. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 48, n. 5, p. 267-273, 2008.

CYBULSKY, A. V.; QUIGG, R. J.; SALANT, D. J. Experimental Membranous Nephropathy Redux. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**. v. 289, n. 4, p. 660-671, 2005.

CYBULSKY, A. V. Membranous Nephropathy. **Contributions to Nephrology**. v. 169, n. 1, p. 107-125, 2011.

DALMARCO, E. M.; BUDNI, P.; PARISOTTO, E. B.; WILHELM-FILHO, D.; FRÖDE, T. S. Antioxidant Effects of Mycophenolate Mofetil in Murine Pleurisy Model. **Transplant Immunology**, v. 22, n. 1-2, p. 12-17, 2009.

DANCHENKO, N.; SATIA, J. A.; ANTHONY, M. S. Epidemiology of Systemic lupus Erythematosus: A Comparison of Worldwide Disease Burden. **Lupus**, v. 15, n. 5, p. 308-318, 2006.

D'CRUZ, D. P.; KHAMASHTA, M. A.; HUGHES, G. R. V. Systemic Lupus Erythematosus. **Lancet**, v. 369, p. 587-596, 2007.

DEICHER, H. R.; HOLMAN, H. R.; KUNKEL, H. G. The Precipitin Reaction between DNA and a Serum Factor in Systemic Lupus Erythematosus. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 109, n. 1, p. 97-114, 1959.

DELLAVANCE, A.; GABRIEL-JÚNIOR, A.; NUCCITELLI, B.; TALIBERTI, B. H.; MÜHLEN, C. A. V.; BICHARA, C. D. A.; SANTOS, C. H. R.; BUENO, C.; YANO, C. M.; MANGUEIRA, C. L. P.; CARVALHO, D. G.; CARDOSO, E.; BONFÁ, E.; ARAÚJO, F. I.; RASSI, G. G.; MUNDIM, H. M.; BENDET, I.; REGO, J.; VIEIRA, L. M. E. A.; ANDRADE, L. E. C.; BARBOSA, M. O. F.; SUGIYAMA, M.; SANTIAGO, M. B.; SLHESSARENKO, N.; SILVA, N. A.; FRANCESCANTONIO, P. L. C.; JARACH, R.; SUDA, R.; LEVY, R. A.; SAMPAIO, S. O.; NEVES, S. P. F.; CRUVINEL, W. M.; SANTOS, W. S.; NÓBREGA, Y. K. M. 3º Consenso Brasileiro para Pesquisa de Autoanticorpos em Células Hep-2 (FAN). Recomendações para Padronização do Ensaio de Pesquisa de

Autoanticorpos em Células Hep-2, Controle de Qualidade e Associações Clínicas. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 29, n. 2, p. 89-109, 2009.

DEVASAGAYAM, T.P.; TILAK, J. C.; BOLOOR, K. K.; SANE, K. S.; GHASKADBI, S. S.; LELE, R. D. Free Radicals and Antioxidants in Human Health: Current Status and Future Prospects. **The Journal of the Association of Physicians of India**, v. 52, n. 10, p. 794-804, 2004.

DIMITROV, J. D.; VASSILEV, T. L.; ANDRE, S.; KAVERI, S.V.; LACROIX-DESMAZES, S. Functional Variability of Antibodies Upon Oxidative Processes. **Autoimmunity Reviews**, v. 7, n. 7, p. 574-578, 2008.

DOOLEY, M. A. Clinical and Laboratory Features of Lupus Nephritis. In: WALLACE, D. J.; HAHN, B. H. **Dubois' Lupus Erythematosus**. 7.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007.

DURAK, I., AKYOL, O., BASESME, E., CANBOLAT, O., KAVUTCUM, M. Reduced Erythrocyte Defense Mechanism Against Free Radical Toxicity in Patients with Chronic Renal Failure. **Nephron**, v.66, n.1, p.76-80, 1994.

ELLMAN, G. L. Tissue Sulfhydryl Groups. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 82, n. 1, p. 70-7, 1959.

ENGLISH, D.; ANDERSEN, B. R. Single-step Separation of Red Blood Cells, Granulocytes and Mononuclear Leukocytes on Discontinuous Density Gradient of Ficoll-Hypaque. **Journal of Immunological Methods**, v. 5, n. 3, p. 249-252, 1974.

ESDAILE, J. M.; ABRAHAMOWICZ, M.; MACKENZIE, T.; HAYSLETT, J. P.; KASHGARIAN, M. The Time-Dependence of Long-Term Prediction in Lupus Nephritis. **Arthritis and Rheumatism**, v. 37, n. 3, p. 359-368, 1994.

EVANS MD, COOKE MS, AKIL M, SAMANTA A, LUNEC J. Aberrant Processing of Oxidative DNA Damage in Systemic Lupus Erythematosus. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 273, n. 3, p. 894-898, 2000.

EREL, O. A Novel Automated Direct Measurement Method for Total Antioxidant Capacity using a New Generation, More Stable ABTS Radical Cation. **Clinical Biochemistry**, v. 37, n. 4, p. 277-285, 2004.

EREL, O. A New Automated Colorimetric Method to Measuring Total Oxidant Status. **Clinical Biochemistry**, v. 38, n. 12, p. 1103-1111, 2005.

FAULK, W. P.; McINTYRE, J. A. Prologue to Autoimmunity Forum: Autoimmunity Reviews on Redox Signaling. **Autoimmunity Reviews**, v. 7, n. 7, p. 515-517, 2008.

FAURSCHOU, M.; STARKLINT, H.; HALBERG, P.; JACOBSEN, S. Prognostic Factors in Lupus Nephritis: Diagnostic and Therapeutic Delay Increases the Risk of Terminal Renal Failure. **The Journal of Rheumatology**, v. 33, n. 8, p. 1563-1569, 2006.

FERNANDEZ, D.; PERL, A. Metabolic Control of T Cell Activation and Death in SLE. **Autoimmunity Reviews**, v.8, n. 3, p.184-189, 2009.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais Livres: Conceitos, Doenças Relacionadas, Sistema de Defesa e Estresse Oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p.61-68, 1997.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, Oxidative Stress and the Biology of Ageing. **Nature**, v. 408, n. 6809, p. 239-247, 2000.

FROSTEGARD, J.; SVENUNGSSON, E.; WU, R.; GUNNARSSON, I.; LUNDBERG, I. E.; KLARESKOG, L.; HÖRKKÖ, S.; WITZTUM, J. L. Lipid Peroxidation is Enhanced in Patients with Systemic Lupus Erythematosus and is Associated with Arterial and Renal Disease Manifestations. **Arthritis & Rheumatism**, v. 52, n. 1, p. 192-200, 2005.

FRIOU, G. J. Clinical Application of Lupus Serum-Nucleoprotein Reaction using Fluorescent Antibody Technique. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 36, n. 1, p. 890-892, 1957.

GAERTNER, S. A.; JANSSEN, U.; OSTENDORF, T.; KOCH, K. M.; FLOEGE, J.; GWINNER, W. Glomerular Oxidative and Antioxidative Systems in Experimental Mesangioproliferative Glomerulonephritis. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 13, n. 12, p. 2930-2937, 2002.

GIL, L. V. Oxidative stress in aging: Theoretical outcomes and clinical evidences in humans, **Biomedicine & Pharmacotherapy** (2010). DOI: 10.1016/j.biopha.2010.09.010. Disponível em <[http://www.sciencedirect.com/science/article/B6VKN-513DTN59/2/1a03\\_2d55b2038c9c29da00b6022e642b](http://www.sciencedirect.com/science/article/B6VKN-513DTN59/2/1a03_2d55b2038c9c29da00b6022e642b)>. Acesso em 06 abr. 2011.

GLADMAN, D. D.; DOMINIQUE, I.; UROWITZ, M. B. Systemic Lupus Erythematosus Disease - Activity Index 2000. **The Journal of Rheumatology**, v. 29, n. 2, p. 288-291, 2002.

GORDON, C.; LI, C. K.; ISENBERG, D. A. Systemic Lupus Erythematosus. **Medicine**, v. 38, n. 2, p. 73-80, 2009.

GRIFFITHS, B.; MOSCA, M.; GORDON, C. Assessment of Patients with Systemic Lupus Erythematosus and the Use of Lupus Disease Activity Indices. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**, v. 19, n. 5, p. 685-708, 2005.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**, 4.ed. New York: Oxford University Press Inc., 2010.

HARGRAVES, M. M.; RICHMOND, H.; MORTON, R. Presentation of Two Bone Marrow Elements: The tart cell and the LE cell. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 23, n. 2, p. 25-28, 1948.

HARRISON, R. Physiological Roles of Xanthine Oxidoreductase. **Drug Metabolism Reviews**, v. 36, n. 2, p. 363-375, 2004.

HERRERA, J.; FERREBUZ, A.; MACGREGOR, E. G.; RODRIGUEZ-ITURBE, B. Mycophenolate mofetil treatment improves hypertension in patients with psoriasis and

rheumatoid arthritis. **Journal of the American Society of Nephrology**. v. 12, n. 3, p. 218-225, 2006.

HOCHBERG, M. C. Updating the American College of Rheumatology Revised Criteria For The Classification of Systemic Lupus Erythematosus [Letter]. **Arthritis and Rheumatism**, v. 40, n. 9, p. 1725, 1997.

HOCHBERG, M. C. The History of Lupus Erythematosus. 2003. Disponível em: <[http://www.lupus.org/webmodules/webarticlesnet/templates/new\\_learnunderstanding.aspx?articleid=1520&zoneid=523](http://www.lupus.org/webmodules/webarticlesnet/templates/new_learnunderstanding.aspx?articleid=1520&zoneid=523)>. Acesso em: 14 jan. 2011.

HOLUBAR, K. History of Lupus Erythematosus. **Acta Dermatovenereologica Alpina, Pannonica et Adriatica**, v. 15, n. 4, p. 191-194, 2006.

HOUSSIAU, F.A.; VASCONCELOS, C.; D'CRUZ, D.; SEBASTIANI, G. D.; GARRIDO, E. E. R.; DANIELI, M. G.; ABRAMOVICZ, D.; BLOCKMANS, D.; MATHIEU, A.; DRESKENELI, H.; GALEAZZI, M.; GÜL, A.; LEVY, Y.; PETERA, P.; POPOVIC, R.; PEREIRA, I. R. O.; BERTOLAMI, M. C.; FALUDI, A. A.; CAMPOS, M. F.; FERDERBAR, S.; LIMA, E. S.; ALDRIGHI, J. M.; ABDALLA, D. S. P. Lipid Peroxidation and Nitric Oxide Inactivation in Postmenopausal Women. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 80 n. 4, 2003.

HU, M. L. Measurement of Protein Thiol Groups and Glutathione in Plasma. **Methods in Enzymology**, v. 233, n. 1, p. 380-5, 1994

JONES, D. P. Radical-Free Biology of Oxidative Stress. **American Journal of Physiology Cell Physiology**. v. 295, n. 4, p. C849-C868, 2008.

KAWAMURA, T.; YOSHIOKA, T.; BILLS, T.; FOGO, A.; ICHIKAWA, I. Glucocorticoid Activates Glomerular Antioxidant Enzymes and Protects Glomeruli from Oxidant Injuries. **Kidney International**, v. 40, n. 2, p. 291-301, 1991.

KELLEY, E. E.; KHOO, N. K. H.; HUNDLEY, N. J.; MALIK, U. Z.; FREEMAN, B. A.; TARPEY, M. M. Hydrogen Peroxide is the Major Oxidant Product of Xanthine Oxidase. **Free Radical Biogical & Medicine**, v.48, n. 4, p.493-498, 2010.

KLEMPERER, P.; POLLACK, A. D.; BAEHR, G. Pathology of Disseminated Lupus Erythematosus. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 32, n. 1, p. 569-631, 1941.

KORBET, S. M.; LEWIS, E. J.; SCHWARTZ, M. M.; REICHLIN, M.; EVANS, J.; ROHDE, R. D. Factors Predictive of Outcome in Severe Lupus Nephritis. Lupus Nephritis Collaborative Study Group. **American Journal of Kidney Disease**, v. 35, n. 5, p. 904-914, 2000.

KURIEN, B.T.; SCOFIELD, R. H. Free Radical Mediated Peroxidative Damage in Systemic Lupus Erythematosus. **Life Scices**, v. 73, n. 13, p.1655-1666, 2003.

KURIEN, B. T.; SCOFIELD, R. H. Lipid Peroxidation in Systemic Lupus Erythematosus. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 44, n. 1, p. 349-356, 2006a.

KURIEN, B. T.; SCOFIELD, R. H. Autoantibody Determination in the Diagnosis of Systemic Lupus Erythematosus. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 64, n. 3, p 227-235, 2006b.

LAHITA, R. G. The Clinical Presentation of Systemic Lupus Erythematosus. In: LAHITA, R. G. **Systemic Lupus Erythematosus**. 4.ed. New York: Academic Press, 2004.

LI, C. K.; ISENBERG, D. A. Systemic Lupus Erythematosus. **Medicine - Autoimmune Diseases**, v. 34, n. 11, p. 445-452, 2006.

LIANG, M. H.; SOCHER, S. A.; LARSON, M. G.; SCHUR, P. H. Reliability and Validity of Six Systems for the Clinical Assessment of Disease Activity in Systemic Lupus Erythematosus. **Arthritis and Rheumatology**, v. 32, n. 9, p. 1107-1118, 1989.

LIMA, E. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação Lipídica: Mecanismos e Avaliação em Amostras Biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.37, n.3, p.293-303, 2001.

LIPHAUS, B. L.; KISS, M. H. The Role of Apoptosis Proteins and Complement Components in the Etiopathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus. **Clinics (São Paulo, Brasil)**, v. 65, n. 3, p. 327-333, 2010.

LIU, H.; TIAN, N.; ARANY, I.; BIGLER, S. A.; WAXMAN, D. J.; SHAH, S. V.; BALIGA, R. Cytochrome P450 2B1 Mediates Complement-Dependent Sublytic Injury in a Model of Membranous Nephropathy. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 285, n. 52, p. 40901-40910, 2010.

LUPUS FOUNDATION OF AMERICA, **Statistics on Lupus**. Disponível em: <[http://www.lupus.org/webmodules/webarticlesnet/templates/new\\_newsroomreporters.aspx?articleid=247&zoneid=60](http://www.lupus.org/webmodules/webarticlesnet/templates/new_newsroomreporters.aspx?articleid=247&zoneid=60)>. Acesso em: 08 jan. 2011.

MAK, A.; MOK, C. C.; CHU, W. P.; TO, C. H.; WONG, S. N.; AU, T. C. Renal Damage In Systemic Lupus Erythematosus: A Comparative Analysis of Different Age Groups. **Lupus**, v. 16, n. 1, p. 28-34, 2007.

MANNIK, M.; MERRILL, C. E.; STAMPS, L. D.; WENER, M. H. Multiple Autoantibodies Form the Glomerular Immune Deposits in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. **The Journal of Rheumatology**, v. 30, n. 7, p. 1495-1504, 2003.

MANSOUR, R. B.; LASSOUED, S.; GARGOURI, B.; EL GAÏD, A.; ATTIA, H.; FAKHFAKH F. Increased Levels of Autoantibodies Against Catalase and Superoxide Dismutase Associated with Oxidative Stress in Patients with Rheumatoid Arthritis and Systemic Lupus Erythematosus. **Scandinavian Journal of Rheumatology**, v. 37, n. 2, p. 103-108, 2008.

MARTO, N.; BERTOLACCINI, M. L.; CALABUIG, E.; HUGHES, G. R.; KHAMASHTA, M. A. Anti-C1q Antibodies in Nephritis: Correlation Between Titres and Renal Disease Activity and Positive Predictive Value in Systemic Lupus Erythematosus. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 64, n. 3, p. 444-48, 2005.

MATRAT, A.; VEYSSEYRE-BALTER, C.; TROLLIET, P.; VILLAR, E.; DIJOURD, F.; BIENVENU, J.; FABIEN, N. Simultaneous Detection of Anti-C1q and Anti-Double Stranded DNA Autoantibodies in Lupus Nephritis: Predictive Value for Renal Flares. **Lupus**, v. 20, n. 1, p. 28-34, 2011.

McGRATH, L. T.; DOUGLAS, A. F.; McCLEAN E.; BROWN J. H.; DOHERTY, C. C.; JOHNSTON, G. D.; ARCHBOLD, G. P. R. Oxidative stress and erythrocyte membrane fluidity in patients undergoing regular dialysis. *Clinica Chimica Acta*, v. 235, n. 2, p. 179-188, 1995.

MEINÃO, I. M.; SATO, E. I. Lúpus Eritematoso Sistêmico de Início Tardio. **Einstein (São Paulo)**, v. 6, n. 1, p. 40-47, 2008.

MELO, A. K. G.; AVELAR, A. B.; MAEGAWA, F. K. M.; SOUZA, B. D. B. Avaliação de 100 pacientes com nefrite lúpica acompanhados por dois anos. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 49, n. 1, p. 8-19, 2009.

MILLER, N. J.; RICE-EVANS, C.; DAVIES, M. J.; GOPINATHAN, V.; MILNER, A. A Novel Method for Measuring Antioxidant Capacity and its Application to Monitoring the Antioxidant Status in Premature Neonates. **Clinical Science**, v. 84, n. 4, p. 407-412, 1993.

MOHANTY, J. G.; JAFFE, J. S.; SCHULMAN, E. S.; RAIBLE, D. G. A Highly Sensitive Fluorescent Micro-Assay 9f H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Release from Activated Human Leukocytes Using a Dihydroxyphenoxazine Derivative. **Journal of Immunological Methods**, v. 202, n. 2, p. 133-141, 1997.

MOK, C. C. Prognostic Factors in Lupus Nephritis. **Lupus**, v. 14, n. 1, p. 39-44, 2005.

MOLOKHIA, M.; HOGGART, C.; PATRICK, A. L.; SHRIVER, M.; PARRA, E.; YE, J. SILMAN, A. J.; MCKEIGUE, P. M. Relation of Risk of Systemic Lupus Erythematosus to West African Admixture in a Caribbean Population. **Human Genetics**, v. 112, n. 3, p. 310-318, 2003.

MORGAN, P. E.; STURGESS, A. D.; DAVIES, M. J. Increased Levels of Serum Protein Oxidation and Correlation with Disease Activity in Systemic Lupus Erythematosus. **Arthritis and Rheumatism**, v. 52, n. 7, p. 2069-2079, 2005.

MORGAN, P. E.; STURGESS, A. D.; HENNESSY, A.; DAVIES, M. J. Serum Protein Oxidation and Apolipoprotein CIII Levels in People with Systemic Lupus Erythematosus with and without Nephritis. **Free Radical Research**, v. 41, n. 1, p. 1301-1312, 2007.

MORGAN, P. E.; STURGESS, A. D.; DAVIES, M. J. Evidence for Chronically Elevated Serum Protein Oxidation in Systemic Lupus Erythematosus Patients. **Free Radical Research**, v. 43, n. 2, p. 117-127, 2009.

MORONI, G.; RADICE, A.; GIAMMARRESI, G.; QUAGLINI, S.; GALLELLI, B.; LEONI, A.; VECCHI, M. L.; MESSA, P. SINICO, R. A. Are Laboratory Tests Useful for Monitoring The Activity of Lupus Nephritis? A 6-Year Prospective Study in a Cohort of 228 Patients with Lupus Nephritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 68, n. 2, 9. 234-237, 2009.

MOROVIC-VERGLES, J.; SALAMON, L. Lupus Nephritis. **Reumatizam**, v. 56, n. 2, p. 34-40, 2009.

MURATSUBAKI, H.; ENOMOTO, K.; SOEJIMA, A.; SATAKE, K. An enzyme cycling method for measurement of allantoin in human serum. **Analytical Biochemistry**, v.378, n. 1, p.65-70, 2008.

NUTTALL, S. L.; HEATON, S.; PIPER, M. K., MARTIN, U.; Gordon, C. Cardiovascular Risk in Systemic Lupus Erythematosus – Evidence of Increased Oxidative Stress and Dyslipidaemia. **Rheumatology (Oxford)**, v. 42, n. 6, p. 758–762, 2003.

OATES, J. C.; SHAFTMAN, S. R.; SELF, S. E.; GILKESON, G. S. Association of Serum Nitrate and Nitrite Levels with Longitudinal Assessments of Disease Activity and Damage in Systemic Lupus Erythematosus and Lupus Nephritis. **Arthritis and Rheumatism**, v. 58, n. 1, p. 263-272, 2008.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for Lipid Peroxides in Animal Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 351-358, 1979.

OLIVEIRA, R. A. G. Eritrograma nas Principais Anemias. In: \_\_\_\_\_. **Hemograma: Como Fazer e Interpretar**. São Paulo: Livraria Médica Paulista Editora, 2007a.

OLIVEIRA, R. A. G. O Leucograma na Clínica. In: \_\_\_\_\_. **Hemograma: Como Fazer e Interpretar**. São Paulo: Livraria Médica Paulista Editora, 2007b.

OLIVEIRA, R. A. G. A Contagem de Plaquetas na Clínica. In: \_\_\_\_\_. **Hemograma: Como Fazer e Interpretar**. São Paulo: Livraria Médica Paulista Editora, 2007c.

OLIVER, J. E.; SILMAN, A. J. Why are Women Predisposed to Autoimmune Rheumatic Diseases?. **Arthritis Research & Therapy**, v. 11, n. 5, p. 252-260, 2009.

ORTEGA, L. M.; SCHULTZ, D. R.; LENZ, O.; PARDO, V.; CONTRERAS, G. N. Review: Lupus Nephritis: Pathologic Features, Epidemiology and a Guide to Therapeutic Decisions. **Lupus**, v. 19, n. 5, p. 557-574, 2010.

ORTONA, E.; MARGUTTI, P.; MATARRESE, P.; FRANCONI, F.; MALORNI, W. Redox State, Cell Death and Autoimmune Diseases: A Gender Perspective. **Autoimmunology Reviews**, v.7, n.1, p. 579–584, 2008.

PAGLIA, D. E; VALENTINE, W. N. Studies on the Quantitative and Qualitative Characterization of Erythrocyte Glutathione Peroxidase. **Journal Laboratory Clinical Medical**, v. 70, p. 158-169, 1967.

PASSOS, L. F. S. Apoptosis and SLE: Another Piece in the Puzzle. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v.37, n. 6, p. 327-334,1997.

PERRICONE, C.; DE CAROLIS, C.; PERRICONE, R. Glutathione: A Key Player in Autoimmunity. **Autoimmunity Reviews**, v. 8, n. 8, p. 697-701, 2009.

PÉREZ, Y. G.; PÉREZ, L. C. G.; NETTO, R. C. M.; LIMA, D. S. N.; LIMA, E. S. Malondialdehyde and Sulfhydryl Groups as Biomarkers of Oxidative Stress in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 52, n. 4, p. 656-660, 2012.

PERL, A. Emerging New Pathways of Pathogenesis and Targets for Treatment in Systemic Lupus Erythematosus and Sjogren's Syndrome. **Current Opinion in Rheumatology**, v. 21, n. 5, p. 443-447, 2009.

PETRI, M. Review of Classification Criteria for Systemic Lupus Erythematosus. **Rheumatic Disease Clinic of North America**, v. 31, n. 2, p. 245-254, 2005.

PETRI, M. Systemic Lupus Erythematosus: 2006 Update. **Journal of Clinical Rheumatology: Practical Reports on Rheumatic & Musculoskeletal Disease**, v. 12, n. 1, p. 37-40, 2006.

PONS-ESTEL, G. J.; ALARCÓN, G. S.; SCOFIELD, L.; REINLIB, L.; COOPER, G. S. Understanding the Epidemiology and Progression of Systemic Lupus Erythematosus. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 39, n. 4, p. 257-268, 2010.

RAHMAN, A.; ISENBERG, D. A. Systemic Lupus Erythematosus: Mechanisms of Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 358, n. 9, p. 929-939, 2008.

RAMSEY-GOLDMAN, R.; ISENBERG, D. A. Systemic Lupus Erythematosus Measures. **Arthritis & Rheumatism**, v. 49, n. 5, p. 225-233, 2003.

RITTER, K.; KÜHL, R. J.; SEMRAU, F.; EIFFERT, H.; KRATZIN, H. D.; THOMSEN, R. Manganese Superoxide Dismutase as a Target of Autoantibodies in Acute Epstein-Barr Virus Infection. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 180, n. 5, p. 1995-1998, 1994.

ROSNER, S.; GINZLER, E. M.; DIAMOND, H. S.; WEINER, M.; SCHLESINGER, M.; FRIES, J. F.; WASNER, C.; MEDSGER-JR, T. A.; ZIEGLER, G.; KLIPPEL, J. H.; HADLER, N. M.; ALBERT, D. A.; HESS, E. V.; SPENCER-GREEN, G.; GRAYZEL, A.; WORTH, D.; HAHN, B. H.; BARNETT, E. V. A Multicenter Study of Outcome in Systemic Lupus Erythematosus. II. Causes of Death. **Arthritis & Rheumatism**, v. 25, n. 6, p. 612-617, 1982.

ROVENSKÝ, J.; TUCHYNOVÁ, A. Systemic Lupus Erythematosus in the Elderly. **Autoimmunity Reviews**, v. 7, n. 3, p. 235-239, 2008.

ROVER-JÚNIOR, L.; HOEHR, N. F.; VELLASCO, A. P.; KUBOTA, L. T. Sistema Antioxidante Envolvendo o Ciclo Metabólico da Glutaciona Associado a Métodos Eletroanalíticos na Avaliação do Estresse Oxidativo. **Química Nova**, v. 24, n. 1, 2001.

RUMORE, P. M.; STEINMAN, C. R. Endogenous Circulating DNA in Systemic Lupus Erythematosus. Occurrence as Multimeric Complexes Bound to Histone. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 86, n. 1, p. 69-74, 1990.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

SELIGMAN, V. A.; LUM, R. F.; OLSON, J. L.; LI, H.; CRISWELL, L. A. Demographic Differences in the Development of Lupus Nephritis: A Retrospective Analysis. **The American Journal of Medicine**, v. 112, n. 9, p. 726-729, 2002.

SENTHILKUMAR, S.; DEVAKI, T.; MANOHAR, B. M.; BABU, M. S. Effect of Squalene on Cyclophosphamide-Induced Toxicity. **Clinica Chimica Acta**, v. 364, n. 1-2, p. 335-342, 2006.

SERBAN, M. G.; TĂNĂSEANU, S.; BĂRĂ, C. Oxidant Stress and Antioxidant Protection in Lupus Nephropathy. **Romanian Journal of Internal Medicine**, v. 34, n. 1-2, p. 105-109, 1996.

SHAH, D.; KIRAN, R.; WANCHU, A.; BHATNAGAR, A. Oxidative Stress in Systemic Lupus Erythematosus: Relationship to Th1 Cytokine and Disease Activity **Immunology Letters**, v. 129, n. 1, p. 7-12, 2010.

SHAH, D.; WANCHU, A.; BHATNAGAR, A. Interaction Between Oxidative Stress and Chemokines: Possible Pathogenic Role in Systemic Lupus Erythematosus and Rheumatoid Arthritis. **Immunobiology**, v. 216, p. 1010-1017 n. 9, 2011.

SHAH, D.; SAH, S.; WANCHU, A.; WU, M. X.; BHATNAGAR, A. Altered Redox State and Apoptosis in the Pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus. **Immunobiology**. 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0171298512001945>>. Acesso em: 29 out. 2012.

SHMERLING, R. H. Autoantibodies in Systemic Lupus Erythematosus - There before You Know It [Perspective]. **New England Journal of Medicine**, v. 349, n. 16, p. 1499-1450, 2003.

SIDIROPOULOS, P. I.; KRITIKOS, H. D.; BOUMPAS, D. T. Lupus Nephritis Flares. **Lupus**, v. 14, n. 1, p. 49-52, 2005.

SIES, H. Oxidative Stress: Introductory Remarks. In: \_\_\_\_\_. **Oxidative Stress**. London: Academic Press, 1985.

SILVEIRA, L. R. Considerações Críticas e Metodológicas na Determinação de Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio em Células Musculares Durante Contrações. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, vol.48, n.6, p. 812-822, 2004.

SINGH, R. R.; DUBEY, S. Autoantigens and Defects in Immune Tolerance in Lupus: Immune Tolerance. In: WALLACE, D. J.; HAHN, B. H. **Dubois' Lupus Erythematosus**. 7.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007.

SMITH, P. P.; GORDON, C. Systemic Lupus Erythematosus: Clinical Presentations. **Autoimmunity Reviews**, v. 10, n. 1, p. 43-45, 2010.

SOUZA, A. W. S.; MESQUITA-JR, D.; ARAÚJO, J. A. P.; CATELAN, T. T. T.; CRUVINEL, W. M.; ANDRADE, L. E. C.; SILVA, N. P. Sistema Imunitário: Parte III. O Delicado Equilíbrio do Sistema Imunológico entre os Pólos de Tolerância e Autoimunidade. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 6, p. 665-694, 2010.

SUTTON, M.; BOUHASSIRA, E. E.; NAGEL, R. L. Polymerase Chain Reaction Amplification Applied to the Determination of  $\beta$ -Like Globin Gene Cluster Haplotypes. **American Journal of Hematology**, v. 32, n.1, p.66-69, 1989.

SUZUKI, Y.; LEHRER, R. I. NAD(P)H Oxidase Activity in Human Neutrophils Stimulated by Phorbol Myristate Acetate. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 66, n. 6, p. 1409-1418, 1980.

SYMMONS, D. P. M.; COPPOCK, J. S.; BACON, P. A.; BRESNIHAN, B.; ISENBERG, D. A.; MADDISON, P.; MCHUGH, N.; SNAITH, M. L.; ZOMA, A. S. Development and Assessment of a Computerized Index of Clinical Disease Activity in Systemic Lupus Erythematosus. **Quarterly Journal of Medicine**, v. 69, n. 258, p. 927-937, 1988.

TAN, E. M.; COHEN, A. S.; FRIES, J. F.; MASI, A. T.; MCSHANE, D. J.; ROTHFIELD, N. F.; SCHALLER, J. G.; TALAL, N.; WINCHESTER, R. J. The 1982 Revised Criteria for the Classification of Systemic Lupus Erythematosus. **Arthritis and Rheumatism**, v. 25, n. 11, p. 1271-1227, 1982.

TAM, L. S.; LI, E. K.; BENZIE, I. F.; LAM, C. W.; ARUMANAYAGAM, M.; CHUNG, W. Y.; TOMLINSON, B. Metabolic Abnormalities Associated with Microalbuminuria in Systemic Lupus Erythematosus. **Rheumatology**, v. 40, n. 10, p.1193-1194, 2001.

TAM, L. S.; LI, E. K.; LEUNG, V. Y.; GRIFFITH, J. F.; BENZIE, I. F.; LIM, P. L.; WHITNEY, B.; LEE, V. W.; LEE, K. K.; THOMAS, G. N.; TOMLINSON, B. Effects of Vitamins C and E on Oxidative Stress Markers and Endothelial Function in Patients with Systemic Lupus Erythematosus: A Double Blind, Placebo Controlled Pilot Study. **The Journal of Rheumatology**, v. 32, n. 2, p. 275-282, 2005.

TANG, S.; LUI, S. L.; LAI, K. N. Pathogenesis of Lupus Nephritis: An Update. **Nephrology (Carlton)**, v. 10, n. 2, p. 174-179, 2005.

TAYSI, S.; GUL, M.; SARI, R. A.; AKCAY, F.; BAKAN, N. Serum Oxidant/Antioxidant Status in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 40, n. 7, p. 684-688, 2002.

TRAGER, J.; WARD, M. M. Mortality and Causes of Death in Systemic Lupus Erythematosus. **Current Opinion in Rheumatology**, v. 13, n. 5, p. 345-351, 2001.

TURGAY, M.; DURAK, I; ERTEN, S.; ERTUGRUL,E.;DEVIRIM, E.; AVCI, A; TURGAY, S. Oxidative Stress and Antioxidant Parameters in a Turkish Group of Patients with Active and Inactive Systemic Lupus Erythematosus. **APLAR Journal of Rheumatology**, v. 10, n. 2 p. 83-171, 2007

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M. S.; KUBOTA, L. T. Espécies Reativas de Oxigênio e de Nitrogênio, Antioxidantes e Marcadores de Dano Oxidativo em Sangue Humano: Principais Métodos Analíticos para sua Determinação. **Química Nova**, v.30, n.5, p.1323-1338, 2007.

VASSALLE, C.; PRATALI, L.; BONI, C.; MERCURI, A.; NDREU, R. An Oxidative Stress Score as a Combined Measure of the Pro-Oxidant and Anti-Oxidant Counterparts in Patients with Coronary Artery Disease. **Clinical Biochemistry**, v. 41, n. 14, p. 1162-1167, 2008.

VILAR, M. J. P.; SATO, E. I. Estimating the Incidence of Systemic Lupus Erythematosus in a Tropical Region (Natal, Brazil). **Lupus**, v.11, n. 1, p. 528-532, 2002.

VITALI, C.; BENCIVELLI, W.; ISENBERG, D. A.; SMOLER, J. S.; SNAITH, M. L.; SCINTO, M.; NERI, R.; BOMBARDIERI, S. Disease Activity in Systemic Lupus Erythematosus: Report of the Consensus Study Group of the European Workshop SLE for Rheumatology Research II. Identification of the Variables Indicative of Disease Activity and Their Use in the Development of an Activity Score. **Clinical and Experimental Rheumatology**, v. 10, n. 5, p. 541-547, 1992.

WALLING, H. W.; SONTHEIMER, R. D. Cutaneous Lupus Erythematosus: Issues in Diagnosis and Treatment. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 10, n. 6, p. 365-381, 2009.

WANG, G.; CAI, P.; ANSARI, G. A. S.; KHAN, M. F. Oxidative and Nitrosative Stress in Trichloroethene-Mediated Autoimmune Response. **Toxicology**, v. 229, n. 3, p. 186-193, 2007.

WANG, G.; PIERANGELI, S. S.; PAPALARDO, E.; ANSARI, G. A. S.; KHAN, M. F. Markers of Oxidative and Nitrosative Stress in Systemic Lupus Erythematosus. **Arthritis and Rheumatism**, v. 62, n. 7, p. 2064-2072, 2010.

WEENING, J. J.; D'AGATI, V. D.; SCHWARTZ, M. M.; SESHAN, S.V.; ALPERS, C. E.; APPEL, G. B.; BALOW, J. E.; BRUIJN, J. A.; COOK, T.; FERRARIO, F.; FOGO, A. B.; GINZLER, E. M.; HEBERT, L.; HILL, G.; HILL, P.; JENNETTE, J. C.; KONG, N. C.; LESAVRE, P.; LOCKSHIN, M.; LOOI, L. M.; MAKINO, H.; MOURA, L. A.; NAGATA, M. The Classification of Glomerulonephritis in Systemic Lupus Erythematosus Revisited. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 15, n. 2, p. 241-250, 2004.

WILLIAMS-JR, R. C.; MALONE, C. C.; MEYERS, C.; DECKER, P.; MULLER, S. Detection of Nucleosome Particles in Serum and Plasma from Patients with Systemic Lupus Erythematosus using Monoclonal Antibody 4H7. **The Journal of Rheumatology**, v. 28, n. 1, p. 81-94, 2001.

YARDIM-AKAYDIN, S.; SEPICI, A.; OZKAN, Y.; TORUN, M.; SIMŞEK, B.; SEPICI, V. Oxidation of Uric Acid in Rheumatoid Arthritis: Is Allantoin a Marker of Oxidative Stress? **Free Radical Research**, v. 38, n. 6, p. 623-628, 2004.

YOUNG, E. G.; CONWAY, C. F. On The Estimation Of Allantoin By The Rimini-Schryver Reaction, **The Journal of Biological Chemistry**, v. 42, n. 1, p. 839-853, 1942.

ZHAO, W.; DIZ, D. I.; ROBBINS, M. E. Oxidative Damage Pathways in Relation to Normal Tissue Injury. **The British Journal of Radiology**, v. 80, n. 1, p. 23-31, 2007.

ZHANG, Q.; YE, D. Q.; CHEN, G. P.; ZHENG, Y. Oxidative Protein Damage and Antioxidant Status in Systemic Lupus Erythematosus. **Clinical and Experimental Dermatology**, v.35, n. 3, p. 287-294, 2010.

ZHOU, M.; DIWU, Z.; PANCHUK-VOLOSHINA, N.; HAUGLAND, R. P. A Stable Nonfluorescent Derivative of Resorufin for the Fluorometric Determination of Trace Hydrogen Peroxide: Application in Detecting the Activity of Phagocyte NADPH Oxidase and other Oxidases. **Analytical Biochemistry**, v.253, n.2, p. 162-168, 1997.

## APÊNDICE 1 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido I – TCLE.



UFAM

### UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você receberá as informações a seguir para que possa participar voluntariamente do estudo intitulado: **“Perfil do Estresse Oxidativo na Lesão Renal de Pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico”**, que tem como objetivo verificar como as espécies reativas do oxigênio estão relacionadas aos danos causados nos rins dos pacientes com lúpus.

Para cada participante serão feitas algumas perguntas (aplicação de um questionário) e também retirada uma pequena quantidade de sangue (13 ml) para que sejam realizados os exames laboratoriais, inclusive estudos em biologia molecular, necessários para a execução do estudo.

A dor que você sentirá será apenas da picada da agulha na veia do seu braço durante a coleta de sangue e talvez apareça uma pequena mancha roxa no local que certamente desaparecerá em no máximo 4 dias. Mas não se preocupe, tudo isto será feito por um profissional qualificado, com material novo, limpo e descartável.

Este estudo foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal do Amazonas e está de acordo com a legislação sobre pesquisa em seres humanos. Mas se você tiver alguma dúvida, terá o direito de falar com a realizadora deste projeto – Giselle Katiane B. B. de Souza – no momento que precisar para ter qualquer tipo de explicação sobre a pesquisa, pelo telefone (092) 8123-3994, ou no Laboratório de Atividade Biológica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, situado à Rua Alexandre Amorim, 330 – Aparecida, telefone (092) 3232-6504.

Nenhuma pessoa que participar deste estudo terá sua identidade ou imagem divulgada, ou seja, as informações recebidas dos participantes serão analisadas em conjunto e publicadas em revista científica de forma anônima (confidencialmente). Mesmo assim, caso você queira desistir de participar do estudo, mesmo depois de ter assinado este termo, não se preocupe, é um direito seu sair do grupo de estudo em qualquer momento, sem qualquer problema.

Ninguém pagará nem receberá dinheiro algum para participar deste estudo, no entanto, pesquisadora se compromete em fornecer todos os resultados dos exames realizados de cada participante a fim de auxiliar no seu tratamento médico.

Esperamos, com este estudo, ajudar na ampliação das informações sobre a correlação das espécies reativas do oxigênio com a lesão renal de pacientes acometidos com o lúpus e, como consequência, cooperar na criação de novas estratégias de acompanhamento clínico e laboratorial na tentativa de prever danos especialmente a este órgão vital.

Participação voluntária:

Eu, \_\_\_\_\_,

declaro ter sido suficientemente informado (a) a respeito do trabalho “Perfil do Estresse Oxidativo na Lesão Renal de Pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico”, e concedo meu consentimento à pesquisadora Giselle Katiane B. B. de Souza para participar desse estudo. Afirmando estar de acordo com todos os itens deste documento que li ou que foram lidos para mim.

Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Assinatura do participante

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente para a participação neste estudo.

Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Assinatura do responsável pelo estudo

Impressão  
Dactiloscópica

## APÊNDICE 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido II – TCLE.



UFAM

### UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Seu (sua) filho (a) está sendo convidado (a) a participar voluntariamente do estudo intitulado: **“Perfil do Estresse Oxidativo na Lesão Renal de Pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico”**, que tem como objetivo verificar como as espécies reativas do oxigênio estão relacionadas aos danos causados nos rins dos pacientes com lúpus.

Ele (a), supervisionado pelo sr. (a) responderá a um questionário com algumas perguntas que são necessárias para o entendimento da doença, também será necessário retirar uma pequena quantidade de sangue (13 ml) para que sejam realizados os exames laboratoriais, inclusive estudos em biologia molecular, necessários para a execução deste estudo.

A dor que ele(a) sentirá será apenas da picada da agulha na veia do seu braço durante a coleta de sangue e talvez apareça uma pequena mancha roxa no local que certamente desaparecerá em no máximo 4 dias. Mas não se preocupe, tudo isto será feito por um profissional qualificado, com material novo, limpo e descartável.

Este estudo foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal do Amazonas e está de acordo com a legislação sobre pesquisa em seres humanos. Mas se você tiver alguma dúvida, terá o direito de falar com a realizadora deste projeto – Giselle Katiane B. B. de Souza – no momento que precisar para ter qualquer tipo de explicação sobre a pesquisa, pelo telefone (092) 8123-3994, ou no Laboratório de Atividade Biológica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, situado à Rua Alexandre Amorim, 330 – Aparecida, telefone (092) 3232-6504.

A identidade ou imagem do (a) seu (sua) filho (a) não será divulgada em hipótese alguma, ou seja, as informações recebidas sobre ele (a) serão analisadas juntamente com dos outros participantes e publicadas em revista científica de forma anônima (confidencialmente). Mesmo assim, caso você ou ele (a) queira desistir de participar do estudo, mesmo depois de ter assinado este termo, não se preocupe, é um direito seu e dele (a) sair do estudo em qualquer momento, sem qualquer problema.

Ninguém pagará nem receberá dinheiro algum para participar deste estudo, no entanto, pesquisadora se compromete em fornecer todos os resultados dos exames realizados por ele (a) para auxiliar no tratamento dele (a) pelo médico.

Esperamos, com este estudo, ajudar na ampliação das informações sobre a correlação das espécies reativas do oxigênio com a lesão renal de pacientes acometidos com o lúpus e, como consequência, cooperar na criação de novas estratégias de acompanhamento clínico e laboratorial na tentativa de prever danos especialmente a este órgão vital.

Participação voluntária:

Eu, \_\_\_\_\_, RG \_\_\_\_\_, responsável legal pelo (a) menor \_\_\_\_\_, declaro ter sido suficientemente informado (a) a respeito do trabalho “Perfil do Estresse Oxidativo na Lesão Renal de Pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico”, e concordo de livre e espontânea vontade que meu (minha) filho (a) \_\_\_\_\_ participe do estudo realizado pela pesquisadora Giselle Katiane B. B. de Souza. Afirmo estar de acordo com todos os itens deste documento que li ou que foram lidos para mim.

Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Assinatura responsável legal

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente juntamente com seu responsável legal para a participação neste estudo.

Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Assinatura do responsável pelo estudo

Impressão  
Dactiloscópica

### APÊNDICE 3 – Questionário para Levantamento de Dados.



## UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

### Perfil do Estresse Oxidativo na Lesão Renal de Pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico

Nº \_\_\_\_\_

Página 1/2

#### 1. DADOS PESSOAIS

Nome: \_\_\_\_\_ . Telefone: \_\_\_\_\_

Idade: \_\_\_\_ anos. Sexo:  M  F Pós-Menarca?  Sim  Não Tempo de Doença: \_\_\_\_\_ (meses)Lesão Renal?  Sim  Não Tempo? \_\_\_\_\_ meses Classificação:  OMS Classe \_\_\_\_\_Registro AAL: \_\_\_\_\_  ISN/RPS Classe \_\_\_\_\_

#### 2. CRITÉRIOS ACR

 Rash malar  Úlceras Orais  Distúrbios Renais  Distúrbios Imunológicos Rash Discóide  Artrite  Distúrbios Neurológicos  Presença de FAN Fotossensibilidade  Serosite  Distúrbios Hematológicos  Neurológico

OBS: \_\_\_\_\_

#### 3. SLEDAI

 Febre (1)  Rash (2)  Pleuris (2)  Cilindrúria (4)  Proteinúria (4) Leucopenia (1)  Úlceras Orais (2)  ↓C3 e C4 (2)  Hematúria (4)  Miosite (4) Plaquetopenia (1)  Alopecia (2)  anti-dsDNA (2)  Leucocitúria (4)  Artrite (4) Cefaléia (8)  Vasculite (8)  S.O.C. (8)  AVC (8)  N. Par Craniano (8)

Pontuação/OBS: \_\_\_\_\_

#### 4. COMORBIDADES

Tem diagnóstico para doença além do LES?  diabetes  HIV  hipertensão  infecção  DRC SAF  Síndrome de Raynaude  Livedo  TVP/TEP  outra

Especificar: \_\_\_\_\_

Há quanto tempo: \_\_\_\_\_ meses

#### 5. HÁBITOS DE VIDA

Fumante?  não  ativo  passivo Quantidade: \_\_\_\_\_ por dia Bebida alcoólica?  sim  nãoPratica atividade física?  sim  não Se sim, quantas vezes por semana: \_\_\_\_\_ por \_\_\_\_\_ min.Possui alguma restrição alimentar?  sim  não

Se sim, quais: \_\_\_\_\_

## 6. SUPLEMENTOS E/OU MEDICAMENTOS

Página 2/2

Faz uso de alguma vitamina ou antioxidante?  sim  não

Se sim, quais: \_\_\_\_\_

Há quanto tempo: \_\_\_\_\_ meses

Faz uso de algum destes medicamentos prescritos para LES?

- Prednisona (\_\_\_\_\_)  Azatioprina (\_\_\_\_\_)  Ciclofosfamida (\_\_\_\_\_)   
 Metotrexato (\_\_\_\_\_)  Cloroquina (\_\_\_\_\_)  Talidomida (\_\_\_\_\_)   
 Micofenolato Mofetil (\_\_\_\_\_)  Outro (\_\_\_\_\_)

Faz uso contínuo de algum medicamento para hipertensão?

- Losartana (\_\_\_\_\_)  Propranolol (\_\_\_\_\_)  Hidroclorotiazida (\_\_\_\_\_)   
 Bloqueador ECA (\_\_\_\_\_)  Bloqueador Cálcio (\_\_\_\_\_)  Outro

Especificar: \_\_\_\_\_

Há quanto tempo: \_\_\_\_\_ meses

Faz uso contínuo de algum medicamento, além dos prescritos para LES e hipertensão?

- Alendronato (\_\_\_\_\_)  Contraceptivo (\_\_\_\_\_)  Sinvastatina (\_\_\_\_\_)   
 Outro (\_\_\_\_\_)

Há quanto tempo: \_\_\_\_\_ meses

Faz tratamento para SAF?

- AAS (\_\_\_\_\_)  Marevan (\_\_\_\_\_)  Alopuriol (\_\_\_\_\_)   
 Anticoagulante Oral (\_\_\_\_\_)  Outro (\_\_\_\_\_)

Há quanto tempo: \_\_\_\_\_ meses

## 7. EXAMES LABORATORIAIS (Data: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_\_\_)

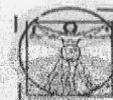
EXAME	RESULTADO	EXAME	RESULTADO
FAN		Colesterol	
Anti-dsDNA		Triglicérideo	
C3		HDL	
C4		VLDL	
Proteína de 24h		LDL	
Albumina		Ureia	
Globulina		Creatinina	
Glicemia		Carencia de Creatinina	
Bilirrubina(T/D/I)		Ácido Úrico	
EAS			
EAS – proteinúria			
EAS – piúria			
EAS – cilindrúria			
EAS – hematúria			

## **APÊNDICE 4 – Roteiro para Coleta e Processamento das Amostras Biológicas dos Pacientes de todos os Grupos.**

1. Coleta de sangue em 2 tubos contendo EDTA (8 mL) e 1 tubo sem anticoagulante (5 mL).
2. Ligar incubadora e centrífuga, ambas à 37° C. Ligar o SYSMEX KX21.
3. Proceder identificação dos tubos:
  - 3.1 1° Tubo com EDTA (Tubo 1): Hemograma, GPx e Biologia Molecular;
  - 3.2 2° Tubo com EDTA (Tubo 2): separação de plasma para dosagem de MDA, alantoína e GR, além do concentrado e hemácias (papa) para dosagem de CAT e SOD;
  - 3.3 Tubo sem anticoagulante (Tubo 3): separação de soro para análises bioquímicas (perfil renal), imunológicas e dosagens de tióis totais, TAC e TOS;
4. Separar 1mL de sangue total do tubo 1 para realização de análises moleculares, guardar em freezer à 70°C negativos.
5. Realizar o hemograma imediatamente.
6. Centrifugar o tubo 3 a 3500 rpm, por 10 min. Separar o soro.
7. Retirar quantidade apropriada para realização das análises bioquímicas (perfil renal) e imunológica (C3 e C4).
8. Centrifugar o tubo 2 a 3500 rpm, por 10 min. Separar o plasma.
9. Proceder a lavagem tripla do concentrado de hemácias com tampão de fosfato, por centrifugação a 3500 rpm, por 10 min.
10. Adicionar conservante em quantidade apropriada aos volumes de plasma, concentrado de hemácias e soro. Distribuir as alíquotas referente à cada análise e guardá-las em freezer à 70°C negativos.
11. Proceder as análises bioquímicas (perfil renal) e imunológica (C3 e C4) do tubo 3.
12. Descongelar material de acordo com a análise a ser realizada e proceder as dosagens bioquímicas, imunológicas e de estresse oxidativo, conforme programação.

**ANEXO 1 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS**  
**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP/UFAM**



## **PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas aprovou, em reunião ordinária realizada nesta data, por unanimidade de votos, o Projeto de Pesquisa protocolado no CEP/UFAM com CAAE nº. 0286.0.115.000-11, intitulado: "PERFIL DO ESTRESSE OXIDATIVO NA LESÃO RENAL DE PACIENTES COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO", tendo como Pesquisadora Responsável Giselle Katiane Bonfim Bacellar de Souza

Sala de Reunião da Escola de Enfermagem de Manaus – EEM da Universidade Federal do Amazonas, em Manaus/Amazonas, 03 de agosto de 2011.

Prof. MSc. Plínio José Cavalcante Monteiro  
Coordenador CEP/UFAM

**ANEXO 2 – Critérios para classificação do LES estabelecidos pelo *American College of Rheumatology* (ACR) e revisados em 1997.**

<b>Critério</b>	<b>Definição</b>
<i>Rash</i> malar	Eritema fixo, plano ou elevado, sobre as eminências malares, tendendo a poupar o sulco nasolabial.
<i>Rash</i> discóide	Placas eritematosas elevadas com escamas ceratóticas aderentes e “follicular plugging”. Escaras atróficas podem ocorrer em lesões antigas.
Fotosensibilidade	<i>Rash</i> na pele secundária à reação não usual à luz solar, relatado pelo paciente ou observado pelo médico.
Úlceras orais	Ulceração oral ou nasofaríngea, usualmente indolor, observada pelo médico.
Artrite	Artrite não erosiva, envolvendo duas ou mais articulações periféricas, caracterizada por dor, edema ou derrame articular.
Serosite	a. Pleurite – história convincente de dor pleurítica ou atrito pleural auscultado pelo médico ou evidência de derrame pleural. OU b. Pericardite – documentada por ECG ou atrito pericárdico ou evidência de derrame pericárdico.
Distúrbios renais	a. Proteinúria persistente, maior do que 0,5g / 24h, ou maior que 3+ quando a quantificação não for possível. OU b. Cilindros celulares anormais – podem ser hemáticos, granulares, tubulares ou mistos.
Distúrbios neurológicos	a. Convulsões – não secundária ao uso de medicamento ou desordem metabólica, como uremia, cetoacidose ou alterações de balanço hidroeletrólítico. OU b. Psicose – não secundária ao uso de medicamento ou desordem metabólica, como uremia, cetoacidose ou alterações de balanço hidroeletrólítico.
Distúrbios hematológicos	a. Anemia hemolítica – com reticulocitose. OU b. Leucopenia – menos de 4.000/mm <sup>3</sup> em duas ou mais ocasiões. OU c. Linfopenia – menos de 1.500/mm <sup>3</sup> em duas ou mais ocasiões. OU d. Trombocitopenia – menos de 100.000/mm <sup>3</sup> em duas ou mais ocasiões.
Distúrbios imunológicos	a. Anticorpo anti-DNA nativo em títulos anormais. OU b. Presença de anticorpo contra antígeno nuclear SM. OU c. Sinais positivos para anticorpos antifosfolipídeos com base em: 1. Índices anormais de anticorpos anticardiolipina (IgM ou IgG); 2. Teste positivo para anticoagulante lúpico ou 3. Teste falso-positivo para sífilis, por no mínimo seis meses, confirmado por testes treponêmicos.
Presença de anticorpos antinucleares	Títulos anormais de anticorpos antinucleares por IFI ou método equivalente, em qualquer época, e na ausência de drogas conhecidamente indutoras da síndrome do lúpus.

Fonte: American College of Rheumatology (1997).

### ANEXO 3 – Índice de Atividade da Doença no Lúpus Eritematoso Sistêmico – SLEDAI.

Peso	Pontuação*	Descrição	Definição
8	_____	Convulsões	Início recente. Exclui causa orgânica ou metabólica.
8	_____	Psicose	Distúrbio na percepção da realidade com alteração das atividades normais. Inclui alucinações, incoerência, perda marcante de associações, fala com conteúdo empobrecido, pensamento ilógico, bizarro, desorganizado. Catatonia. Excluir uremia e causas medicamentosas.
8	_____	Síndrome Orgânica Cerebral	Função mental alterada com diminuição na orientação, memória ou outra função intelectual, com rápido início e fatores clínicos flutuantes. Inclui enuveamento da consciência, com diminuição da capacidade de foco e incapacidade de manter a atenção, associado a pelo menos dois dos seguintes: distúrbio de percepção, incoerência, insônia ou sonolência diurna, aumento ou diminuição da capacidade psicomotora. Excluir causas metabólicas, infecciosas ou medicamentosas.
8	_____	Distúrbios Visuais	Corpos algodinosos, hemorragia retiniana, exudato ou hemorragias na coróide, neurite óptica. Excluir HAS, infecção e medicamento.
8	_____	Desordem de Nervos Cranianos	Envolvimento de início recente.
8	_____	Cefaléia Lúpica	Cefaleia severa, persistente, pode ser enxaquecosa, porém não deve responder à analgesia com narcóticos.
8	_____	AVC	Envolvimento de início recente. Excluir arteriosclerose.
8	_____	Vasculite	Ulceração, gangrena, nódulos dolorosos nos dedos, infarto periungueal, hemorragia fragmentada, biópsia ou angiograma provando ser vasculite.
4	_____	Artrite	Mais de duas articulações com dor e sinais de inflamação.
4	_____	Miosite	Dor e fraqueza em musculatura proximal, associada a aumento de creatinina, fotoquinase/aldolase ou alterações na eletroneuromiografia ou biópsia mostrando miosite.
4	_____	Cilindros Urinários	Cilindro heme-granular ou hemático.
4	_____	Hematúria	> 5 células por campo de maior aumento. Excluir cálculo, infecção ou outras causas.
4	_____	Proteinúria	Aparecimento ou aumento recente de > 0,5 g/24h.
4	_____	Piúria	> 5 leucócitos por campo de maior aumento. Excluir infecções.
2	_____	Surgimento de Rash	Início recente ou recorrência de rash tipo inflamatório.
2	_____	Alopécia	Início recente ou anormal de perda de cabelo localizada ou difusa.

2	_____	Úlceras Mucosas	Início recente ou recorrência de úlceras nasais ou orais.
2	_____	Pleurise	Dor torácica pleurítica com atrito ou derrame pleural.
2	_____	Pericardite	Dor pericárdica associada a pelo menos um dos seguintes: atrito, derrame ou confirmação por ECG ou ecografia cardíaca.
2	_____	Diminuição de Complemento	Diminuição de CH50, C3 ou C4 a baixo dos limites laboratoriais normais.
2	_____	Aumento de Ligação do DNA	Aumento de 25% ou mais do limite laboratorial normal.
1	_____	Febre	> 38°C. Excluir causa infecciosa.
1	_____	Trombocitopenia	< 100.000 plaquetas/mm <sup>3</sup> . Excluir causas infecciosas.
1	_____	Leucopenia	< 3.000 leucocitos/mm <sup>3</sup> . Excluir causa medicamentosa.

\*Pontuação: 0 (Sem atividade); 1 (Atividade leve); 2 (Atividade moderada); 3 (Atividade elevada).  
 Fonte: Bombardier et al. (1992); Gladman et al. (2002).