

ROBERTO MARINI

**LIBERAÇÃO DO ÂNION SUPERÓXIDO POR FAGÓCITOS
DE PACIENTES COM LÚPUS ERITEMATOSO
SISTÊMICO JUVENIL**

CAMPINAS

2007

ROBERTO MARINI

**LIBERAÇÃO DO ÂNION SUPERÓXIDO POR FAGÓCITOS
DE PACIENTES COM LÚPUS ERITEMATOSO
SISTÊMICO JUVENIL**

*Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas, da Universidade
Estadual de Campinas, para obtenção de título de Doutor
em Saúde da Criança e do Adolescente, área de
concentração em Pediatria.*

ORIENTADOR: PROFA. DRA. LILIAN TEREZA LAVRAS COSTALLAT

CO-ORIENTADOR: PROF. DR. ANTONIO CONDINO NETO

CAMPINAS

2007

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

M3381 Marini, Roberto
Liberação do ânion superóxido por fagócitos de pacientes com
lúpus eritematoso sistêmico juvenil / Roberto Marini. Campinas, SP :
[s.n.], 2007.

Orientadores : Lílian Tereza Lavras Costallat, Antonio Condino
Neto

Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
de Ciências Médicas.

1. Radicais livres. 2. Fagócitos. 3. Lúpus eritematoso
sistêmico. 4. Adolescentes. 5. Infância. I. Costallat, Lílian
Teresa Lavras. II. Condino Neto, Antonio. III. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

**Título em inglês : Superoxide release by phagocytes from juvenile systemic
lupus erythematosus patients**

Keywords: • Free radicals
• Phagocytes
• Lupus Erythematosus, Systemic
• Infants
• Adolescent

Titulação: Doutor em Saúde da Criança e do Adolescente
Área de concentração: Pediatria

Banca examinadora: Profa. Dra. Lílian Tereza Lavras Costallat
Profa. Dra. Maria Odete Esteves Hilário
Profa. Dra. Clóvis Artur Almeida da Silva
Profa. Dra. Sandra Regina Muchinecchi Fernandes
Prof Dr Manoel de Barros Bértolo

Data da defesa: 13 - 07 - 2007

Banca Examinadora da tese de Doutorado

Orientadora:

Profa. Dra. Lilian Tereza Lavras Costallat

Liliane Costallat

Membros:

1. Prof.(a). Dr(a). Sandra Regina Muchinecchi Fernandes

2. Prof.(a). Dr(a). Manoel de Barros Bértolo

3. Prof.(a). Dr(a). Maria Odete Esteves Hilário

4. Prof.(a). Dr(a). Clóvis Artur Almeida Silva

**Curso de Pós-graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.**

Data: 2007

DEDICATÓRIA

*Sofia
companheira do
passado, presente, futuro*

*Paulo, Rafael e Rodrigo,
tanto desejamos
criamos
cremos ter ensinado
almejamos felicidade.*

*Aos pais
nos criaram
nos ensinaram
somos orgulhosos.*

*Aos amigos
que colaboraram
que animaram
agradeço*

*Aos pacientes
que confiaram
fiz o melhor que pude
busco melhorar*

Ao amigo André Moreno Morcillo, com quem convivo desde que fomos calouros carecas; nos tornamos colegas de república, residentes, plantonistas, recém contratados, professores, "grávidos" e pais; seus perseverantes apoio, estímulo e acompanhamento, sem esquecer a inestimável assessoria estatística, foram fundamentais para a realização deste trabalho. Espero que nosso convívio continue até nos tornarmos carecas, sem trote, novamente.

À minha orientadora, Profa. Dra. Lílían Tereza Lavras Costallat por ter conseguido entender minha maneira de trabalhar, ter sabido orientar, corrigir incentivar e aguardar este trabalho sempre com muito tempo e disposição apesar dos inúmeros compromissos pessoais.

Ao Prof. Dr. Antonio Condino Neto responsável pelo laboratório do CIPED, que colocou à nossa disposição recursos humanos e materiais necessários para execução deste trabalho, bem como pela imensa ajuda na elucidação dos problemas surgidos.

Às técnicas do laboratório do CIPED, principalmente à bióloga Jussara Rehder, que nunca se recusou a realizar "mais um ensaio laboratorial"

A todos os pacientes do ambulatório de reumatologia, que confiaram em nosso trabalho, e cederam as amostras de material para a realização deste trabalho

	PÁG.
RESUMO	<i>xxxvii</i>
ABSTRACT	<i>xli</i>
1- INTRODUÇÃO	45
1.1- Lúpus eritematoso sistêmico	48
1.2- Resposta imune	49
1.3- Resposta inflamatória	51
1.4- Radicais do oxigênio	52
1.5- Medicamentos	54
Antiinflamatórios não hormonais.....	54
Corticosteróides.....	55
Antimaláricos.....	58
Citostáticos.....	59
1.6- Atividade da doença	60
1.7- Liberação de ânion SO e atividade da doença	62
2- JUSTIFICATIVA DO TRABALHO	65
3- OBJETIVOS	69
3.1- Objetivos gerais	71
3.2- Objetivos específicos	71
4- PACIENTES E MÉTODOS	73
4.1- Tipo de estudo	75
4.2- Local de estudo	75

4.3- Pacientes.....	75
4.4- Grupo controle.....	75
4.5- Aspectos éticos.....	76
4.6- Critérios de inclusão.....	76
4.7- Critérios de exclusão.....	76
4.8- Critérios de classificação.....	76
4.9- Coleta das amostras.....	77
4.10- Determinação do ânion superóxido.....	77
4.11- Análise estatística dos dados.....	79
5- RESULTADOS.....	81
5.1- Dados gerais.....	83
5.2- Exames laboratoriais.....	83
5.3- Atividade da doença.....	83
5.4- Análise global da liberação de ânion SO.....	84
5.5- Liberação de ânion SO pelos pacientes com LESJ.....	85
5.5.1- Polimorfonucleares espontâneos.....	85
5.5.2- Polimorfonucleares ativados.....	87
5.5.3- Monócitos espontâneos.....	88
5.5.4- Monócitos ativados.....	89
5.6- Liberação de ânion SO pelos pacientes com LESJ conforme a atividade da doença.....	90
5.6.1- Polimorfonucleares espontâneos.....	91
5.6.2- Polimorfonucleares ativados.....	93

5.6.3- Monócitos espontâneos.....	95
5.6.4- Monócitos ativados.....	97
6- DISCUSSÃO.....	99
7- CONCLUSÕES.....	119
7.1- Liberação de ânion SO pelos pacientes com LESJ.....	121
7.2- Liberação de ânion SO pelos pacientes com LESJ conforme a atividade da doença.....	121
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	123
9- ANEXOS.....	135
Anexo 1- Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index (SLEDAI)	137
10- APÊNDICES.....	139
Apêndice 1- Aprovação da Comissão de pesquisa da FCM – UNICAMP...	141
Apêndice 2- Consentimento para realização da pesquisa.....	143
Apêndice 3- LESJ: Exames laboratoriais dos pacientes, medicamentos em uso e SLEDAI no momento do ensaio do ânion SO.....	145
Apêndice 4- LESJ: Valores da pontuação do SLEDAI dos 23 pacientes no momento da coleta da amostra para o ensaio do ânion SO.....	147
Apêndice 5- LESJ: Dados epidemiológicos dos 23 pacientes com LESJ conforme distribuição do sexo, etnia, idade ao início das manifestações clínicas, idade ao diagnóstico, idade no momento do ensaio laboratorial e tempo de acompanhamento no serviço no momento do estudo do ânion SO.....	149
Apêndice 6- Dados brutos da liberação de ânion SO nos diferentes ensaios.....	151
Apêndice 7- Tabelas dos testes de Mann-Whitney analisando os três grupos comparados dois a dois.....	153

LISTA DE SIMBOLOS E ABREVIATURAS

AADNA	Anticorpo anti-DNA
ACR	American College of Rheumatology
ADPH	Adenosina Difosfato
AINH	Antiinflamatórios não hormonais
ALFA1GLI	Alfa 1 glicoproteína ácida
AR	Artrite reumatóide
AV	Análise de Variância
BILAG	British Isles Lupus Assessment Group
C	Controle
C3	Fração C3 do sistema complemento
C4	Fração C4 do sistema complemento
Ca	Caucasóide
CIPED	Centro de Investigação em Pediatria
COX	Enzima ciclooxygenase
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DP	Desvio padrão
ELAM-1	Moléculas de adesão endotelial
E.U.A.	Estados Unidos da América
Fe	Feminino
FAN	Fator anti-núcleo
FCM	Faculdade de Ciências Médicas
FMA	Forbol miristato acetato
Fc	Fração constante
Fv	razão das variâncias entre e dentre as amostras
GL	Graus de liberdade
GM-CSF	Fator estimulante de colonização de granulócitos e monócitos
H	Hidrogênio
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HC	Hospital das Clínicas

HMG	Hemograma
ICAM-1	Moléculas de adesão intracelular
IgG	Imunoglobulina classe G
IgE	Imunoglobulina classe E
IgM	Imunoglobulina classe M
IL -	Interleucina
IMC	Índice de massa corporal
INF- γ	Intérferon gama
LAI	Lupus Activity Index
LES	Lúpus eritematoso sistêmico
LES -	Lúpus eritematoso sistêmico sem atividade
LES +	Lúpus eritematoso sistêmico em atividade
LESJ	Lúpus eritematoso sistêmico juvenil
M	Média
Ma	Masculino
MICROALB	Microalbuminúria
MOA	Monócitos ativados
MOE	Monócitos espontâneos
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
NADP ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato forma oxidada
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato forma reduzida
NCa	Não caucasóide
nDNA	Ácido desóxirribonucleico nativo
NFAT	Fator nuclear de ativação dos linfócitos T
nmol	Nanomol
O ₂ ⁻	Ânion Superóxido
OH [•]	Radical hidroxila
p	probabilidade de semelhança das amostras
PAF	Fator ativador de plaquetas
PCR	Proteína C Reativa
PC	Prostaciclina

PG	Prostaglandina
pH	Potencial Hidrogeniônico
PMA	Polimorfonucleares ativados
PME	Polimorfonucleares espontâneos
PMN	Polimorfonucleares
POL	Peroxidase lipídica
PROT24	Proteinúria de 24 hs
RC	Receptor do complemento
RF γ	Receptor da fração constante da imunoglobulina
RNA	Ácido Ribonucleico
SLAI	Systemic Lupus Activity Index
SLAM	Systemic Lupus Activity Measure
SLEDAI	Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index
SNC	Sistema Nervoso Central
SO	Ânion Superóxido
SOD	Superóxido desmutase
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TX	Tromboxano
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
URI	Urina I
UV	Raios ultra violeta
VCAM-1	Moléculas de adesão celular vascular
VHS	Velocidade de Hemossedimentação

	<i>PÁG.</i>
Tabela 1- Efeito dos glicocorticóides na resposta inflamatória e imune.....	57
Tabela 2- LESJ: Distribuição dos dados epidemiológicos dos 23 pacientes classificados quanto à atividade do LES pelo SLEDAI.....	84
Tabela 3- LESJ: Valores de F, graus de liberdade (GL) e probabilidade (p) da Análise de Variância das variáveis PME, PMA, MOE e MOA.....	85
Tabela 4- LESJ: Média e desvio padrão da liberação de ânion SO pelos PME dos grupos LES e Controle nos diferentes instantes de tempo de incubação.....	86
Tabela 5- LESJ: Média e desvio padrão da liberação de ânion SO pelos PMA dos grupos LES e Controle nos diferentes instantes de tempo de incubação.....	87
Tabela 6- LESJ: Média e desvio padrão da liberação de ânion SO pelos MOE dos grupos LES e Controle nos diferentes instantes de tempo de incubação.....	88
Tabela 7- LESJ: Média e desvio padrão da liberação de ânion SO pelos MOA dos grupos LES e Controle nos diferentes instantes de tempo de incubação.....	89
Tabela 8- LESJ: Média e desvio padrão da liberação de ânion SO* pelos PME nos três grupos nos diferentes instantes de tempo de incubação.....	91

Tabela 9-	Teste de Bonferroni para comparações múltiplas das médias dos grupos LES inativo [LES (-)], LES ativo [LES (+)] e Controle (C), nos instantes 0, 5, 15, 25, 45 e 60 minutos de tempo de incubação dos PME.....	92
Tabela 10-	LESJ: Média e desvio padrão da liberação de ânion SO* células pelos PMA nos três grupos nos diferentes instantes de tempo de incubação.....	93
Tabela 11-	Teste de Bonferroni para comparações múltiplas das médias dos grupos LES inativo [LES (-)], LES ativo [LES (+)] e Controle (C), nos instantes 0, 5, 15, 25, 45 e 60 minutos de tempo de incubação dos PMA.....	94
Tabela 12-	LESJ: Média e desvio padrão da liberação de ânion SO* pelos MOE nos três grupos nos diferentes instantes de tempo de incubação.....	95
Tabela 13-	Teste de Bonferroni para comparações múltiplas das médias dos grupos LES inativo [LES (-)], LES ativo [LES (+)] e Controle (C), nos instantes 0, 5, 15, 25, 45 e 60 minutos de tempo de incubação dos MOE.....	96
Tabela 14-	LESJ: Média e desvio padrão da liberação de ânion SO* pelos MOA nos três grupos nos diferentes instantes de tempo de incubação.....	97
Tabela 15-	Teste de Bonferroni para comparações múltiplas das médias dos grupos LES inativo [LES (-)], LES ativo [LES (+)] e Controle (C), nos instantes 0, 5, 15, 25, 45 e 60 minutos de tempo de incubação dos MOA.....	98
Tabela 16-	LESJ: Exames laboratoriais dos pacientes, medicamentos em uso e SLEDAI no momento do ensaio do ânion SO.....	145

Tabela 17-	LESJ: Valores da pontuação do SLEDAI dos 23 pacientes no momento da coleta da amostra para o ensaio do ânion SO.....	147
Tabela 18-	LESJ: Dados epidemiológicos dos 23 pacientes com LESJ conforme distribuição do sexo, etnia, idade ao início das manifestações clínicas, idade ao diagnóstico, idade no momento do ensaio laboratorial e tempo de acompanhamento no serviço no momento do estudo do ânion SO.....	149
Tabela 19-	LESJ : Resultados brutos. Distribuição dos valores obtidos nos momentos 0, 5', 15', 25', 45' e 60' de superóxido, expresso em nmol por 10 ⁶ células por tempo de incubação, pelos polimorfo nucleares espontâneos e ativados pelo PMA no ensaio e a correspondente pontuação na escala SLEDAI do paciente.....	151
Tabela 20-	LESJ: Resultados brutos. Distribuição dos valores obtidos nos momentos 0, 5', 15', 25', 45' e 60' de superóxido, expresso em nmol por 10 ⁶ células por tempo de incubação, pelos monócitos espontâneos e ativados pelo PMA no ensaio e a correspondente pontuação na escala SLEDAI do paciente.....	152
Tabela 21-	Análise da liberação de ânion SO pelos polimorfoneutrófilos espontâneos nos respectivos momentos do ensaio comparando o grupo controle com o grupo lúpus sem atividade.....	153
Tabela 22-	Análise da liberação de ânion SO pelos polimorfoneutrófilos espontâneos nos respectivos momentos do ensaio comparando grupo Controle com o grupo lúpus em atividade.....	153
Tabela 23-	Análise da liberação de ânion SO pelos polimorfoneutrófilos espontâneos nos respectivos momentos do ensaio comparando grupo lúpus sem atividade com o grupo lúpus em atividade.....	153

Tabela 24-	Análise da liberação de ânion SO pelos polimorfoneutrófilos ativados nos respectivos momentos do ensaio comparando o grupo Controle com o grupo lúpus sem atividade.....	154
Tabela 25-	Análise da liberação de ânion SO pelos polimorfoneutrófilos ativados nos respectivos momentos do ensaio comparando o grupo Controle com o grupo lúpus em atividade.....	154
Tabela 26-	Análise da liberação de ânion SO pelos polimorfoneutrófilos ativados nos respectivos momentos do ensaio comparando o grupo lúpus sem atividade com o grupo lúpus em atividade.....	154
Tabela 27-	Análise da liberação de ânion SO pelos monócitos espontâneos nos respectivos momentos do ensaio comparando o grupo Controle com o grupo lúpus sem atividade.....	155
Tabela 28-	Análise da liberação de ânion SO pelos monócitos espontâneos nos respectivos momentos do ensaio comparando o grupo Controle com o grupo lúpus em atividade.....	155
Tabela 29-	Análise da liberação de ânion SO pelos monócitos espontâneos nos respectivos momentos do ensaio comparando o grupo lúpus sem atividade com o grupo lúpus em atividade.....	155
Tabela 30-	Análise da liberação de ânion SO pelos monócitos ativados nos respectivos momentos do ensaio comparando o grupo Controle com o grupo lúpus sem atividade.....	156
Tabela 31-	Análise da liberação de ânion SO pelos monócitos ativados nos respectivos momentos do ensaio comparando o grupo Controle como grupo lúpus em atividade.....	156
Tabela 32-	Análise da liberação de ânion SO pelos monócitos ativados nos respectivos momentos do ensaio comparando o grupo lúpus sem atividade com o grupo lúpus em atividade.....	156

	<i>PÁG.</i>
Figura 1- Esquema do ciclo de produção dos radicais do O ₂	52
Figura 2- Esquema de atuação dos antiinflamatórios não hormonais (AINH) e os hormonais (glicocorticóides) na inibição da produção dos leucotrienos e prostaglandinas.....	56

		PÁG.
Gráfico 1-	LESJ: Liberação de ânion SO pelos PME dos grupos LESJ e Controle.....	86
Gráfico 2-	LESJ: Liberação de ânion SO pelos PMA dos grupos LESJ e Controle.....	87
Gráfico 3-	LESJ: Liberação de ânion SO pelos MOE dos grupos LESJ e Controle.....	88
Gráfico 4-	LESJ: Liberação de ânion SO pelos MOA dos grupos LESJ e Controle.....	89
Gráfico 5-	LESJ: Liberação de ânion SO em nmol por 10 ⁶ células pelos PME dos grupos LES inativo [LES (-)], LES ativo [LES (+)] e Controle (C), nos instantes 0, 5, 15, 25, 45 e 60 minutos de tempo de incubação.....	91
Gráfico 6-	LESJ: Liberação de ânion SO em nmol por 10 ⁶ células pelos PMA dos grupos LES inativo [LES (-)], LES ativo [LES (+)] e Controle (C), nos instantes 0, 5, 15, 25, 45 e 60 minutos de tempo de incubação.....	93
Gráfico 7-	LESJ: Liberação de ânion SO em nmol por 10 ⁶ células pelos MOE dos grupos LES inativo [LES (-)], LES ativo [LES (+)] e Controle (C), nos instantes 0, 5, 15, 25, 45 e 60 minutos de tempo de incubação.....	95
Gráfico 8-	LESJ: Liberação de ânion SO em nmol por 10 ⁶ células pelos MOA dos grupos LES inativo [LES (-)], LES ativo [LES (+)] e Controle (C), nos instantes 0, 5, 15, 25, 45 e 60 minutos de tempo de incubação.....	97

	<i>PÁG.</i>
Quadro 1- Exames laboratoriais a serem realizados nos pacientes com LESJ.....	143

RESUMO



O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença auto-imune inflamatória, crônica, em que ocorre importante dano tissular principalmente por deposição de imunocomplexos circulantes. O ânion superóxido (SO) liberado pelos fagócitos durante o processo inflamatório é lesivo aos tecidos. Em estudos feitos em adultos com LES a liberação do SO se correlacionou com a atividade inflamatória da doença, porém, não há estudos em pacientes com LES juvenil (LESJ). O objetivo deste trabalho foi estudar as liberações espontânea e estimulada de SO pelos polimorfonucleares (PMN) e monócitos (MO) de pacientes com LESJ. É um estudo analítico da liberação de SO, expressa em nmol por 10⁶ células, em seis instantes de tempo de incubação, de 23 pacientes (3M:20F) com LESJ segundo os critérios de Tan (1982). A primeira análise comparou o grupo de pacientes com LESJ e o grupo controle (35 indivíduos sadios). A segunda análise comparou o grupo controle com dois subgrupos do grupo LESJ, classificados, quanto à atividade da doença, pelo SLEDAI, em um subgrupo inativo (≤ 5 pontos) (15 pacientes) e outro subgrupo em atividade (8 pacientes). Utilizou-se a análise de variância, o teste de Mann-Whitney e o de Bonferroni sempre com nível de significância de 5%. Os resultados obtidos revelaram que no ensaio dos MO espontâneos houve menor liberação de SO no grupo LESJ em relação ao grupo controle. No ensaio dos PMN estimulados houve maior liberação de SO pelo grupo LESJ quando comparado ao controle. Não houve diferença significativa na liberação de SO entre os dois subgrupos do LESJ em nenhum ensaio. A menor liberação de SO pelo grupo com LESJ nos ensaios espontâneos pode ser devida à ação antiinflamatória e imunossupressora dos medicamentos utilizados para o controle da doença. A significativa maior liberação de SO pelo grupo com LESJ nos ensaios estimulados, principalmente nos momentos iniciais do ensaio dos PMN, a “*explosão respiratória*”, pode ser interpretada como decorrente do estado inflamatório potencializado dos leucócitos que, devido ao LESJ, estariam “primados”. Os PMN estimulados de crianças com LESJ liberam mais SO quando comparados aos controles.

ABSTRACT



Systemic lupus erythematosus (SLE) is an autoimmune inflammatory disease with tissular injury due to immune complex deposition. The superoxide anion (SO) released by phagocytes during the inflammatory process is dangerous to the tissues. Studies performed with SLE adults revealed that SO liberation is correlated with the inflammatory activity. There are no studies with patients with juvenile SLE (JSLE). The main objective of this analytic study was to analyze the spontaneous and stimulated liberation of SO by the polymorphonucleates (PMN) and monocytes (MO) of 23 patients (3M:20F) with JSLE according to Tan criteria (1982). Such liberation of SO was expressed in nmol by 10^6 cells, in six different times of incubation. A first analysis compared the JSLE group with a control group of 35 healthy people. A second analysis compared the control group with two subgroups of the JSLE group, which was classified by SLEDAI, in one subgroup inactive (score ≤ 5) (15 patients) and another subgroup with activity (score > 5) (8 patients). Variance analysis, Mann-Whitney and Bonferroni test were used with 5% of significance level. The results showed that in the spontaneous MO assay there was less liberation of SO in the JSLE group than in the control group. In the PMN stimulated assay there was more SO liberation in the JSLE group than in the control. There was no significant difference in SO liberation between the two subgroups of JSLE in any assay. The lower liberation of SO by the JSLE group in the spontaneous assays could be due to the anti-inflammatory and immunosuppressor actions of the treatment drugs. The significative higher liberation of SO in the assays of the stimulated PMN, mainly in the initial moments, the so called "respiratory burst" could be attributed to the inflammatory state of the phagocytes, that due to the JSLE, would be in a high excitatory level. The stimulated PMN of children with JSLE released more SO when compared with controls.

1- INTRODUÇÃO

No processo evolutivo dos seres vivos a capacidade de adaptação ao meio é fundamental para a preservação da espécie. Esta adaptação compreende, além da maleabilidade de interagir com o meio ambiente favorável, a de desenvolver maneiras de se defender de agentes agressores.

Todos os seres vivos apresentam, em diferentes graus de complexidade e eficiência, conforme sua posição na escala evolutiva, um sistema de defesa de seu organismo.

O sistema de defesa humano pode, didaticamente, ser dividido em dois grandes componentes: o natural e o adquirido. Estes dois componentes apresentam características próprias, são ativadas por estímulos diferentes, mas não são independentes nem estanques e freqüentemente interagem.

A imunidade natural, que poderia ser denominada de congênita, desenvolve-se independente de estímulos externos, e tem como função principal manter a integridade e pureza do organismo. Esta atividade é realizada através de vigilância constante, procurando alguma estrutura alterada que, uma vez reconhecida e identificada como estranha, será englobada em um processo de eliminação.

A imunidade adquirida é ativada por estímulos externos; físicos, químicos ou, na grande maioria das vezes, por um agente infeccioso. A resposta imune, desencadeada após o agente ser reconhecido como estranho, é extremamente específica e visa inativá-lo, eliminá-lo e reparar o dano ocorrido.

A interação entre o agente agressor e o hospedeiro pode ocasionar alterações de estruturas ou componentes do hospedeiro que, sendo reconhecidas como diferentes pelo sistema imune, o ativam, iniciando o processo de eliminação.

O sistema imunológico de alguns indivíduos, geneticamente predispostos, não consegue distinguir as estruturas alteradas das normais devido à enorme semelhança entre elas. O mecanismo de auto proteção, denominado tolerância imune, é, portanto, ineficiente, fazendo com que o sistema imune alterado entenda como estranhas estruturas do próprio indivíduo, perpetuando esta resposta e acarretando lesões quando deveria protegê-lo.

Dentre as doenças auto-imunes, decorrentes deste fenômeno de auto-agressão, o lúpus eritematoso sistêmico (LES), pela grande variedade de auto-anticorpos que pode produzir, e pela potencialidade de lesar vários tecidos, é considerado o seu protótipo.

1.1- Lúpus eritematoso sistêmico (LES)

O LES é definido como uma doença auto-imune, multissistêmica, caracterizada pela inflamação generalizada do tecido conjuntivo e dos vasos sangüíneos, bem como pela presença de auto-anticorpos anti-nucleares, especialmente os anticorpos contra o ácido desoxirribonucléico nativo (nDNA). As suas manifestações clínicas são extremamente variadas, a sua evolução natural não é semelhante em todos os casos porém, se não tratado, é quase sempre uma doença progressiva e com significativo índice de mortalidade (Cassidy e Petty, 2001).

Estudos epidemiológicos estimam que a incidência do LES na faixa etária pediátrica, ou seja, com início dos sintomas em indivíduos com até 15 anos de idade, varie entre 0,53 a 0,6 por 100.000 habitantes (Siegel e Lee, 1973; Hochberg, 1985). Lehman et al. (1989), inferiram haver entre 5.000 e 10.000 crianças com LES nos E.U.A.. Harvey et al. (1954), estimaram entre 15 e 17 a porcentagem de pacientes que inicia as manifestações LES antes dos 16 anos de idade; a doença é rara antes dos cinco anos de idade sendo que sua freqüência aumenta com o avançar da idade (Meislin e Rothfield, 1968). É uma doença que acomete preferencialmente os adolescentes, tendo Kornreich (1976), relatado que em aproximadamente 33% dos casos, considerando a faixa etária abaixo dos 16, ela se inicia antes dos 10 anos de idade.

Embora não haja estudos epidemiológicos no Brasil, trabalhos brasileiros que abrangem pacientes menores de 16 anos apresentam dados semelhantes aos de outros países (Sato et al., 1991; Hilário et al., 1992; Costallat e Coimbra, 1994; Marini e Costallat, 1999).

A maior incidência em indivíduos do sexo feminino ocorre em todas as faixas etárias, havendo uma variação na proporção feminino/masculino que oscila, nos menores de 16 anos, de 1,4 a 5,8:1; nos pacientes mais velhos atinge proporções de 8 a 13:1. (Rothfield, 1981; Walasse e Dubois, 1987). Cassidy et al. (1977), encontraram nos

pacientes com até nove anos de idade uma proporção de 4:3 de acometimento na relação feminino/masculino a qual aumentava para 4:1 na faixa dos 10 a 14 anos e de 5:1 nos pacientes entre 15 e 19 anos de idade.

A etiopatogenia do LES, apesar de muito estudada, ainda não está elucidada, embora inúmeros trabalhos tenham relacionado os fatores que influenciam o desencadeamento das manifestações clínicas. Acredita-se que um desequilíbrio do sistema hormonal, uma alteração do estado psicológico, os fatores ambientais e os processos infecciosos, agindo de forma isolada ou em conjunto, em um indivíduo geneticamente predisposto, ocasionem uma alteração da resposta imune com conseqüente desencadeamento da doença (Cassidy e Petty, 2001).

Assim sendo, devemos considerar o que denominamos de LES como a manifestação clínica de um mecanismo patogênico que pode ser desencadeado por diversos fatores; não apenas como uma doença, mas como uma somatória de sintomas e sinais (Steinberg e Klinman, 1988).

1.2- Resposta imune

A atuação do sistema imune se faz através de uma série de eventos físicos, químicos, interdependentes e concatenados, agrupados sob a denominação de resposta inflamatória.

Na maioria das vezes a resposta imune é eficiente e elimina o agente agressor, ou estranho, sem produzir uma inflamação clinicamente aparente; quando esta acontece é indicativo que o sistema imune encontrou uma grande quantidade de antígeno incomum, ou um antígeno em local diferente ao usual ou ainda um antígeno difícil de ser eliminado (Gallin, 1993).

Nas doenças auto-imunes a presença do antígeno é perene, acarretando uma resposta constante do sistema imune que, num círculo vicioso, retro alimenta e perpetua a doença.

No LES, assim como em outras doenças auto-imunes, diferente do que ocorre quando o antígeno desencadeia normalmente uma resposta inflamatória aguda que pode evoluir para cronicidade, esta resposta desde o início tem características de cronicidade. A resposta crônica, histologicamente, se caracteriza por apresentar maior infiltrado celular que acúmulo de fluidos, a coexistência de destruição e reparo e, de infiltrado celular constituído de polimorfonucleares, monócitos e seus derivados.

A manifestação clínica da doença é a parte visível do processo inflamatório mediado pelo sistema imune. No LES ocorrem duas categorias inflamatórias da resposta imune, ambas com participação das imunoglobulinas IgG e IgM, e o sistema complemento. A primeira é mediada pelos anticorpos citotóxicos e a segunda pelos imunocomplexos.

As imunoglobulinas são glicoproteínas séricas particularmente produzidas em resposta a um estímulo antigênico específico. O sistema complemento compreende uma série de pelo menos 20 glicoproteínas séricas, que atuam em uma seqüência, como cascata, quando ativadas, sendo importantes na atividade inflamatória, na imunorregulação e na erradicação de organismos ou imunecomplexos.

A atividade citotóxica é direta e leva à destruição celular, inicialmente, pela adesão do anticorpo específico (classe IgG ou IgM) na superfície da célula reconhecida como estranha, devido aos antígenos de sua membrana e, posteriormente, pelo desencadeamento da cascata do sistema complemento. A manifestação clínica desta atividade no LES é a citopenia que pode ocorrer em uma ou mais das séries sanguíneas, com as hemácias, as plaquetas e os linfócitos.

A lesão tecidual pelo depósito de imunecomplexos nos tecidos é indireta porque a reação entre o antígeno e o anticorpo com a fixação do complemento, ocorre na circulação; no momento que este complexo imune se deposita no tecido é que ocorre, com participação das enzimas inflamatórias, a lesão celular. A manifestação desta atividade pode ocorrer em qualquer tecido, mas acomete preferencialmente a pele, as serosas, os rins e o sistema nervoso central (SNC).

1.3- Resposta inflamatória

O tecido, quando lesado, libera mediadores químicos que promovem a vasodilatação do leito capilar, inicialmente do sistema venoso e posteriormente do arteriolar. Com a dilatação há maior permeabilidade vascular, bem como um fluxo sangüíneo mais lento e concomitante extravasamento de plasma nos tecidos perivasculares; ocorre a migração de leucócitos no local com acúmulo de leucócitos, principalmente neutrófilos e monócitos.

Estas células são originárias da medula óssea a partir de uma célula-tronco hematopoiética pluripotente que se diferencia em um progenitor linfóide, que originará os linfócitos, e um progenitor mielóide, o qual novamente se diferencia e lança na corrente sangüínea os megacariócitos, que se transformarão em plaquetas; os eritroblastos que se transformarão em hemácias; e os granulócitos, os monócitos e os mastócitos.

Os granulócitos, assim denominados porque possuem grânulos densamente coráveis em seu citoplasma, também referidos como leucócitos polimorfonucleares, são os neutrófilos, os eosinófilos e os basófilos. Os monócitos, não tem grânulos no citoplasma e são as células que ao migrarem da corrente sangüínea para o tecido se transformam em macrófagos. Os mastócitos, cujo precursor circulante ainda não está bem definido, também se diferencia ao chegar aos tecidos.

Os neutrófilos e macrófagos têm a função de aprisionar e degradar o agente agressor e também os complexos imunes, antígenos estranhos e detritos das células necróticas. Esta destruição e/ou degradação, se faz no interior de lisossomos dos leucócitos com o aprisionamento das partículas agressoras previamente opsonizadas no interior de vacúolos (fagossomos). No citoplasma da célula a incorporação do lisossomo ao fagossomo forma o fagolisossomo, onde ocorre a destruição ou a degradação do agente agressor.

Os fagócitos atravessam o endotélio indo para o interstício, havendo a liberação de outros mediadores químicos do processo inflamatório. Os leucócitos também promovem a liberação extracelular de produtos leucocitários (enzimas lisossomais e metabólitos ativos).

Nessas ocasiões devido à maior atividade dos leucócitos, há aumento do consumo de O_2 pelo metabolismo celular, resultando ao final desta atividade aeróbica uma maior produção de radicais de oxigênio tóxicos como o superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o hidroxila (OH).

1.4- Radicais do oxigênio

Os radicais do oxigênio são radicais livres, elementos químicos que contêm pelo menos um elétron não pareado em sua órbita atômica externa; sua produção pelo organismo é constante, têm funções fisiológicas, mas podem, em certas circunstâncias, apresentar manifestações patológicas (Halliwell, 1994).

Devido ao elétron não pareado, os radicais livres são instáveis, buscam reagir com outras moléculas doando (redução) ou recebendo (oxidação) elétrons, a fim de obter uma configuração eletrônica pareada, ou seja, estável. O resultante destas reações são as moléculas, oxidadas ou reduzidas, cujo acúmulo é prejudicial.

A enzima NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfatase) oxidase existente na superfície das células inflamatórias como os polimorfonucleares, os macrófagos e os monócitos, quando estimuladas cedem um elétron à molécula de O_2 formando o ânion superóxido; parte dele é liberado para o extracelular onde ocorrerá a conversão para H_2O_2 como mostra a Figura 1.

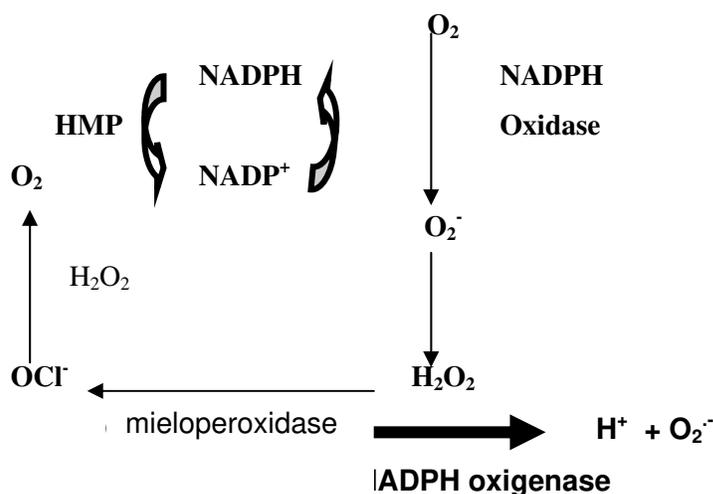


Figura 1- Esquema do ciclo de produção dos radicais do O_2

O ânion superóxido tem participação destacada no processo inflamatório; é citotóxico, altamente lesivo aos tecidos; pode provocar lesões irreversíveis em macromoléculas (Nathan, 1987); é muito reativo, particularmente com proteínas contendo ferro, lípidos e DNA.

Os organismos tentando evitar esse efeito nocivo dispõem de substâncias antioxidantes como, por exemplo, a vitamina E, ou desenvolveram mecanismos protetores ou reparadores, como a enzima superóxido dismutase (SOD) que converte o O_2^- em oxigênio (O_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), a fim de evitar este acúmulo, como mostra o próximo esquema.



Verificou-se que os radicais livres participam ativamente em processos isquêmicos, nas lesões ocasionadas pela radioatividade, nos processos de envelhecimento e, de maneira intensa, nos inflamatórios (Halliwell, 1994; Halliwell, 1995; Wiseman e Halliwell, 1996).

Existem muitas dificuldades técnicas para dosar diretamente os radicais livres devido à sua instabilidade, alta reatividade e tendência em reagir em cadeia, motivos pelo quais há ensaios laboratoriais que os dosam apenas indiretamente.

Babior (1978) descreveu que o consumo de O_2 por neutrófilos humanos aumenta de 50 a 100 vezes após estímulo específico; esta reação com intenso consumo de O_2 , é denominada “explosão respiratória”, a qual é desencadeada por estímulos fisiológicos, como, dentre outros, os microorganismos opsonizados, o fragmento C_{5a} do sistema complemento, o ácido aracdônico, o fator ativador de plaquetas (PAF) e citocinas (McPhail e Snyderman, 1983; McPhail et al., 1984; McPhail et al., 1985). São denominados fisiológicos visto haver na membrana celular receptores específicos para cada um deles.

Estímulos não fisiológicos podem, também, desencadear a “explosão respiratória” como, por exemplo, os ésteres de forbol miristato acetato (FMA), os quais são utilizados nos ensaios laboratoriais no estudo destes radicais livres (Robinson et al., 1985).

1.5- Medicamentos

Como já mencionado, no LES o antígeno é perene e acarreta uma resposta constante do sistema imune criando um círculo vicioso que retroalimenta e perpetua a doença. O tratamento das doenças auto-imunes utiliza drogas com efeito antiinflamatório e imunossupressor que visam, através da inibição desta resposta, quebrar este círculo vicioso.

Dentre as drogas freqüentemente utilizadas no tratamento do LES estão os antiinflamatórios não hormonais, os corticosteróides, os antimaláricos e os citostáticos. É importante uma breve revisão dos mecanismos de ação destes medicamentos visto que estes podem alterar a liberação do ânion SO.

Antiinflamatórios não hormonais

Os antiinflamatórios não hormonais (AINH) fazem parte de um grupo heterogêneo de compostos químicos, a maioria de ácidos orgânicos. Todos têm efeito analgésico, antitérmico e antiinflamatório (Roberts e Morrow, 2001)

Quando ocorre uma lesão da membrana celular, que é constituída fundamentalmente de fosfolípidos, a enzima fosfolipase A2, presente nos leucócitos e plaquetas, é ativada levando à degradação destes fosfolípidos, resultando no ácido aracdônico. Este, ao ser metabolizado, forma os leucotrienos pela ação da enzima lipoxigenase e, pela ação da enzima cicloxigenase (COX), geram-se as prostaglandinas (PG), as prostaciclina(PC) e os tromboxanos(TX). (Figura 1-2)

As prostaglandinas, dentre outras funções promovem o relaxamento do músculo liso, têm ação vasodilatadora, aumentando o fluxo sangüíneo. Quando sua produção é aumentada ocorre um incremento da resposta inflamatória. Os AINH agem inibindo a ação da cicloxigenase com conseqüente diminuição da produção de prostaglandinas, diminuindo a atividade inflamatória.

As indicações dos AINH no LES estão limitadas às manifestações potencialmente menos danosas como artrite, mialgia, febre, serosite, cefaléia. Importante é a indicação do ácido acetilsalicílico, visto sua potente e prolongada ação como antiagregante plaquetário, pela inibição do Tromboxano A₂, nos pacientes com a síndrome do antifosfolípide (Clements e Paulus, 1997).

Alguns AINH podem inibir a atividade ou a expressão de certas moléculas de adesão como as moléculas de adesão intracelular (ICAM-1) ou a moléculas de adesão celular vascular (VCAM-1) (Diaz-Gonzales e Sanches-Madrid, 1998), ou agir em outros locais do processo inflamatório (Vane e Botting, 1995).

Corticosteróides

Os corticosteróides devido à sua atividade antiinflamatória são as drogas de escolha no tratamento ou controle das doenças auto-imunes. Sua ação é ampla e variada, interferindo no metabolismo dos hidratos de carbono, lípidos e proteínas, bem como no equilíbrio hidroeletrolítico; alteram as funções dos sistemas cardiovascular, renal, endócrino, nervoso e imune.

Segundo Schimmer e Parker (2001) os corticosteróides são classificados segundo três critérios: capacidade de retenção de sódio (Na^+), o efeito no metabolismo dos hidratos de carbono e a potência antiinflamatória. Conforme sua ação principal, retenção salina ou antiinflamatória, são respectivamente divididos em mineralocorticóides ou glicocorticóides, sendo estes freqüentemente utilizados no tratamento das doenças reumáticas.

Os glicocorticóides entram passivamente nas células, se ligam ao receptor específico, os complexos migram para o núcleo da célula, onde induzem genes que codificam proteínas importantes no processo inflamatório como, por exemplo, a proteína inibidora da fosfolipase A_2 , o que implicará em uma diminuição das prostaglandinas (PG), das prostaciclina (PC) e dos tromboxanos (TX), que são importantes agentes pró-inflamatórios (Figura 2).

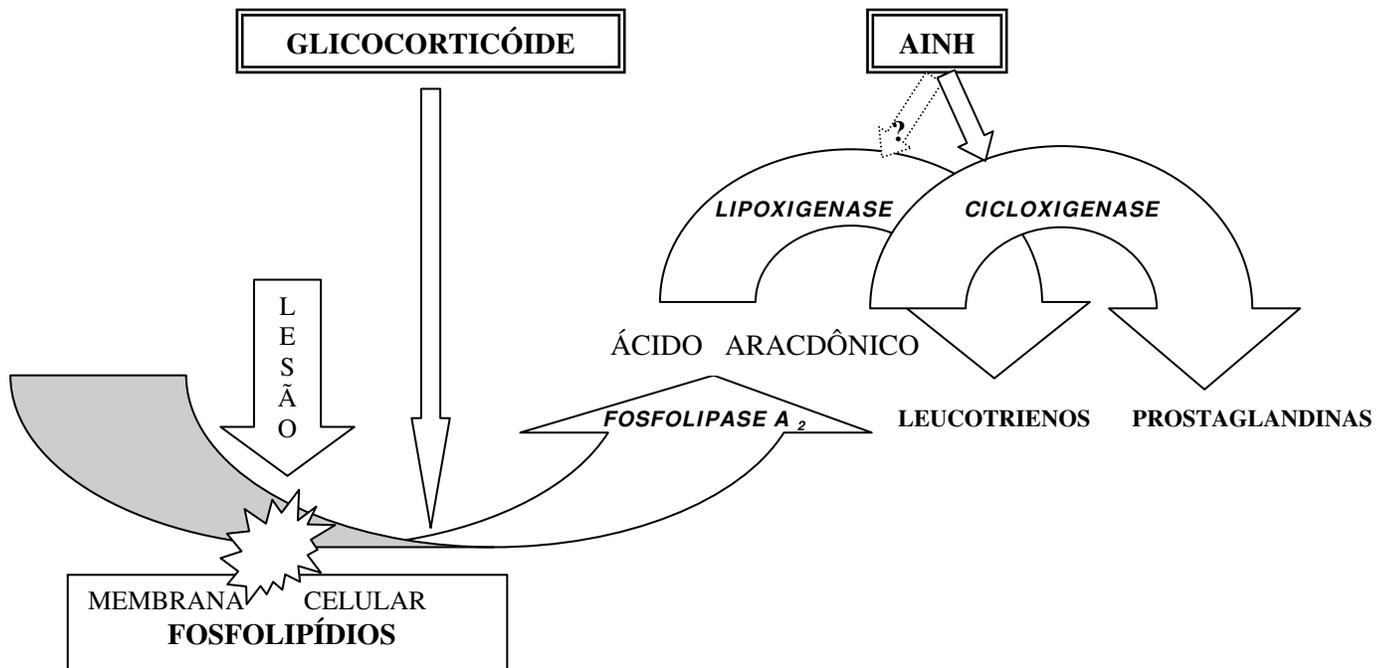


Figura 2- Esquema de atuação dos anti-inflamatórios não hormonais (AINH) e os hormonais (glicocorticóides) na inibição da produção dos leucotrienos e prostaglandinas

Este mecanismo de ação, visto a necessidade de codificação e expressão de proteínas, diferente dos AINH, não é imediato, demorando várias horas para se tornar aparente (Schimmer e Parker, 2001).

Os glicocorticóides atuam na fase aguda da inflamação diminuindo o edema, a deposição de fibrina, a migração dos linfócitos e a atividade fagocitária; atuam também na fase posterior diminuindo a proliferação de capilares e a deposição de colágeno; muitos destes efeitos são devidos à diminuição da síntese de várias quimiocinas e citocinas.

O efeito imunossupressor dos glicocorticóides se faz principalmente pela diminuição dos linfócitos T, sendo que esta ação é mais pronunciada nos T “*helper*” do que nos T citotóxicos; os linfócitos B também sofrem ação dos corticóides, porém, em menor intensidade. O nadir da linfopenia ocorre entre 4 e 8 horas após uma única administração do glicocorticóide, e a recuperação ocorre em 24 horas. Os monócitos sofrem uma diminuição de aproximadamente 90% nas primeiras 6 horas (Laxer e Gazarian, 2001). A tabela 1 mostra, de forma resumida, as células, os produtos gerados e a respectiva ação no processo inflamatório.

Tabela 1- Efeito dos glicocorticóides na resposta inflamatória e imune

CÉLULA	FATOR	AÇÃO
Linfócitos	Citocinas IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, IL-8, IL-12 TNF- α Fator estimulante da colonização de granulócitos e monócitos (GM-CSF) Intérferon gama (INF- γ)	Inibição da produção via síntese de lipocortina que inibe a fosfolipase A ₂ Produção e liberação são bloqueadas. As citocinas ampliam os efeitos inflamatórios Inibem formação dos reativos inclusive do terceiro componente do complemento
Macrófagos e monócitos	Ácido aracdônico e seus metabólitos Citocinas IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, IL-8, IL-12 Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) Reativos da fase aguda	Inibição da produção via síntese de lipocortina que inibe a fosfolipase A ₂ Produção e liberação são bloqueadas. As citocinas ampliam os efeitos inflamatórios Inibem formação dos reativos inclusive do terceiro componente do complemento
Células endoteliais	Moléculas de adesão endotelial (ELAM-1) Moléculas de adesão intracelular (ICAM-1) Citocinas IL-1, IL-6 Reativos da fase aguda Ácido aracdônico e seus metabólitos	Importantes para a fixação dos leucócitos
Basófilos	Histamina Leucotrienos	Inibem a liberação de IgE
Fibroblastos	Ácido aracdônico e seus metabólitos	Inibição da fosfolipase A ₂ Inibe proliferação de fibroblastos

Schimmer e Parker (2001)

Antimaláricos

Os antimaláricos são utilizados no tratamento do lúpus cutâneo desde 1894, porém, apenas a partir de 1954, 14 anos após a síntese da cloroquina e hidroxicloroquina, que são menos tóxicas que os antecessores, é que estas drogas começam a ser utilizadas no tratamento do LES. São utilizados também como drogas no tratamento de diversas outras doenças crônicas como a artrite reumatóide, a artrite reumatóide juvenil, sarcoidose, doenças de fotossensibilidade (Wallace, 1997).

Estas duas drogas são praticamente totalmente absorvidas pelo trato gastrointestinal, se ligam às proteínas plasmáticas e são depositadas nos tecidos.

A cloroquina pode se concentrar em altas doses no fígado, no baço, nos rins, nos pulmões, em elementos sanguíneos e em tecidos pigmentados; a excreção é renal e é lenta, podendo ser detectada na urina até 5 anos após a interrupção do tratamento. Também é excretada no leite, recebendo o lactente uma dose menor que 1% da dose plasmática materna (Wallace, 1997).

A hidroxicloroquina tem a mesma farmacocinética que a cloroquina, porém com meia vida mais curta; o estado de equilíbrio da concentração sérica é alcançado ao redor de seis meses.

Os antimaláricos agem nos processos inflamatórios podendo afetar a resposta imunológica. Devido à alta concentração que alcançam nos tecidos provocam uma aumento do pH citoplasmático, o que altera os processos dos receptores e efetores celulares como, por exemplo, inibindo a atividade da fosfolipase, a síntese de DNA e de RNA, e das reações antígeno-anticorpo.

De particular importância quanto à fotossensibilidade em pacientes lúpicos, é o fato de que os antimaláricos têm um efeito protetor contra os raios ultravioleta (UV) que podem desencadear ou agravar a doença nestes pacientes; esta proteção é dada, quando a pele está impregnada com estes medicamentos pois estes absorvem os UV (Wallace, 1997).

Os antimaláricos podem inibir a geração do superóxido pelos polimorfonucleares agindo em diferentes locais da via metabólica (Hurst et al., 1986; Miyachi et al., 1986; Hurst et al., 1987; Hurst et al., 1988; Salmon et al., 1990).

O efeito terapêutico dos antimaláricos é devido a vários mecanismos de ação como, por exemplo, a absorção da radiação ultravioleta, o bloqueio do processamento do antígeno, a diminuição da produção de interleucinas e do TNF- α , inibição da ação da fosfolipase A₂ e da agregação e adesão plaquetárias, diminuição das atividades de fagocitose e quimiotaxia, bem como bloqueio da produção de superóxido.

Citostáticos

Os citostáticos são drogas largamente empregadas no tratamento de pacientes lúpicos (McCune, 1997). Agem inibindo a divisão celular ou causando a morte celular; atuam principalmente nas células com divisão rápida como nas do sistema imune, particularmente os linfócitos T; apresentam uma ação mais rápida, antiinflamatória, e uma outra, mais retardada, imunossupressora (Laxer e Gazarian, 2001).

Os citostáticos freqüentemente utilizados no tratamento de pacientes da faixa etária pediátrica com LES, da mesma forma que nos adultos, são a azatioprina, a ciclofosfamida, a ciclosporina A.

Azatioprina

A azatioprina, um análogo da purina, é inativo até ser metabolizado no fígado ou no eritrócito para 6-mercaptopurina, que é novamente metabolizada pela enzima hipoxantina fosforibosil transferase para ácido 6-tio-inosínico, o qual suprime a síntese de adenina e guanina e, conseqüentemente, do DNA.

Devido à inibição do desenvolvimento das células T durante a fase S da divisão celular, há um menor número de células com conseqüente diminuição da resposta imune e inibição da atividade dos monócitos.

Ciclofosfamida

A ciclofosfamida é um agente alquilante, derivado da mostarda nitrogenada, inativo até ser metabolizado, principalmente no fígado pelo citocromo P450, para o componente ativo que é a mostarda fosforamida; esta se une à guanina do DNA, destrói o anel purínico e interrompe a duplicação celular.

A ciclofosfamida age potencialmente em todas as células, mesmo nas inativas do ponto de vista de divisão celular como por exemplo as células T de memória, tendo como consequência uma atividade antiinflamatória e uma ação imunossupressora. A ação sobre as células B parece ser mais intensa que sobre as células T, havendo uma diminuição da produção de IgG e IgM que pode ser quantificada após uso prolongado desta droga. A leucopenia e a trombocitopenia são os efeitos colaterais mais frequentes (Laxer e Gazarian, 2001).

O acometimento da fertilidade deve ser considerado, pois para uma mesma dose de ciclofosfamida a chance de infertilidade é maior quanto mais velho for o indivíduo. (Rivkees e Crawford, 1988; Mok et al., 1998).

Ciclosporina

A ciclosporina é um polipeptídeo inativo proveniente do metabolismo do fungo *Bauveria nivea*, que ao encontrar seu receptor intracelular, a ciclofilina, forma um complexo que se liga à calcineurina fosfatase inibindo sua atividade, que é de permitir o deslocamento para dentro do núcleo do fator nuclear de ativação dos linfócitos T (NFAT); este fator é necessário para a transcrição da IL-2 e outras citocinas (Krensky, 2001).

1.6- Atividade da doença

O espectro de manifestações do LES é muito amplo; avaliar o grau de atividade da doença é importante para que se possa programar um esquema terapêutico, instituí-lo e, posteriormente, avaliá-lo.

Embora existam muitos sistemas propostos para avaliar a atividade da doença lúpica, não existe um consenso ou um método claramente definido e universalmente aceito para tal. Os vários sistemas de avaliação da atividade do LES, como o British Isles Lupus Assessment Group (BILAG), o Systemic Lupus Activity Measure (SLAM), o Lupus Activity Index (LAI) e o Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index (SLEDAI), dentre outros, utilizam como variáveis as manifestações clínicas, o resultado dos exames laboratoriais, ou a dosagem do medicamento que o paciente está recebendo em um determinado período de tempo; a cada variável é atribuída uma pontuação conforme escala individualizada para cada sistema. As variáveis dos sistemas são diferentes de um para outro método, com pontuações diferentes em cada uma, mas todos são concordes em considerar que quanto maior a pontuação a atividade da doença é mais intensa (Kaluniam, 1997).

O SLEDAI avalia 24 itens em nove sistemas orgânicos, tendo um máximo de 105 pontos; o BILAG avalia 86 itens em oito sistemas, e a pontuação máxima é 32; o SLAM avalia 32 itens abrange 11 sistemas e a pontuação máxima é 86.

Petri et al. (1991) demonstraram que o LAI e o SLEDAI conseguem detectar mudanças na atividade da doença e que estes métodos são ferramentas importantes no acompanhamento destes pacientes.

Gladman et al. (1994) realizaram um estudo para avaliar a sensibilidade de três métodos, o BILAG, o SLEDAI e o SLAM, e chegaram à conclusão que os três métodos são bem correlacionados, detectam diferenças entre os pacientes, mas apenas o SLEDAI consegue diferenciar a atividade entre as consultas de um paciente.

O SLEDAI é, de fato, um dos métodos mais utilizados em adultos e que foi referendado para o uso em pacientes pediátricos (Bombardier et al., 1992). Este método leva em consideração as manifestações clínicas ou laboratoriais ocorridas nos últimos dez dias que antecedem a avaliação. Consta de 24 itens tendo cada um deles um peso conforme a gravidade da manifestação; as manifestações clínicas têm um peso maior, ficando as laboratoriais com os menores (Anexo 1).

1.7- Liberação de ânion SO e atividade da doença

A liberação do ânion SO foi estudada no LES e em outras doenças auto-imunes por alguns autores. Hashimoto et al. (1982) estudaram a resposta inflamatória de PMN obtidos de pessoas híidas quanto à capacidade de produção de SO, quando incubados em soro de três grupos de pacientes adultos com doença auto-imune, e observaram um aumento significativo na liberação de SO pelos PMN incubados no soro dos pacientes com LES em atividade.

Bruce et al. (1997) estudando a lesão vascular das enfermidades reumatológicas quantificaram a liberação de SO pelos monócitos de um grupo de 24 pacientes com vasculite sistêmica primária e observaram uma maior liberação que a dos monócitos de um grupo de 20 indivíduos com vasculite auto-imune, de 12 pacientes com vasculite periférica e de um grupo de oito pacientes transplantados renais; os valores também eram significativamente maiores que os encontrados em um grupo controle de 56 indivíduos. Cabe ressaltar que, apesar da liberação de SO pelos monócitos do grupo de pacientes com vasculite auto-imune ter sido a segunda maior, não houve diferença estatisticamente significativa com nenhum dos outros três grupos com menor liberação de SO. Estes dados levaram os autores a concluir que os monócitos em determinadas enfermidades produzem mais SO, porém não esclarecem se este mecanismo é lesivo ou se é cicatricial.

Em trabalho realizado por Jiang e Chein (1992) estudaram-se 83 pacientes com LES analisando a atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e peroxidase lipídica (POL), associadas aos parâmetros laboratoriais FAN, anti-DNA e C3 destes pacientes. Os autores observaram que nos pacientes com LES ativo a atividade da enzima POL estava significativamente elevada ao passo que a SOD significativamente diminuída, quando comparadas à atividade das enzimas de 29 indivíduos sadios utilizados como controle. Neste trabalho os pacientes lúpicos foram classificados conforme a atividade da doença em três grupos: o primeiro com 31 pacientes que até o momento do experimento não haviam recebido nenhuma medicação e que estavam em atividade, o segundo com 26 pacientes em atividade apesar de estarem recebendo terapêutica específica como corticosteróides, imunossupressores e agentes antioxidantes, e o terceiro grupo também com 26 pacientes inativos. Os parâmetros para considerar atividade ou não da doença foram o envolvimento

renal, e ou das serosas e ou do sistema nervoso central; os indivíduos classificados como sem atividade não apresentavam nenhum de qualquer dos três acometimentos anteriormente citados.

Houve uma correlação significativa dos níveis elevados da POL com elevados níveis de FAN e de anti-DNA, com níveis diminuídos de C3, bem como observaram que a diminuição da atividade da SOD estava correlacionada aos níveis elevados de anti-DNA e baixos de C3. Estes dados são concordes com a hipótese de que no LES em atividade há uma maior produção de SO, com conseqüente dano tissular, bem como que a mensuração do ânion superóxido poderia ser mais um indicativo desta atividade.

Vários autores como Cencetti et al. (1990), Macconi et al. (1993), Halliwell (1995), Miesel et al. (1996), Mur et al. (1997), Freitas et al. (1998), Yoshida et al. (1998), Sambo et al. (1999), estudaram a produção do ânion SO em pacientes com doença auto-imune, outros poucos como Hashimoto et al. (1982), Niwa et al. (1984), Yu et al. (1989), Jiang e Chen (1992), Bruce et al. (1997), Nielsen et al. (1998), estudaram particularmente esta liberação em paciente com LES.

Todos os trabalhos citados relacionando a doença LES e o ânion SO foram realizados em pacientes adultos, não havendo trabalhos que tenham estudado esta relação em pacientes com LESJ, que é o escopo deste trabalho.

2- JUSTIFICATIVA DO TRABALHO

O estudo do comportamento dos polimorfonucleares neutrófilos e monócitos de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico juvenil (LESJ) no tocante à liberação do ânion SO poderá nos levar a detectar se há diferenças significativas entre indivíduos sadios e doentes com LESJ, e se também há diferenças na produção entre os indivíduos com e sem atividade da doença.

Os resultados deste trabalho poderão contribuir para ampliar a compreensão do mecanismo patogênico desta doença auto-imune, fornecendo informações do comportamento do ânion SO nesta doença.

3- OBJETIVOS

3.1- Objetivos gerais

Avaliar a liberação do ânion superóxido pelos polimorfonucleares neutrófilos e monócitos de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico juvenil.

3.2- Objetivos específicos

Avaliar a liberação do ânion superóxido pelos polimorfonucleares neutrófilos e monócitos de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico juvenil classificados quanto à atividade da doença.

4- PACIENTES E MÉTODOS

4.1- Tipo de estudo

Realizou-se um estudo analítico transversal, com dados e amostras sanguíneas colhidos de pacientes do serviço de Reumatologia Pediátrica do Departamento de Pediatria da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (FCM-UNICAMP).

4.2- Local de estudo

A assistência ao paciente e a coleta das amostras para a realização dos ensaios para o ânion SO realizaram-se no Ambulatório de Pediatria e no setor de coleta do Laboratório de Patologia Clínica do Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (HC-UNICAMP).

Os ensaios para determinação do ânion SO realizaram-se no laboratório de Biologia Molecular e Cultura de Células do Centro de Investigação em Pediatria (CIPED)

4.3- Pacientes

Analisou-se 23 pacientes (3M / 20F) acompanhados no ambulatório de reumatologia pediátrica do HC-UNICAMP com diagnóstico de Lúpus Eritematoso Sistêmico Juvenil (LESJ).

4.4- Grupo controle

Utilizou-se como grupo controle os dados previamente obtidos de uma população de 35 indivíduos adultos, de ambos os sexos, constituída de pós-graduandos, técnicos de laboratório, residentes, estagiários e outros funcionários que freqüentavam o CIPED; os controles não tinham nenhuma patologia crônica, não estavam agudamente doentes, nem haviam utilizado quaisquer medicamentos nas duas últimas semanas.

4.5- Aspectos éticos

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, estando em acordo com as determinações do Conselho Nacional de Saúde (Resolução 196/96 e 251/97), (processo 308/2003) (Apêndice 1).

Foi obtido o consentimento pós-informação verbal e por escrito de todos os pacientes ou dos responsáveis (Apêndice 2).

4.6- Critérios de inclusão

Todos os pacientes apresentaram pelo menos quatro dos onze critérios definidos pelo ACR (Tan et al., 1982) para o diagnóstico de LES.

Todos os pacientes tiveram o início dos sintomas antes dos 16 anos de idade.

4.7- Critérios de exclusão

Foram excluídos os pacientes com LESJ que apresentavam associação com outras doenças crônicas ou neoplásicas.

Foram excluídos os pacientes que apresentavam na ocasião do estudo qualquer quadro infeccioso que tivesse um potencial de comprometimento sistêmico.

4.8- Critérios de classificação

Os pacientes foram classificados em dois grupos utilizando os critérios do Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index - SLEDAI (Bombardier et al., 1992).

Foram considerados como LES inativo (LES (-)) os pacientes com pontuação até cinco pontos e LES ativo (LES (+)) os com pontuação maior ou igual a seis.

4.9- Coleta das amostras

No dia em que o paciente compareceu ao HC-UNICAMP para a coleta dos exames laboratoriais rotineiramente realizados para o acompanhamento da doença utilizou-se a mesma punção venosa para a retirada de uma alíquota específica para a realização do estudo do ânion superóxido (SO).

Os pacientes foram orientados a permanecer em jejum desde as 22:00 horas do dia anterior, e a não realizar exercício físico nas 24 horas que antecederem a coleta.

Os exames de laboratório solicitados para controle dos pacientes com LES foram os seguintes: hemograma, dosagem de complemento sérico (C3 e C4), titulação do anti-ácido desoxirribonucleico (ADNA), titulação do fator anti-núcleo (FAN), urina I e proteinúria de 24 hs.

As amostras para o ensaio do SO foram imediatamente encaminhadas e processadas no laboratório de Biologia Molecular e Cultura de Células do CIPED.

Os demais exames laboratoriais seguiram a rotina do hospital e foram realizados pelo laboratório de Patologia Clínica do HC-UNICAMP.

Os resultados dos exames laboratoriais foram anotados em ficha individual; constam desta ficha os medicamentos em uso e a pontuação do SLEDAI (Apêndice 3).

O intervalo máximo de tempo entre a coleta dos exames e a posterior consulta médica para a avaliação clínica e pontuação pelo SLEDAI foi de 14 dias.

4.10- Determinação do ânion superóxido

De cada paciente estudou-se a liberação do ânion SO pelos polimorfonucleares e pelos monócitos de duas formas, uma espontânea, e outra estimulada pelo forbol miristato acetato.

Para a determinação do SO utilizou-se a técnica de separação de leucócitos segundo o método de centrifugação em gradiente variado de densidade em Ficoll-Hipaque (Boyum, 1968).

O primeiro passo foi a separação dos leucócitos do sangue suspenso em Dextran – T 500, durante 40 minutos, a seguir a suspensão celular foi lavada três vezes (por serem os leucócitos mais leves, ficam separados acima das hemácias).

Em um tubo cônico de 15 ml, preparamos uma suspensão de 3 ml de Histopaque®-1119 e 3ml de Histopaque®-1077; a adição do segundo componente foi feita cuidadosamente a fim de não haver mistura entre as soluções das diferentes densidades.

Foi feita a aspiração do sobrenadante da suspensão de células e, suavemente, transferiu-se 6 ml para o tubo cônico, deixando-o escorrer pela parede do tubo, a fim de evitar a mistura dos 3 componentes.

A seguir procedeu-se à centrifugação a 700 g durante 30 minutos. Ao término observou-se a separação dos diferentes elementos do sangue. As poucas hemácias restantes ficaram no fundo; os polimorfonucleares formaram um anel acima do Histopaque®-1119, e os mononucleares um anel acima do Histopaque®-1077. O plasma formou o anel mais alto do tubo após a centrifugação.

O próximo passo foi a separação dos mononucleares pela aspiração e transferência para outro tubo identificado, sendo o mesmo processo realizado com os polimorfonucleares que estavam na camada inferior.

Efetou-se então a contagem e cálculo da viabilidade celular em uma lâmina com a câmara de Neubauer. A suspensão foi ajustada a fim de conter 2×10^7 células/ml em solução de Hanks, sem cálcio, magnésio ou vermelho de fenol.

A liberação de O_2^- pelos polimorfonucleares e pelos monócitos foi determinada pelo ensaio da redução do citocromo *c*, especificamente inibida pela super óxido dismutase (SOD) (McCord e Fridovich, 1969; Dias da Mota et al., 1996). Como já foi dito foram estudadas duas formas: a espontânea (leucócitos incubados apenas em solução de Hanks) e a estimulada (leucócitos incubados com forbol miristato acetato 30nM). Metade dos tubos continham SOD (60 U/ml) no início da reação, e foram usados como controle para a redução inespecífica do citocromo *c*. A absorbância da reação foi medida no espectrofotômetro a 550 nm nos tempos 0, 5, 15, 25, 45 e 60 minutos. A quantidade de SO

liberado foi calculada aplicando-se o coeficiente de extinção de $21.100\text{M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$. Os resultados em nmol de superóxido/ 10^6 células/tempo de incubação, foram expressos pela diferença de absorbância, ao mesmo tempo de experimento, entre os tubos com e sem a SOD.

4.11- Análise estatística dos dados

Utilizou-se inicialmente a Análise de Variância (AV) para comparar a liberação do ânion SO entre os três grupos de indivíduos, para cada um dos quatro tipos de ensaio e para cada tempo de reação, com medidas repetidas.

Na segunda análise comparou-se os dados obtidos do grupo de pacientes com LESJ, sem classificá-los quanto à atividade, e os do grupo de indivíduos controle. Neste estudo utilizou-se o teste de Mann-Whitney.

A seguir compararam-se os dados do grupo de pacientes com LESJ, classificados conforme a atividade da doença, e os dados dos indivíduos controle. Nesta análise dos três grupos, utilizou-se a Análise de Variância. Posteriormente utilizou-se o teste de Bonferroni para, efetuando as comparações múltiplas das médias para cada tipo de ensaio, determinar entre quais grupos e em que instante houve diferença significativa.

Consideramos o nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

5- RESULTADOS

5.1- Dados gerais

Foram estudados 23 pacientes com lúpus eritematoso sistêmico juvenil (3Ma / 20Fe), 17 de etnia caucasóide (Ca) e seis de etnia não caucasóide (NCa); a idade de início dos sintomas do LES variou de 1,9 a 13,7 anos; a idade média ao diagnóstico de LES foi de 10,9 anos, sendo o mais tardio aos 16,4 anos. O tempo de acompanhamento dos pacientes até o instante do ensaio para o ânion SO variou de zero até 22,2 anos.

5.2- Exames laboratoriais

Os exames laboratoriais colhidos concomitantes ao ensaio do ânion SO estão apresentados no Apêndice 3.

5.3- Atividade da doença

Os dados clínicos e laboratoriais utilizados na pontuação do SLEDAI de cada paciente são apresentados no Apêndice 4.

A avaliação dos pacientes pelos critérios do SLEDAI, classificou 15 (63 %), que receberam uma pontuação de até cinco pontos, como LES inativo (LES (-)) e oito (37 %) pacientes que receberam uma pontuação maior classificados como LES ativo (LES (+)).

Os dados epidemiológicos e a pontuação do SLEDAI individuais de cada um dos pacientes estão apresentados no Apêndice 5.

A distribuição dos pacientes conforme a classificação do SLEDAI é apresentada na Tabela 2.

Tabela 2- LESJ: Distribuição dos dados epidemiológicos dos 23 pacientes classificados quanto à atividade de doença pelo SLEDAI.

Dados epidemiológicos	inativo n = 15	ativo n = 8
sexo (Ma / Fe)	0 Ma / 15 Fe	3 Ma / 5 Fe
caucasóide(Ca) / não caucasóide (NCa)	11 Ca / 4 NCa	6 Ca / 2 NCa
idade* média do início dos sintomas	8,5 (1,9 a 13,7)	10,3 (8,5 a 12,3)
idade* média ao diagnóstico de LES	8,7 (4,5 a 16,4)	10,6 (9,9 a 12,5)
idade* média ao ensaio	12,4 (6,7 a 26,5)	11,42 (11,4 a 16)
tempo* médio de acompanhamento	2,89 (0 a 22,2)	0,8 (0 a 6,7)

* anos

Os dados brutos obtidos nos diferentes ensaios estão apresentados no Apêndice 6.

5.4- Análise global da liberação de ânion SO

Na primeira avaliação estudou-se a liberação do ânion SO nas medidas repetidas (tempos 0', 5', 15', 25', 45' e 60') para os quatro ensaios realizados, os polimorfonucleares espontâneos (PME), os polimorfonucleares ativados (PMA), os monócitos espontâneos (MOE) e os monócitos ativados (MOA) nos grupos de pacientes com LESJ e grupo controle; utilizou-se o método da Análise de Variância.

Observou-se uma diferença estatística significativa ($p < 0,001$) em todas as variáveis, conforme descrito na Tabela 3.

Tabela 3- LESJ: Análise global dos quatro ensaios realizados. Valores de Fv, graus de liberdade (GL) e probabilidade (p) da Análise de Variância.

Variáveis	Fv	GL	p
PME	12,437	5; 255	< 0,001
PMA	67,912	5; 220	< 0,001
MOE	13,495	5; 250	< 0,001
MOA	75,893	5; 250	< 0,001

Fv razão das variâncias entre e dentre as amostras

GL graus de liberdade

p probabilidade de semelhança das amostras

Observou-se portanto um comportamento diferente da liberação de ânion SO em cada um dos quatro tipos de ensaio.

5.5- Liberação de ânion SO pelos pacientes com LESJ

A seguir analisou-se a liberação do ânion SO pelos 23 pacientes com LESJ, nas medidas repetidas (tempos 0', 5', 15', 25', 45' e 60') para os quatro ensaios realizados: polimorfonucleares espontâneos (PME), polimorfonucleares ativados (PMA), monócitos espontâneos (MOE) e monócitos ativados (MOA) e, independentemente da atividade da doença, comparou-se com a liberação do ânion SO pelo grupo controle.

5.5.1- Polimorfos nucleares espontâneos (PME)

Os resultados obtidos, a média e o desvio padrão são apresentados na Tabela 4. Observou-se que neste ensaio os PME dos indivíduos com LESJ apresentaram uma liberação de ânion SO sempre menor que a dos indivíduos controle, mas apenas nos instantes 45 e 60 minutos a mesma foi significativa. A representação está no Gráfico 1.

Tabela 4- LESJ: Média (M) e desvio padrão (DP) da liberação de ânion SO* pelos PME dos grupos LES e Controle nos diferentes instantes de tempo de incubação.

Grupo	tempo	0'	5'	15'	25'	45'	60'
LESJ	n	22	22	22	23	22	23
	M(DP)	0,95 (\pm 0,44)	1,09 (\pm 0,41)	1,32 (\pm 0,60)	1,59 (\pm 0,72)	1,52 (\pm 0,79)	1,63 (\pm 0,86)
Controle	n	35	34	35	35	35	35
	M(DP)	1,14 (\pm 0,52)	1,30 (\pm 0,68)	1,61 (\pm 0,94)	1,64 (\pm 1,17)	2,12 (\pm 1,30)	2,32 (\pm 1,42)
p (Mann-Whitney)		ns	ns	ns	ns	0,050	0,047

* em nmol por 10^6 células

n número de indivíduos

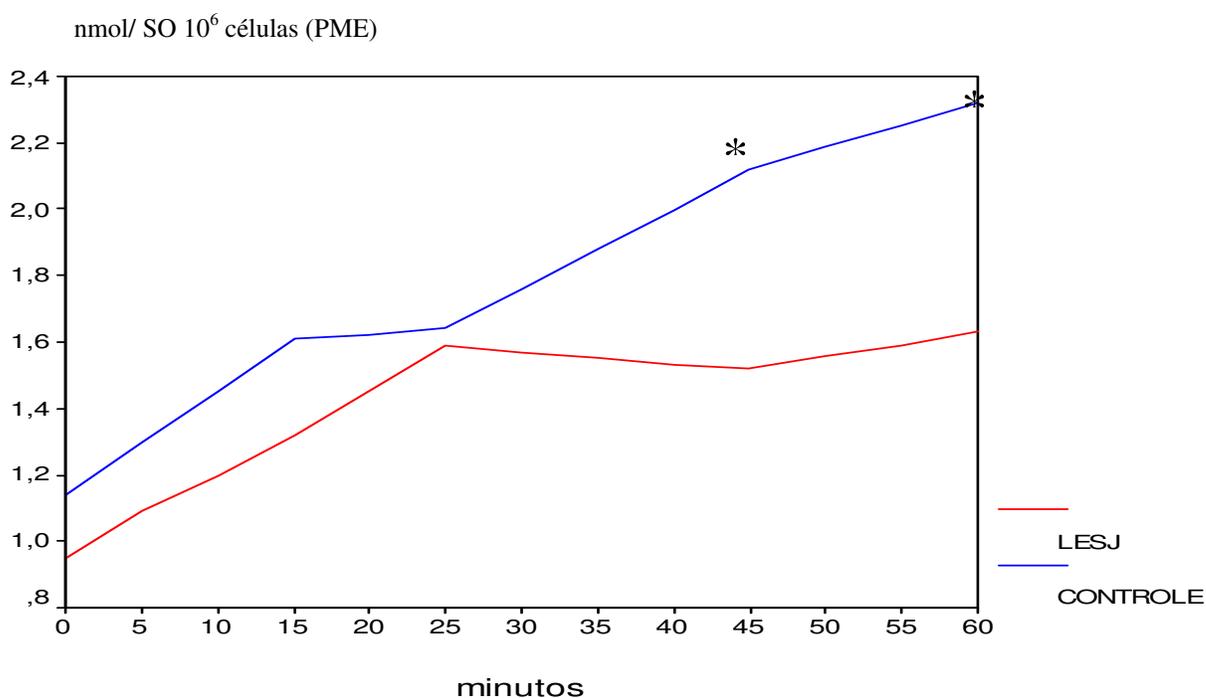


Gráfico 1-LESJ: Liberação de ânion SO pelos PME dos grupos LESJ e Controle

5.5.2- Polimorfos nucleares ativados (PMA)

Os resultados obtidos, a média e o desvio padrão são apresentados na Tabela 5. Observou-se que neste ensaio os PMA dos indivíduos com LESJ apresentaram uma liberação de ânion SO, nos instantes iniciais, maior que a dos indivíduos controle; nos instantes 45 e 60 minutos foi menor, sendo que nos instantes 00, 05 e 60 minutos a diferença foi significativa. A representação está no Gráfico 2.

Tabela 5- LESJ: Média (M) e desvio padrão (DP) da liberação de ânion SO* pelos PMA dos grupos LES e Controle nos diferentes instantes de tempo de incubação.

Grupo	tempo	0'	5'	15'	25'	45'	60'
LESJ	n	18	18	18	18	18	18
	M(DP)	3,39 (\pm 2,29)	7,65 (\pm 3,08)	9,13 (\pm 2,80)	9,58 (\pm 2,71)	10,17 (\pm 1,98)	9,69 (\pm 2,20)
Controle	n	30	29	30	30	30	30
	M(DP)	2,34 (\pm 2,27)	4,54 (\pm 3,93)	7,13 (\pm 4,26)	9,16 (\pm 3,71)	11,30 (\pm 2,53)	11,78 (\pm 2,18)
p (Mann-Whitney)		0,022	0,002	ns	ns	ns	0,047

* em nmol por 10^6 células

n número de indivíduos

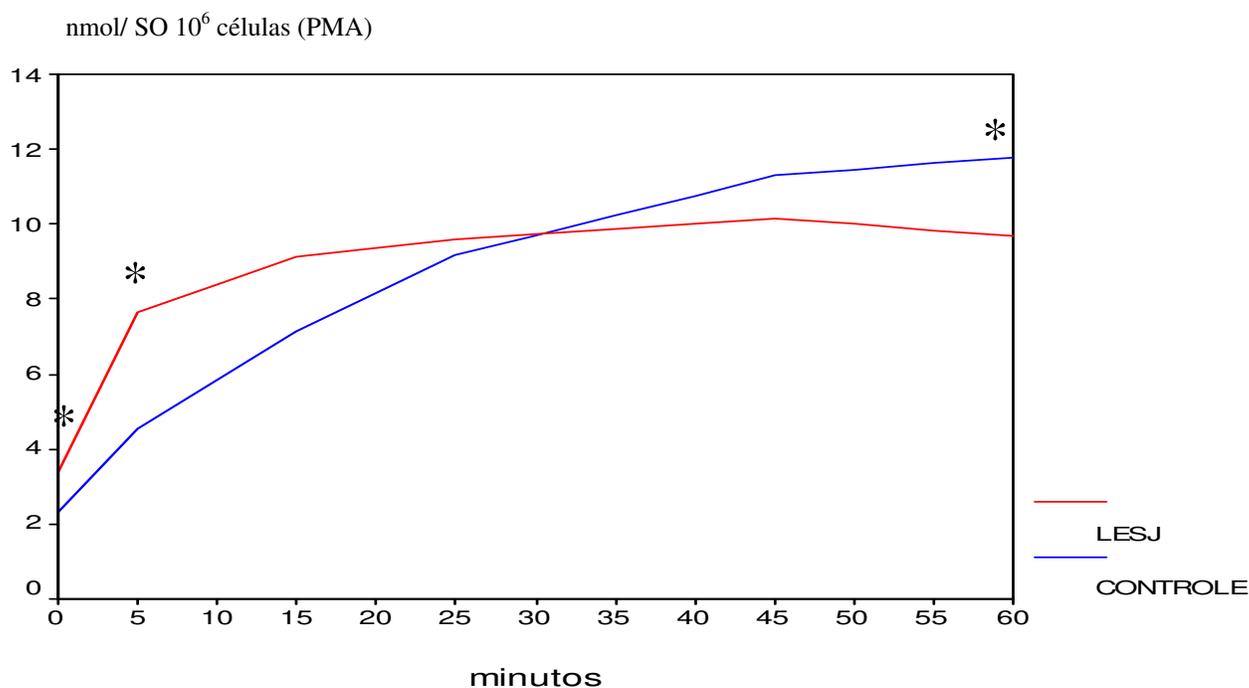


Gráfico 2- LESJ: Liberação de ânion SO pelos PMA dos grupos LESJ e Controle

5.5.3- Monócitos espontâneos (MOE)

Os resultados obtidos, a média e o desvio padrão são apresentados na Tabela 6. Observou-se neste ensaio que os MOE dos indivíduos com LESJ apresentaram uma liberação de ânion SO sempre menor que a dos indivíduos controle, e que a mesma foi significativamente menor em todos os instantes exceto no inicial e aos 15 minutos do ensaio. A representação está no Gráfico 3.

Tabela 6- LESJ: Média(M) e desvio padrão (DP) da liberação de ânion SO* pelos MOE dos grupos LES e Controle nos diferentes instantes de tempo de incubação.

Grupo	tempo	0'	5'	15'	25'	45'	60'
LESJ	n	21	21	21	21	23	23
	M(DP)	0,96 (\pm 0,45)	0,96 (\pm 0,53)	1,15 (\pm 0,47)	1,16 (\pm 0,66)	1,29 (\pm 0,85)	1,65 (\pm 1,13)
Controle	n	34	33	34	34	34	34
	M(DP)	1,29 (\pm 0,68)	1,30 (\pm 0,58)	1,38 (\pm 0,56)	1,45 (\pm 0,60)	1,69 (\pm 0,62)	1,78 (\pm 0,63)
p (Mann-Whitney)		ns	0,012	ns	0,048	0,002	0,035

* em nmol por 10^6 células

n número de indivíduos

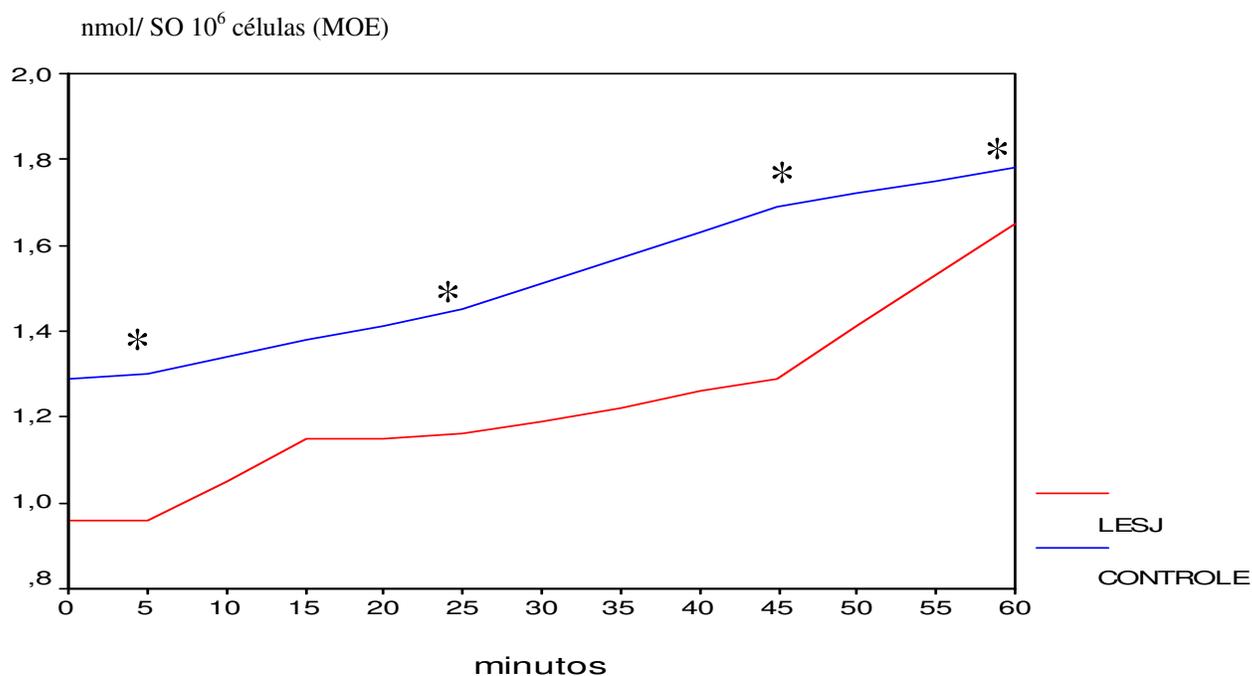


Gráfico 3- LESJ: Liberação de ânion SO pelos MOE dos grupos LESJ e Controle

5.5.4- Monócitos ativados (MOA)

Os resultados obtidos, a média e o desvio padrão são apresentados na Tabela 7. Observou-se que neste ensaio os MOA dos indivíduos com LESJ apresentaram uma liberação de ânion SO maior que a dos indivíduos controle até o instante 25 minutos do ensaio, porém em todo o ensaio não houve diferença significativa. A representação está no Gráfico 4.

Tabela 7- LESJ: Média(M) e desvio padrão (DP) da liberação de ânion SO* pelos MOA dos grupos LES e Controle nos diferentes instantes de tempo de incubação.

grupo	tempo	0'	5'	15'	25'	45'	60'
LESJ	n	20	21	21	21	21	21
	M(DP)	1,73 (\pm 1,07)	3,18 (\pm 1,88)	4,90 (\pm 2,42)	5,90 (\pm 2,81)	6,74 (\pm 2,78)	7,43 (\pm 3,29)
Controle	n	34	33	34	34	34	34
	M(DP)	1,57 (\pm 1,20)	2,68 (\pm 2,20)	4,33 (\pm 3,38)	5,79 (\pm 3,78)	7,56 (\pm 3,69)	8,64 (\pm 3,68)
p (Mann-Whitney)		ns	ns	ns	ns	ns	ns

* em nmol por 10^6 células

n número de indivíduos

nmol/ SO 10^6 células (MOA)

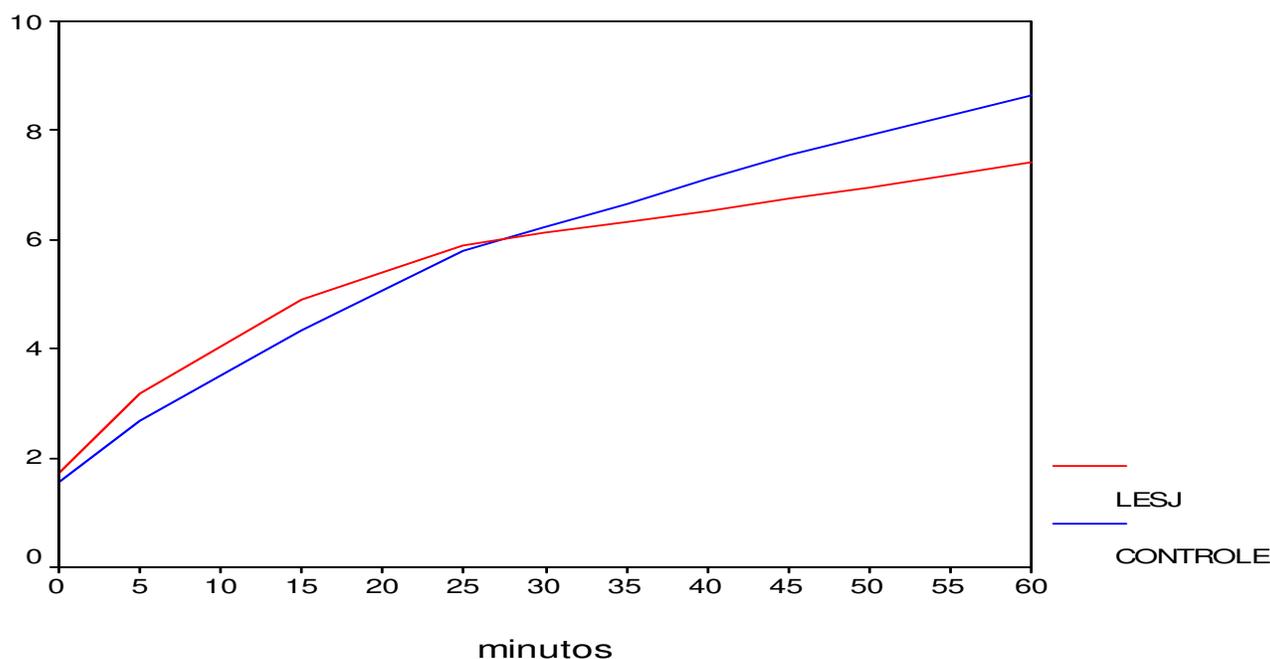


Gráfico 4- LESJ: Liberação de ânion SO pelos MOA dos grupos LESJ e Controle

5.6- Liberação de ânion SO pelos pacientes com LESJ conforme a atividade de doença

A seguir avaliou-se a liberação de SO obtida pelos 15 pacientes LES inativo, pelos oito pacientes LES ativo, comparada com a dos 35 indivíduos Controle (C), nos diferentes tempos do experimento particularizando cada um de acordo com os quatro tipos de ensaio realizados.

As Tabelas 8, 10, 12 e 14 apresentam a média e desvio padrão destes resultados.

Os gráficos 5 a 8 representam as médias da liberação de SO obtidas pelos 15 pacientes LES inativo, pelos oito pacientes LES ativo e a dos 35 indivíduos Controle (C), nos diferentes tempos do experimento de acordo aos quatro tipos de ensaio realizados.

5.6.1- Polimorfos nucleares espontâneos (PME)

Os valores obtidos nos ensaios dos PME são apresentados na Tabela 8 e a representação destes resultados está no Gráfico 5.

Tabela 8- LESJ: Média(M) e desvio padrão (DP) da liberação de ânion SO* pelos PME nos três grupos nos diferentes instantes de tempo de incubação.

Grupo	tempo	0'	5'	15'	25'	45'	60'
LES inativo	n	14	14	15	15	14	15
	M(DP)	0,86 (± 0,37)	0,94 (± 0,32)	1,18 (± 0,62)	1,49 (± 0,78)	1,36 (± 0,83)	1,50 (± 0,92)
LES ativo	n	8	8	7	8	8	8
	M(DP)	1,13 (± 0,53)	1,35 (± 0,43)	1,64 (± 0,47)	1,79 (± 0,60)	1,81 (± 0,70)	1,88 (± 0,72)
Controle	n	35	34	35	35	35	35
	M(DP)	1,14 (± 0,52)	1,30 (± 0,68)	1,61 (± 0,94)	1,64 (± 1,17)	2,12 (± 1,30)	2,32 (± 1,42)
TOTAL	n	57	56	57	58	57	58
	M(DP)	1,07 (± 0,50)	1,22 (± 0,59)	1,50 (± 0,83)	1,62 (± 1,01)	1,89 (± 1,16)	2,04 (± 1,27)
pAnálise Variância		ns	ns	ns	ns	ns	ns

* em nmol por 10⁶ células

n número de indivíduos

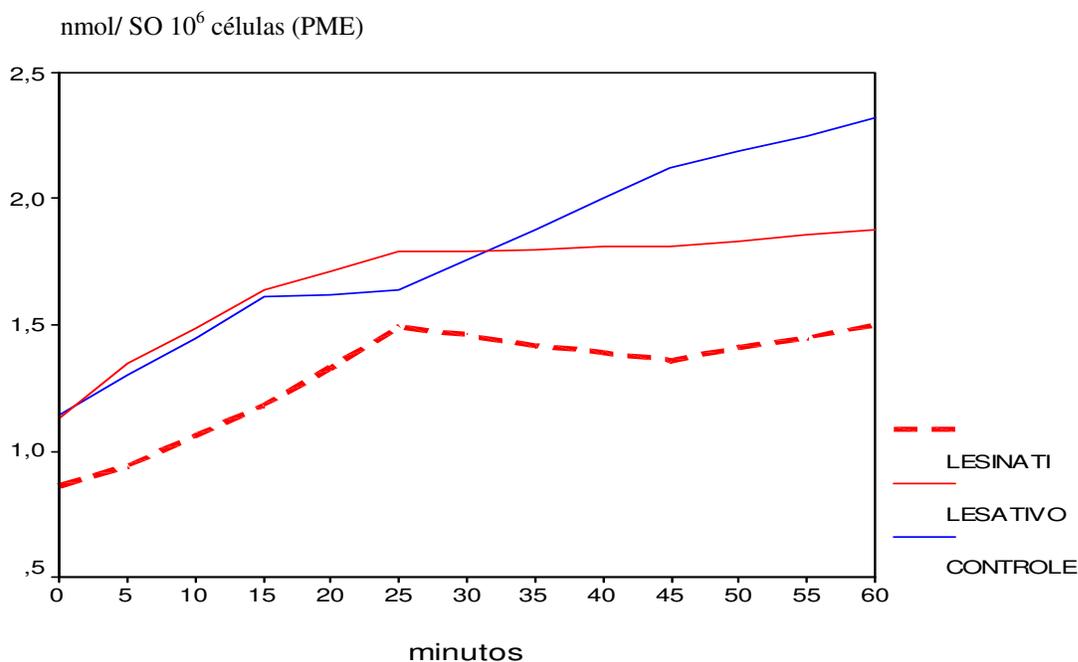


Gráfico 5- LESJ: Liberação de ânion SO pelos PME nos três grupos nos diferentes instantes de tempo de incubação.

Neste ensaio observa-se que os resultados obtidos nos três grupos de indivíduos se comportam de maneira semelhante, com um aumento progressivo da liberação de SO em relação ao tempo zero.

Para detectar se há diferença neste ensaio aplicou-se o teste de Bonferroni para efetuar as comparações múltiplas das médias dos três grupos em cada tempo do ensaio conforme apresentado na Tabela 9.

Tabela 9- LESJ: Teste de Bonferroni para comparações múltiplas das médias nos três grupos nos diferentes instantes de tempo de incubação dos PME.

tempo	PME			
	C X LES (-)	C X LES (+)	LES (-) X LES (+)	
0´	ns	ns	ns	
5´	ns	ns	ns	
15´	ns	ns	ns	
25´	ns	ns	ns	
45´	ns	ns	ns	
60´	ns	ns	ns	

LES (-) LES inativo; LES (+) LES ativo; C controle

5.6.2- Polimorfos nucleares ativados (PMA)

Os valores obtidos dos PMA são apresentados na Tabela 10 e a representação destes resultados está no Gráfico 6.

Tabela 10- LESJ: Média(M) e desvio padrão(DP) da liberação de ânion SO* células pelos PMA nos três grupos nos diferentes instantes de tempo de incubação.

Grupo	tempo	0'	5'	15'	25'	45'	60'
LES inativo	n	11	11	11	11	11	11
	M(DP)	3,90 (\pm 2,77)	7,94 (\pm 3,34)	9,72 (\pm 2,27)	10,37 (\pm 1,85)	10,64 (\pm 1,76)	10,03 (\pm 2,16)
LES ativo	n	7	7	7	7	7	7
	M(DP)	2,60 (\pm 0,97)	7,20 (\pm 2,81)	8,21 (\pm 3,45)	8,34 (\pm 3,48)	9,43 (\pm 2,20)	9,16 (\pm 2,33)
Controle	n	30	29	30	30	30	30
	M(DP)	2,34 (\pm 2,27)	4,54 (\pm 3,93)	7,13 (\pm 4,26)	9,16 (\pm 3,71)	11,30 (\pm 2,53)	11,78 (\pm 2,18)
TOTAL	n	48	47	48	48	48	48
	M(DP)	2,73 (\pm 2,31)	5,73 (\pm 3,90)	7,88 (\pm 3,87)	9,32 (\pm 3,34)	10,88 (\pm 2,38)	11,00 (\pm 2,39)
p Análise Variância		ns	<0,05	ns	ns	ns	<0,05

* em nmol por 10⁶ células

n número de indivíduos

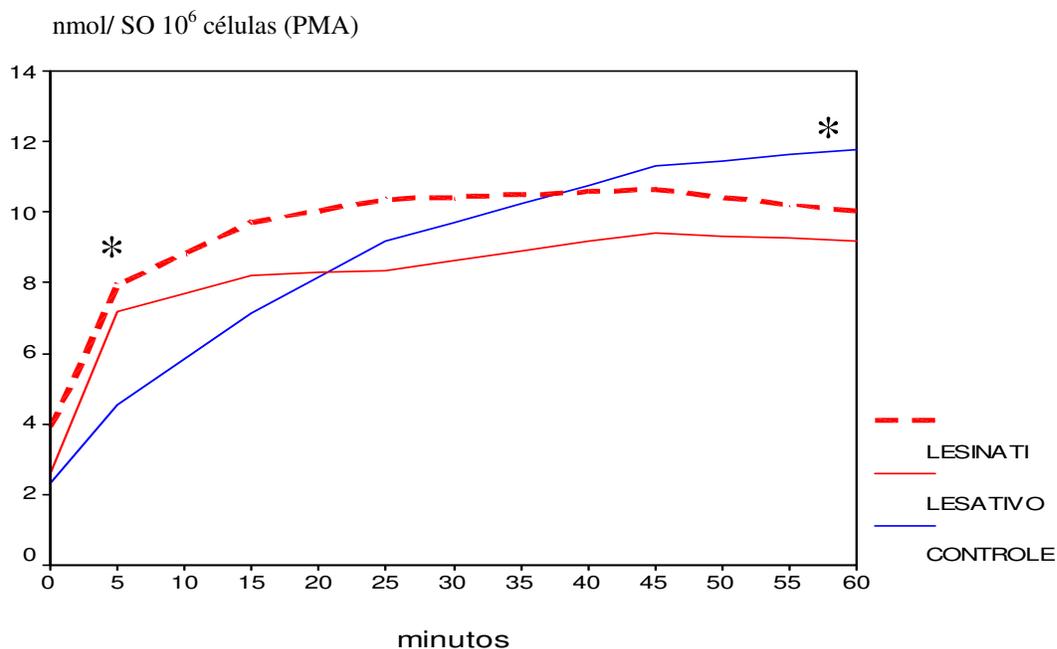


Gráfico 6- LESJ: Liberação de ânion SO pelos PMA nos três grupos nos diferentes instantes de tempo de incubação.

No ensaio dos PMA ao estudar a liberação do ânion SO observou-se que os três grupos apresentaram um aumento da liberação de SO em relação ao tempo zero, sendo que os grupos LES inativo e LES ativo o fizeram de forma mais abrupta que o grupo Controle; a liberação de SO pelos pacientes com LES, ativo ou inativo, se estabiliza ao redor dos 15 minutos e a do grupo controle mantém o aumento da liberação de SO de modo mais harmônico e ultrapassa a dos outros dois grupos ao redor de 45 minutos.

Ao aplicar o teste de Bonferroni e efetuar as comparações múltiplas das médias dos três grupos em cada tempo do ensaio detectou-se que há uma diferença estatística significativa no instante 5 minutos entre os grupos LES inativo e o controle, bem como outra diferença significativa entre os grupo LES ativo e Controle no instante 60 minutos. A liberação de SO foi significativamente maior no instante 5 minutos quando se comparou o grupo LES inativo com o grupo controle. Também no instante 60 minutos observou-se maior liberação do ânion SO no grupo Controle que no grupo LES ativo, conforme apresentado na Tabela 11.

Tabela 11- LESJ: Teste de Bonferroni para comparações múltiplas das médias nos três grupos nos diferentes instantes de tempo de incubação dos PMA.

PMA			
Tempo	C X LES (-)	C X LES (+)	LES (-) X LES (+)
0´	ns	ns	ns
5´	0,036	ns	ns
15´	ns	ns	ns
25´	ns	ns	ns
45´	ns	ns	ns
60´	ns	0,026	ns

LES (-) LES inativo; LES (+) LES ativo; C controle

5.6.3- Monócitos espontâneos (MOE)

Os valores obtidos dos MOE são apresentados na Tabela 12 e a representação destes resultados está no Gráfico 7.

Tabela 12- LESJ : Média(M) e desvio padrão(DP) da liberação de ânion SO* pelos MOE nos três grupos nos diferentes instantes de tempo de incubação.

Grupo	tempo	0'	5'	15'	25'	45'	60'
LES inativo	n	13	13	13	13	15	15
	M(DP)	0,92 (± 0,39)	0,87 (± 0,47)	0,98 (± 0,41)	0,97 (± 0,52)	1,02 (± 0,46)	1,51 (± 1,26)
LES ativo	n	8	8	8	8	8	8
	M(DP)	1,05 (± 0,57)	1,10 (± 0,62)	1,42 (± 0,47)	1,46 (± 0,78)	1,80 (± 1,16)	1,92 (± 1,44)
Controle	n	34	33	34	34	34	34
	M(DP)	1,29 (± 0,68)	1,30 (± 0,58)	1,38 (± 0,56)	1,45 (± 0,60)	1,69 (± 0,62)	1,78 (± 0,63)
TOTAL	n	55	54	55	55	57	57
	M(DP)	1,17 (± 0,62)	1,17 (± 0,58)	1,29 (± 0,54)	1,34 (± 0,63)	1,53 (± 0,74)	1,73 (± 0,95)
p Análise Variância		ns	<0,05	<0,05	ns	<0,05	ns

* em nmol por 10⁶ células

n número de indivíduos

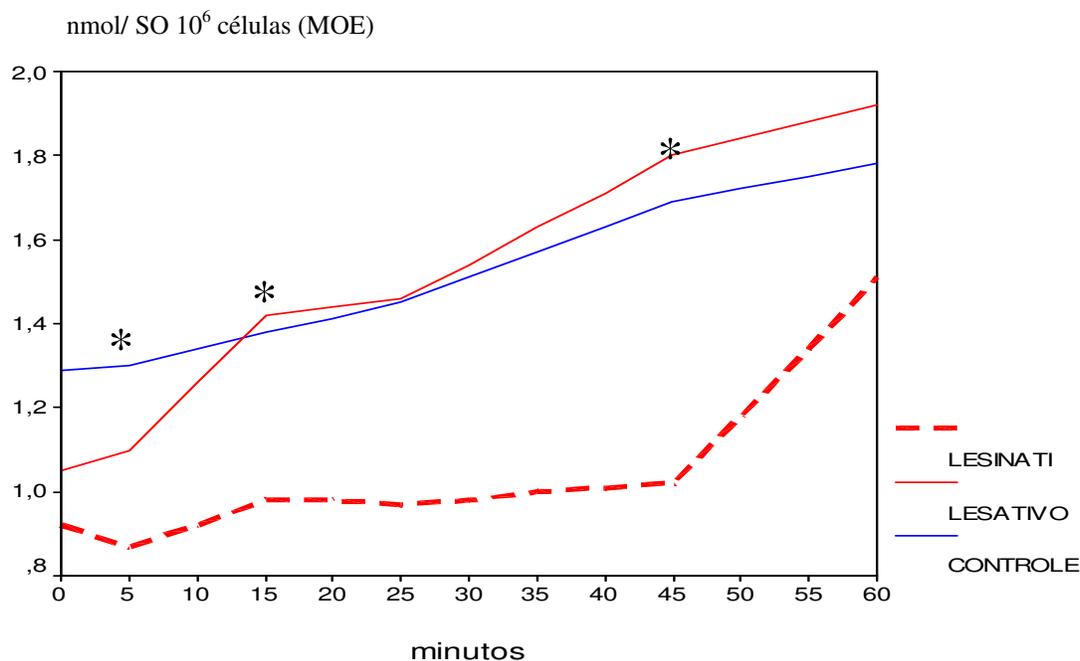


Gráfico 7- LESJ: Liberação de ânion SO pelos MOE nos três grupos nos diferentes instantes de tempo de incubação.

No ensaio que avalia os MOE observou-se que o aumento da liberação de SO pelos grupos LES ativo e controle é semelhante; a do grupo LES inativo se mantém estável e somente no instante 60 minutos há um aumento da liberação de SO. A liberação de SO foi maior nos instantes 5, 15 e 45 minutos no grupo controle que no grupo LES inativo; a análise deste comportamento mostra uma diferença estatística significativa entre estes dois grupos nestes instantes do ensaio conforme apresentado na Tabela 13.

Tabela 13- LESJ: Teste de Bonferroni para comparações múltiplas das médias nos três grupos nos diferentes instantes de tempo de incubação dos MOE.

Tempo	MOE		
	C X LES (-)	C X LES (+)	LES (-) X LES (+)
0´	ns	ns	ns
5´	0,017	ns	ns
15´	0,018	ns	ns
25´	ns	ns	ns
45´	0,047	ns	ns
60´	ns	ns	ns

LES (-) LES inativo; LES (+) LES ativo; C controle

5.6.4- Monócitos ativados (MOA)

Os valores obtidos dos MOA são apresentados na tabela 14 e a representação destes resultados está no Gráfico 8.

Tabela 14- LESJ : Média(M) e desvio padrão(DP) da liberação de ânion SO* pelos MOA nos três grupos nos diferentes instantes de tempo de incubação.

Grupo	tempo	0'	5'	15'	25'	45'	60'
LES inativo	n	14	15	15	15	15	15
	M(DP)	1,64 (± 0,94)	2,83 (± 1,47)	4,57 (± 2,21)	5,64 (± 2,77)	6,44 (± 2,77)	6,93 (± 3,20)
LES ativo	n	6	6	6	6	6	6
	M(DP)	1,90 (± 1,42)	4,05 (± 2,61)	5,75 (± 2,94)	6,55 (± 3,08)	7,50 (± 2,92)	8,66 (± 3,46)
Controles	n	34	33	34	34	34	34
	M(DP)	1,57 (± 1,20)	2,68 (± 2,20)	4,33 (± 3,38)	5,79 (± 3,78)	7,56 (± 3,69)	8,64 (± 3,68)
TOTAL	n	54	54	55	55	55	55
	M(DP)	1,63 (± 1,15)	2,87 (± 2,08)	4,55 (± 3,04)	5,83 (± 3,42)	7,25 (± 3,37)	8,18 (± 3,56)
p Análise Variância		ns	ns	ns	ns	ns	ns

* em nmol por 10⁶ células

n número de indivíduos

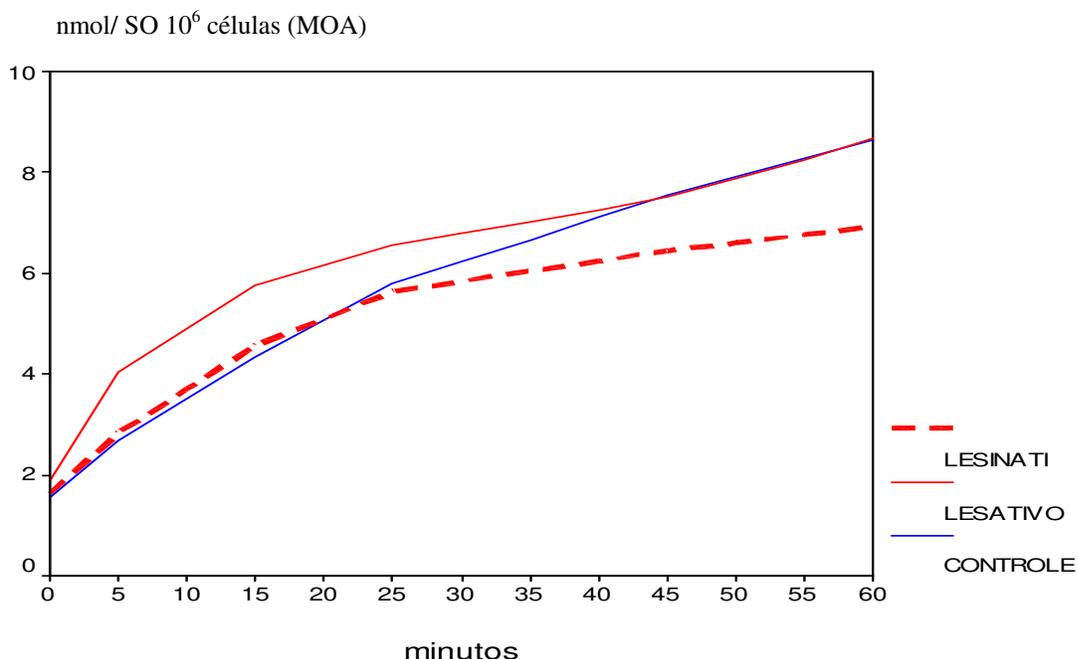


Gráfico 8- LESJ: Liberação de ânion SO pelos MOA nos três grupos nos diferentes instantes de tempo de incubação.

Neste ensaio observa-se que os resultados obtidos nos três grupos de indivíduos se comportam de maneira semelhante, com um aumento progressivo da liberação de SO em relação ao tempo zero.

Ao se aplicar o teste de Bonferroni para efetuar as comparações múltiplas a fim de detectar se há diferença neste ensaio observou-se que não há nenhuma diferença significativa conforme apresentado na Tabela 15.

Tabela 15- LESJ: Teste de Bonferroni para comparações múltiplas das médias nos três grupos nos diferentes instantes de tempo de incubação dos MOA.

Tempo	MOA		
	C X LES -	C X LES +	LES - X LES +
0´	ns	ns	ns
5´	ns	ns	ns
15´	ns	ns	ns
25´	ns	ns	ns
45´	ns	ns	ns
60´	ns	ns	ns

LES (-) LES inativo; LES (+) LES ativo; C controle

6- DISCUSSÃO

O LES é uma doença autoimune, caracterizada pela formação e deposição de imunocomplexos que desencadeiam a liberação de mediadores inflamatórios, estimulando um afluxo de células como neutrófilos e macrófagos, os quais liberam enzimas proteolíticas e induzem a produção dos radicais do oxigênio.

A produção de SO pelos polimorfonucleares e monócitos é uma resposta inata do corpo humano, que não depende de um receptor celular específico; diversos fatores podem desencadeá-la, como um aporte de glicose, as citocinas, os compostos contendo ferro, as imunoglobulinas, os complexos antígeno-anticorpo, as frações do complemento e os leucotrienos (Jones, 1993; Babior, 2000; Dandona et al., 2001; Gougerot-Pocidallo et al., 2002; Graça-Souza et al., 2002).

Os radicais do O₂ são liberados com a finalidade de combater e eliminar microorganismos invasores. A princípio é uma ação benéfica para o organismo, porém quando produzidos em excesso, ou de forma prolongada, atingem os tecidos circunvizinhos, lesando-os, atuando como componentes nocivos e importantes em muitas patologias tais como o enfisema, a aterosclerose, neoplasias e doenças do colágeno (Babior, 2000).

Quando há uma resposta inflamatória o TNF- α , uma das citocinas liberadas é, segundo Laudanna et al. (1990), auto-suficiente para estimular a produção de SO pelos PMN, independentemente da ação das fosfolipases e da liberação do ácido aracdônico. Miesel et al. (1996) detectaram que os neutrófilos e monócitos de pacientes com doença auto-imune têm uma produção de SO de duas a oito vezes maior que a de indivíduos controle, e que esta produção é diretamente correlacionada com os níveis plasmáticos do TNF- α .

Estudos realizados com polimorfoneutrófilos de pacientes com doenças auto-ímmunes, como a Artrite Reumatóide e a doença de Behçet observaram uma maior produção de SO que a dos grupos controle, e que se os neutrófilos de indivíduos normais fossem incubados no soro dos pacientes a produção de SO era incrementada, sugerindo a existência de algum fator estimulador no soro de indivíduos doentes (Cencetti et al., 1990; Yoshida et al., 1998).

Há estudos sobre a liberação do ânion SO em pacientes com LES comparada à liberação de indivíduos normais, bem como a comparação da liberação entre os pacientes com e sem atividade da doença LES. Diferente deste nosso trabalho todos analisam a liberação do SO em apenas um momento do ensaio. Os resultados obtidos não são todos concordes (Bruce et al., 1997; Hashimoto et al., 1982; Niwa et al., 1984; Jiang e Chen, 1992; Marzocchi-Machado et al., 2002).

Em nosso estudo, a primeira análise avaliou se houve diferença na liberação do ânion SO entre o grupo de pacientes com LESJ e o grupo controle, para cada um dos quatro tipos de células.

Ao analisarmos os PME observou-se que a liberação do ânion SO pelo grupo dos pacientes foi sempre menor que a do grupo controle, apresentando diferença significativa apenas nos instantes 45' e 60' do ensaio (Gráfico 1).

Porém ao analisarmos a liberação pelos PMA observou-se que a liberação do ânion SO pelo grupo dos pacientes foi maior que a do grupo controle do instante 0' até o instante 25', tornando-se, a seguir, menor nos outros dois instantes; detectou-se diferença significativa nos instantes 0', 5' e 60' do ensaio.

No ensaio dos monócitos espontâneos o comportamento foi semelhante ao dos polimorfos espontâneos, sendo a liberação do ânion SO sempre menor no grupo dos pacientes com LESJ do que no grupo controle, tendo havido diferença significativa nos instantes 5', 25', 45' e 60' do ensaio (Gráfico 3).

Ao analisar a liberação pelos monócitos ativados observou-se que neste ensaio a liberação de ânion SO pelo grupo de pacientes com LESJ tendeu a ser maior desde o instante zero até o instante 25', passando à tendência de ser menor nas duas últimas mensurações do ensaio. Neste ensaio, porém, não foi detectada nenhuma diferença significativa.

Na análise global dos resultados observou-se que nos ensaios com células espontâneas a liberação do ânion SO pelos pacientes com LESJ sempre tendeu a ser menor que a do grupo controle. Uma possível explicação é a de que neste estudo o número de

pacientes ativos, oito, é praticamente a metade do dos inativos, quinze, e que destes nove utilizavam medicamentos a fim de controlar a atividade inflamatória, fato que, concorde a Miesel et al. (1996), pode ter influenciado os resultados desta maneira.

A mesma análise global quando aplicada aos ensaios com as células ativadas revela que a liberação de ânion SO pelo grupo de pacientes com LESJ tende a ser maior que a do grupo controle, independente do tipo de célula do ensaio, desde o instante 0' até o instante 25', e que nos últimos dois instantes a liberação é menor. Este comportamento é melhor visualizado no gráfico dos polimorfoneutrófilos (Gráfico 2) do que no dos monócitos (Gráfico 4).

A maior liberação nos instantes iniciais do ensaio, com posterior diminuição poderia ser o resultado de uma maior reserva de NADPH pelos polimorfoneutrófilos e monócitos dos pacientes com LESJ que, talvez devido ao estado inflamatório quando estimulados com o forbol miristato acetato responderam de maneira súbita, mimetizando a denominada “explosão respiratória”; e que, com o decorrer do ensaio, consumiram as reservas de modo mais rápido, acarretando uma menor liberação nos instantes finais do mesmo.

A produção de SO também foi estudada por Sambo et al. (1999) na Esclerose sistêmica onde o comprometimento vascular tem papel fundamental no desenvolvimento da doença; os autores observaram que há uma maior produção de SO pelos pacientes com esta doença que em indivíduos controle e indivíduos com apenas o fenômeno de Raynaud primário. Interessante ressaltar que quando os monócitos eram estimulados pelo forbol miristato acetato (FMA) a produção de SO dos pacientes tornava-se menor que a dos controles, talvez indicando que nos pacientes com atividade inflamatória os monócitos estejam em um estado de estimulação persistente, sem capacidade de reserva, e incapazes de responder, com aumento da produção de SO, a um outro estímulo excitatório (Sambo et al., 1999).

No presente trabalho este comportamento também foi encontrado, pois quando se estudou a liberação do ânion SO utilizando-se os PMA, observou-se que houve uma rápida subida da média da liberação de SO no grupo dos pacientes aos 5 minutos,

expressando a explosão respiratória, seguida de um discreto aumento nos tempos subseqüentes, ao passo que a média da liberação de SO dos indivíduos controle apresentou uma subida lenta e gradual, ultrapassando a dos pacientes no instante 45 minutos de incubação (Gráfico 2).

A seguir nosso estudo avaliou a liberação do ânion SO classificando o grupo de pacientes em dois subgrupos, conforme a pontuação do SLEDAI, em um grupo sem atividade se a pontuação era menor ou igual a cinco e outro com pontuação maior que cinco. Semelhante ao procedimento anterior analisamos os quatro tipos de ensaio.

Nenhuma diferença significativa foi detectada na liberação de SO nos ensaios dos PME, sendo que a mesma foi menor no grupo sem atividade que no grupo com atividade, tendo esta última apresentado um comportamento muito semelhante ao grupo controle como pode ser observado no Gráfico 5.

No ensaio com os PMA, observou-se que a liberação do ânion SO dos pacientes do grupo sem atividade foi significativamente maior que a do grupo controle apenas no momento 5 minutos do ensaio, não ocorrendo diferença no momento zero como a detectada quando o grupo de pacientes foi analisado na totalidade. Esta discordância provavelmente é devida ao número pequeno de pacientes do subgrupo que influenciam aumentando o desvio padrão. A outra diferença detectada, semelhante ao ensaio com apenas dois grupos, ocorre no momento 60 minutos sendo que houve maior liberação pelo grupo em atividade que o grupo controle (Gráfico 6).

Quando se estudou a liberação do ânion SO utilizando-se os MOE, observou-se que houve um aumento lento e progressivo da mesma, e que foi semelhante nos grupos LES ativo e grupo controle, sendo que a do grupo com LES inativo se manteve praticamente estável e, somente no instante 60 minutos ocorreu um aumento significativo da liberação de SO. A análise estatística destes dados demonstrou que a liberação de SO pelo grupo controle é significativamente maior que a do grupo LES inativo nos instantes 5, 15 e 45 minutos (Gráfico 7). Este dado poderia refletir que no paciente inativo os monócitos têm uma menor resposta inflamatória, seja espontaneamente, seja pelo efeito do tratamento, acarretando uma menor liberação de radicais SO.

A liberação SO pelos MOA não apresentou nenhuma diferença significativa neste ensaio (Gráfico 8). Observou-se que no ensaio dos monócitos espontâneos a liberação de SO tendeu a ser maior no grupo controle, este fato poderia sugerir que o estímulo com forbol miristato acetato (FMA) tem menor efeito sobre os monócitos dos indivíduos controle que nos dos pacientes com LES; ou que os monócitos dos pacientes com LES são mais susceptíveis ou influenciáveis que os dos indivíduos controle ao FMA, e que este estímulo é importante a ponto de igualar a liberação de SO pelos monócitos dos pacientes à dos indivíduos controle.

A produção de SO também é influenciada pelas plaquetas, pelo Fator Ativador das Plaquetas (PAF) e pela trombina (Stewart et al., 1990). Moon et al. (1990) estudaram a ação destes fatores na geração de SO por neutrófilos humanos e de ovelhas, e avaliaram que esta produção necessita do contato das plaquetas com os PMN e que é dependente não só da presença de trombina e de plaquetas, mas também da relação plaquetas/PMN.

Segundo Quismorio Jr (1997) nos indivíduos com LES, as plaquetopenias ocorrem entre 7 e 52% e as leucopenias ao redor de 50% e nem sempre são concomitantes. No presente estudo, no instante do ensaio, nenhum paciente apresentava plaquetopenia. Dentre os oito pacientes em atividade um apresentava leucopenia, dois leucopenia e linfopenia e, um quarto, apresentava apenas linfopenia. Estas alterações quantitativas celulares, ou relação numérica intercelular talvez possam ter influenciado a liberação de SO nestes ensaios.

Nielsen et al. (1998) analisando o comportamento das hemácias de pacientes com LES detectaram que elas têm uma menor capacidade de proteger os leucócitos da opsonização pelos imunocomplexos do que as hemácias de indivíduos normais, fato que favoreceria a geração de SO.

Outra possível interferência na produção de SO é a proteína C reativa (PCR), que pode estar aumentada no soro de pacientes com doença ativa. Este componente sérico ao se ligar aos neutrófilos, exerce nestes uma ação inibitória na produção de SO (Dobrinich e Spagnuolo, 1991). Nesta casuística dois pacientes com LES inativo e metade dos com LES ativo apresentavam a PCR em níveis superiores ao da normalidade, podendo ser este

um dos fatores que explique o fato de não se ter encontrado aumento significativo da liberação de SO nos pacientes em atividade. Este dados poderiam ser discordantes dos apresentados em um estudo de Miesel et al. (1996) no qual não foi detectada nenhuma interferência dos níveis séricos da PCR com a liberação de SO. Cabe ressaltar que nenhum dos pacientes, dos dois grupos, no instante da coleta apresentava quadro infeccioso associado, pois foi critério de exclusão, o que poderia, também, alterar a PCR.

A deposição dos complexos imunes nos tecidos promove a liberação de enzimas proteolíticas, que induzem a explosão respiratória ocasionando um incremento na liberação de radicais do oxigênio como o SO.

Esta resposta inflamatória normal, como já foi dito, é perpetuada no LES, pois a fonte de antígenos, o próprio indivíduo, é perene, formando um ciclo vicioso que na imensa maioria das vezes tende a se retro alimentar. É de se esperar que quanto maior atividade inflamatória, maior seja a produção e liberação dos radicais do O₂.

Hashimoto et al. (1982) em um trabalho pioneiro estudaram o aumento da capacidade de produção de SO pelos neutrófilos de indivíduos normais quando incubados em soro de pacientes lúpicos. Neste amplo estudo os autores analisaram a liberação de SO destes neutrófilos comparando esta liberação não apenas quando incubados em soro de 31 pacientes lúpicos, mas também no de 20 pacientes com síndrome de Felty, no de 24 com artrite reumatóide e no de 34 indivíduos sadios utilizados como controle. Por sua vez, os pacientes lúpicos foram divididos em dois grupos, um de 19 pacientes classificados como em atividade e o outro de 12 inativos; foi considerado como ativo o paciente que apresentasse pelo menos um sistema orgânico acometido.

Os autores observaram que apenas no grupo com atividade houve uma maior liberação estatisticamente significativa ($p < 0,001$) de SO quando comparada à do grupo controle. No entanto, diferente deste presente trabalho, Hashimoto et al. (1982) utilizaram apenas parâmetros clínicos para classificar os pacientes quanto à atividade do LES, visto que à época da realização daquele trabalho não se dispunha de critérios padronizados de atividade da doença. A metodologia empregada pode ser o motivo da diferença dos resultados obtidos, pois se seleccionássemos os pacientes de Hashimoto et al. (1982),

utilizando os critérios de atividade do SLEDAI, selecionar-se-iam aqueles com franca atividade da doença. Outro dado relevante que deve ter influenciado nos resultados é o fato de que o número de pacientes em atividade, 19, era maior que o dos sem atividade, 12.

Outro estudo, realizado por Niwa et al. (1984), mostrou um aumento da liberação de radicais do O₂ em seis pacientes com LES ativo e não medicado, quando comparados a 14 pacientes com vários processos infecciosos, suficientemente graves para promover uma resposta imune, observada no hemograma como leucocitose maior que 15.000/mm³ e de neutrofilia maior que 70%; a liberação de SO deste grupo de pacientes infectados era, por sua vez, maior que a de 10 indivíduos sadios estudados como controles.

Jiang e Chen (1992) analisaram a atividade da enzima SOD em hemácias de pacientes com LES, divididos em três grupos de atividade da doença, e a compararam com a de 29 indivíduos controle; detectaram que nos pacientes com LES a atividade da SOD estava diminuída e concluíram que há uma correlação direta da atividade da doença com a produção de SO.

Waszczykowska et al. (1999) realizaram uma pesquisa em 63 pacientes com LES nos quais estudaram os níveis séricos de IL-6, IL-10, TNF- alfa e a produção de SO. Observaram que havia uma correlação diretamente proporcional de todos estes parâmetros com a atividade da doença.

Os pacientes lúpicos apresentam uma maior morbidade e mortalidade em relação aos processos infecciosos, independente do estado de atividade da doença e da utilização de corticosteróides; porém esta susceptibilidade sofre influência e tem correlação direta com o grau de imunossupressão provocada pelos medicamentos utilizados (Ginzler, 1997).

Dentre os mecanismos de defesa, são citados como possíveis causas de maior susceptibilidade a infecções dos pacientes lúpicos as deficiências do sistema complemento, da quimiotaxia e da atividade fagocitária dos PMN.

Yu et al. (1989) estudaram a atividade fagocitária de 23 pacientes com LES e avaliaram, além da produção do TNF - α , a produção de SO. Detectaram que a fagocitose dos PMN de pacientes lúpicos, é menor que a do grupo controle, e que a produção de ânion

SO é igual. O estudo avaliou 23 pacientes (1Ma:22Fe) com LES, com idade variando de 15 a 47 anos; nove deles em uso de prednisona, oito estavam sendo medicados com associação de prednisona e azatioprina e os seis restantes estavam sem medicação.

Os autores encontraram uma significativa diminuição da fagocitose dos PMN dos indivíduos lúpicos, independentemente do esquema terapêutico, bem como nos não medicados, quando comparada à fagocitose do grupo controle. Este achado poderia ser uma explicação do fato de haver maior susceptibilidade a infecções pelos pacientes lúpicos. Detectaram entretanto que a capacidade de liberação de SO não apresentou diferença estatística entre o grupo de pacientes com LES, ativo ou inativo, independentemente também se tratados ou não e a do grupo dos indivíduos controle.

Ao estudar os MO Yu et al. (1989) demonstraram que apesar de haver um nível sérico aumentado de TNF- α nos pacientes lúpicos estas células, *in vitro*, produziam uma menor quantidade desta citocina que o grupo controle.

Frente a estes dados os autores sugeriram que *in vivo* poderia haver um fator de estímulo constante para a produção de TNF- α , e que, quando *in vitro*, o estímulo cessaria, ou que no ensaio a adição de PMA poderia ocasionar uma inibição desta produção.

Interessante experimento foi feito pelos autores quando acrescentaram o TNF- α , um potente indutor da resposta inflamatória e da fagocitose, no ensaio dos PMN e observaram que a atividade fagocitária, mensurada pela produção de SO, não significativamente diferente entre os grupos controle e lúpicos, bem como nos lúpicos estimulados não atingiu os valores normais do grupo controle. Yu et al. interpretaram que esta resposta poderia ocorrer devido a um estado de menor sensibilização dos PMN no experimento após a hipersensibilização *in vivo* ou, semelhante aos MO, haveria algum fator inibidor no ensaio.

Os achados acima referidos quanto à produção de SO pelos PMN de pacientes lúpicos são semelhantes aos observados neste atual trabalho, e as possibilidades anteriormente cogitadas podem também aqui ser aventadas.

Segundo Ginzler (1997) há uma maior morbidade e mortalidade, em relação aos processos infecciosos, dentre os pacientes lúpicos, levando esta intercorrência a um estado de maior atividade inflamatória e possível interferência na produção do ânion SO.

No instante deste estudo não houve nenhum paciente com quadro infeccioso, porém posteriormente uma paciente faleceu devido a uma pneumonia que evoluiu em menos de 24 horas para choque séptico; a análise da liberação de SO desta paciente, em todos os ensaios, não detectou nenhuma tendência a níveis mais baixos de SO.

Outros autores, partindo do fato de que pacientes com síndrome de Down apresentam maior susceptibilidade a infecções, estudaram em 12 indivíduos (7Ma:5Fe) com a trissomia do cromossomo 21, com idade variando de 9 meses a 12 anos, a capacidade de produção de SO. Os autores observaram que nestes a liberação foi menor que nos 20 indivíduos do grupo controle; este achado poderia ser uma das explicações do maior número de infecções em pacientes acometidos com a síndrome que na população normal; no grupo de pacientes com a síndrome também foi detectada uma menor atividade da enzima SOD (Gabbianelli et al., 1993).

De La Fuente et al. (2001) avaliaram em 60 pacientes (3Ma:57Fe) com LES vários aspectos do mecanismo da imunidade não específica, dentre os quais a capacidade de resposta dos leucócitos na explosão respiratória. Dos 60 pacientes, 18 estavam em atividade e 42 inativos da doença. Os autores observaram que, embora não significativa, havia uma tendência à diminuição da produção dos radicais do oxigênio nos leucócitos dos pacientes com LES quando comparados ao grupo controle de 35 indivíduos, e que esta tendência era independente do estado de atividade da doença ou do tratamento prescrito. Dos 18 pacientes em atividade, 17 estavam em uso de prednisona associada ou não a drogas imunossupressoras; dentre os 42 pacientes inativos, 22 estavam sendo medicados com prednisona.

Marzocchi-Machado et al. (2002) estudando os mecanismos de clareamento dos complexos imunes formados durante a resposta imunológica analisaram dentre outros a importância de dois receptores, o da fração Fc da IgG (RFc γ) e o do complemento (RC), na função fagocitária de neutrófilos de pacientes com LES, particularmente no da explosão respiratória.

Deste interessante estudo participaram no total 95 pacientes, todos utilizando apenas baixas doses de corticosteróides. Foram classificados em um subgrupo de ativos e outro de inativos pelo sistema do SLEDAI utilizando valores menores que três com ponto de corte; 54 foram classificados como ativos, 41 como inativos e 42 voluntários sadios constituíram o grupo controle. No estudo particular dos RFcy e RC o experimento foi realizado com 26 pacientes em cada grupo de LES e 33 no controle. Foi observada uma significativa diminuição na explosão respiratória pelos neutrófilos dos pacientes com LES ativo, comparada à do grupo controle, quando esta resposta era mediada por estes dois receptores, não havendo nenhuma diferença entre o grupo inativo com os outros dois grupos. Os autores formularam as hipóteses de que talvez haja uma menor expressão ou uma disfunção destes receptores na membrana dos neutrófilos de pacientes com LES em atividade, ou ainda um deficiente acoplamento do complexo imune com o complemento de pacientes com LES em atividade.

Marzocchi-Machado et al. (2002) finalizam o trabalho sugerindo que as alterações nestes receptores são mais responsáveis pela diminuição da explosão respiratória de neutrófilos de pacientes com LES em atividade que os baixos níveis de complemento.

Diferente ao relatado neste último trabalho os dados obtidos no ensaio dos PMN espontâneos não demonstraram em nenhum momento uma diferença significativa entre os três grupos, e que a liberação do ânion SO foi muito semelhante entre os grupos controle e ativo nos momentos iniciais do ensaio conforme pode ser observado na Tabela 5.

Kurien e Scofield (2003) estudando o soro de 57 pacientes com LES detectaram uma significativa menor atividade da superóxido dismutase (SOD) nestes pacientes quando comparada à atividade do grupo controle; a SOD converte o O_2^- em oxigênio (O_2), e uma menor atividade desta enzima poderia levar a um deficiente neutralização do radical com conseqüente incremento na leitura no espectrofotômetro.

Interessante também a investigação que fizeram os autores, partindo do fato de ser o LES uma doença em que há produção exacerbada de auto-anticorpos, pesquisando a existência de anticorpo anti-SOD no soro destes pacientes; detectaram-no em 50 % dos pacientes e que esta diferença em relação ao grupo controle era de um aumento significativo ($p < 0,0055$).

Ao analisar os dados obtidos neste trabalho, quando avaliamos os grupos LESJ e controle, vemos que os dados são semelhantes ao relatados por De La Fuente et al. (2001), quanto à menor produção de SO pelos leucócitos de pacientes com LES, bem como a não diferenciação da produção entre os com e sem atividade.

Na presente casuística, no instante da coleta das amostras havia, entre os oito pacientes com atividade da doença, cinco que não utilizavam nenhuma droga, um utilizava apenas prednisona, outro a utilizava associada à cloroquina e outro paciente utilizava somente AINH. Dentre os 15 inativos, seis pacientes não faziam uso de nenhum medicamento; sete pacientes faziam uso de prednisona e cloroquina, dois as tomavam em associação (um com azatioprina e o outro com metotrexato); um paciente fazia uso de prednisona e azatioprina, e apenas um tomava somente prednisona.

A hipótese de que a liberação do SO nos indivíduos com LES é diretamente correlacionada com a atividade da doença não foi confirmada neste estudo. Nos estudos comparativos, em cada uma das quatro séries de células, e em cada diferente tempo de ensaio não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos de pacientes ativos e inativos.

No entanto, ao analisar o gráfico da liberação de SO pelos monócitos espontâneos observamos que todas as médias da liberação dos pacientes em atividade são maiores que a médias dos pacientes inativos. A análise estatística não define esta diferença visual como significativa.

Neste ensaio ao analisar os dados obtidos (Apêndice 6) observa-se que a variação da leitura do experimento dentro do grupo de pacientes em atividade é ampla, variando de 0,22 a 2,11 no instante 5 minutos, de 0,81 a 3,00 no instante 25 minutos e de 0,86 a 4,50 no instante 45 minutos; o mesmo ocorre no grupo dos pacientes inativos, variando de 0,06 a 2,05, de 0,26 a 2,15 e de 0,30 a 2,31 respectivamente nos instantes 5, 25 e 45 minutos. Estes dados, associados ao fato de que a amostra de pacientes em atividade é pequena, ou seja, de 8 indivíduos, nos remetem à interpretação de que provavelmente devido ao erro padrão também ser amplo, o teste estatístico não consegue detectar a diferença observada graficamente.

Uma diferença importante dos demais trabalhos apresentados é que a presente casuística é toda de pacientes com LES juvenil. A média da idade dos pacientes ao realizar o ensaio é de 146 meses (12,12 anos), sendo que a de menor idade tinha 6,7 anos e a de maior idade 26 anos.

Porém, esta particularidade da faixa etária não parece ter interferido no resultado. Komatsu et al. (2001), estudando a produção de SO no período neonatal observaram uma diminuição da produção de SO pelos neutrófilos não estimulados dos recém-nascidos pré termo quando comparada à produção dos a termo e a dos adultos; os recém-nascidos a termo já conseguem produzi-lo nos mesmos níveis ao dos adultos; ao estimular a produção do SO com o FMA o comportamento foi diferente pois os neutrófilos dos recém nascidos, independente do tempo de gestação, produziram menor quantidade de SO que os dos adultos controle.

Outros trabalhos como os de Perskin e Cronstein (1992) e Biasi et al. (1996) referem que há alteração na produção do SO pelos polimorfos e monócitos apenas em pessoas de idade mais avançada, e, segundo Scott et al. (1990), há diminuição aos 73 anos, sendo que, segundo Polignano et al. (1994), ela ocorre entre os 86 e 104 anos de idade.

Em um estudo com 34 gestantes e 34 controles Crouch et al. (1995) pesquisaram a influência da gravidez na produção de SO, e detectaram uma menor produção do ânion durante a gravidez, sugerindo que este dado poderia explicar em parte o fato de haver uma remissão das manifestações clínicas nos pacientes com AR durante a gravidez. O mesmo não acontece nas pacientes com LES, nas quais há um risco, que varia entre 20 e 60%, de haver uma exacerbação da doença durante a gravidez (Kitidrou, 1997).

Crocker et al. (2000) estudando três grupos de pacientes, um de pacientes saudáveis grávidas, outro de pacientes grávidas portadoras de AR e um de pacientes com AR, mas não grávidas, observaram que nos dois grupos de grávidas houve uma diminuição da produção de SO, sendo que esta atividade voltou ao normal oito semanas após o parto. Em outro trabalho realizado com pacientes grávidas foi observado que, em estado de pré-eclampsia, há uma diminuição da produção de SO (Crocker et al., 1999).

Em uma única paciente desta casuística poderia ter havido influência da gravidez na produção de SO, pois a mesma realizou os ensaios laboratoriais seis meses após uma gestação normal. Se considerarmos o tempo decorrido do fim da gravidez à data da coleta dos exames veremos que o tempo é muito maior que o definido pelo trabalho de Crocker et al. (2000). A paciente não estava em uso de nenhuma medicação, estava clínica e laboratorialmente compensada, foi classificada como inativa; oito meses mais tarde retornou com franca atividade da doença.

As manifestações neurológicas e ou psiquiátricas tem muita importância na metodologia de avaliação da atividade do LES pelo SLEDAI (Bombardier et al., 1992). Nesta casuística em apenas um paciente foi diagnosticado, pela ressonância nuclear magnética, o envolvimento do SNC, que se manifestou clinicamente como quadro convulsivo. Quanto aos quadros psiquiátricos do LES, cuja incidência gira ao redor de 17 %, são de diagnóstico mais difícil (Shapiro, 1997; Marini e Costallat, 1999). Durante o transcorrer deste estudo não se detectou nenhuma alteração psiquiátrica, especialmente a psicose, que pudesse influir nos resultados obtidos, pois segundo Melamed et al. (1998), que analisaram a produção de SO pelos neutrófilos de 29 pacientes com esquizofrenia observaram que, quando comparada à de 17 indivíduos controle, a mesma era aumentada.

Outro fator que pode alterar a produção de SO é o estado nutricional do indivíduo. Cederholm e Gyllenhammar (1999), na Suécia, estudaram a produção de SO em 19 pacientes desnutridos com patologia crônica e com idade média de 75 anos que tinham o índice de massa corporal (IMC) menor que 17,1; encontraram produção 55% menor que a de indivíduos eutróficos da mesma faixa etária e, ao instituir uma suplementação à dieta dos desnutridos estes, após três meses, incrementaram a capacidade de gerar SO a níveis próximos aos dos controles.

Uma das manifestações clínicas do LES é o emagrecimento dos pacientes, detectado por Marini e Costallat (1999) em 30% dos casos; é uma doença consumptiva na qual colaboram o processo inflamatório, liberando citocinas como o TNF α , associadas a certa anorexia geralmente presente nestes indivíduos. Apesar de haver pacientes em franca atividade da doença nesta casuística não se observou nenhum paciente desnutrido.

Não se pode deixar de comentar os efeitos dos medicamentos utilizados no tratamento do LES sobre a geração de SO.

Mur et al. (1997) estudaram 21 pacientes com AR analisando a influência de várias citocinas e as alterações da medicação na geração de SO comparados a 9 indivíduos controle. Observaram que todas as citocinas incrementavam a sua produção, sendo o TNF-alfa o mais potente estimulador, e que os medicamentos a diminuía. Outro dado interessante neste trabalho é o de que os autores não puderam estabelecer nenhuma correlação entre a liberação de SO e os dados clínicos ou o tratamento instituído; embora o trabalho tenha sido efetuado em outra doença reumática, os achados são semelhante ao ocorrido com o presente estudo.

Dentre o grupo de medicamentos utilizados no LES, os corticosteróides, atuam nos tecidos em diferentes níveis, exercendo uma ação antiinflamatória interferindo nos neutrófilos, monócitos, linfócitos e citocinas (Quismorio, 1977).

Segundo Lomas et al. (1991), que estudaram o efeito da dexametasona na função de neutrófilos humanos, detectaram que este se inicia duas horas após a tomada do fármaco, se mantém durante os três primeiros dias e retorna ao normal sete dias após a última tomada. Uma de suas maneiras de ação ocorre quando o fármaco entra na célula, migra para o núcleo e induz a transcrição de mRNA para genes que codificam a proteína inibidora da fosfolipase A₂ necessária para o metabolismo dos fosfolípides liberados pela agressão à membrana celular, com conseqüente diminuição do ácido aracdônico, que é o substrato para, através da ação das ciclo e lipooxigenases, a formação das prostaglandinas e dos leucotrienos que são importantes agentes pró-inflamatórios.

Segundo Davenpeck et al. (1998), altas doses de corticosteróides influenciam as funções dos neutrófilos diminuindo a expressão das moléculas de adesão, a liberação de lisozimas e a geração de ânion SO. Outros trabalhos como o Uemeki e Soejima (1990), que avaliaram a interferência da hidrocortisona na produção de SO pelos neutrófilos, e o de Macconi et al. (1993) que estudaram a ação da metilprednisolona na produção de SO em pacientes com vasculite, ambos detectaram uma diminuição da produção de SO.

Miesel et al. (1996) relatam que a produção de SO por pacientes com doença autoimune é significativamente maior que a de indivíduos normais e que os corticosteróides utilizados no tratamento, inibindo a NADPH oxidase, promovem uma diminuição desta produção.

Neste trabalho havia 11 pacientes, 2 com atividade e 9 inativos, que utilizavam prednisona em dose única matinal, inferior a 1 mg/kg/dia no instante do ensaio do SO; nenhum havia sido submetido a pulso de metilprednisolona nos últimos 6 meses. Ao analisar os valores absolutos obtidos nos ensaios não se verificou nenhuma tendência destes pacientes a apresentar valores de SO em níveis inferiores aos que não utilizavam corticosteróides.

Outra influência nos resultados pode ser atribuída aos antimaláricos; oito pacientes os utilizavam, seis inativos e dois em atividade, sendo que os mesmos podem afetar a resposta imunológica, alterando o pH e inibindo os receptores e efetores celulares, inibindo a liberação do ânion SO (Hurst et al., 1986; Miyachi et al., 1986; Hurst et al., 1987; Hurst et al., 1988; Salmon et al., 1990).

Cabe lembrar que também a Azatioprina pode ter influenciado os resultados obtidos, diminuindo a liberação do SO, ainda que apenas dois pacientes a utilizassem no momento do experimento.

Outros fatores descritos que eventualmente poderiam ter interferido na produção de SO como a hipoglicemia diminuindo ou a súbita hiperglicemia aumentando sua produção (Dandona et al., 2001), a ausência de repouso aumentando-a (Pyne et al. 2000), ou um quadro infeccioso aumentando-a também (Shih, 1999), foram devidamente controlados pela metodologia empregada.

Neste trabalho não se detectou nenhuma diferença significativa na liberação de SO

dos 23 pacientes com LESJ classificados em 2 subgrupos, com e sem atividade. Embora o número de pacientes fosse pequeno, outros trabalhos desenvolveram suas pesquisas em amostras em que participaram apenas seis (Niwa et al., 1984) ou sete

pacientes (Yoshida et al., 1998) e outros com 31 (Hashimoto et al., 1982) ou 33 pacientes (Yu et al., 1989) além de maiores amostragens com 60 pacientes (De La Fuente et al., 2001). No entanto este é o único trabalho que estudou a liberação de SO em pacientes com LES juvenil.

A análise da liberação de SO pelos monócitos ativados e pelos polimorfonucleares espontâneos mostrou resultado semelhante tanto nos dois grupos de pacientes com LES ativo e inativo como no grupo controle.

Nos ensaios dos monócitos espontâneos e dos polimorfoneutrófilos ativados houve diferença significativa da liberação de SO entre o grupo controle e o grupo de lúpus inativo e ativo, porém nenhuma diferença entre os dois grupos de pacientes lúpicos.

Visto não haver detectado correlação entre a atividade de doença e liberação do ânion SO, o que poderia ser esperado porque quanto maior a atividade da doença maior é o processo inflamatório, submetemos os dados obtidos a outra análise estatística para descobrir se, com outra metodologia, encontraríamos alguma diferença significativa.

Utilizamos o teste de Mann-Whitney, mantendo o nível de significância $p < 0,05$.

Foram analisados os dados brutos dos três grupos, para cada tipo de célula e para cada tempo do ensaio, fazendo a comparação entre grupos de dois a dois (Apêndice 7).

No ensaio dos polimorfoneutrófilos espontâneos houve diferença estatística significativa nos instantes 0, 15, 45 e 60 minutos quando comparamos os grupos controle e lúpus inativo (Tabela 21) e nos instantes 5 e 15 minutos entre os grupos lúpus ativo e lúpus inativo (Tabela 23).

No ensaio dos polimorfoneutrófilos ativados houve diferença estatística significativa nos instantes 0, 5 e 60 minutos quando comparamos os grupos controle e lúpus inativos (Tabela 24), e nos instantes 5 e 60 minutos quando comparamos os grupos controle e lúpus com atividade (Tabela 25).

No ensaio dos monócitos espontâneos houve diferença estatística significativa nos instantes 5, 15, 25, 45 e 60 minutos quando comparamos os grupos controle e lúpus inativos (Tabela 27), e nos instantes 15 e 45 minutos ao compararmos os grupos lúpus ativo e lúpus inativo (Tabela 29).

No ensaio dos monócitos ativados não detectamos nenhuma diferença estatística significativa em nenhum instante das três comparações (Tabelas 30, 31 e 32).

Nesta segunda metodologia observamos mais diferenças estatísticas significativas que com o método anterior (Tabelas 21, 23, 24, 25, 27 e 29).

Focando apenas a comparação entre os dois grupos de pacientes lúpicos observamos que no ensaio dos polimorfonucleares espontâneos (Tabela 23) o grupo dos pacientes inativos apresentou uma média de liberação do ânion SO menor que a média dos com atividade nos instantes 5 e 15 minutos. No ensaio dos monócitos espontâneos, de modo semelhante, a média da liberação foi maior no grupo em atividade que a do grupo inativo nos instantes 15 e 45 minutos (Tabela 29).

Com estes últimos resultados obtidos, buscando detectar uma diferença mais significativa, utilizamos novamente o método de Mann-Whitney, com o mesmo nível de significância, porém reclassificando os pacientes; consideramos como lúpus inativo aqueles com a pontuação do SLEDAI menor ou igual a quatro. Aplicando este critério apenas um paciente mudou a classificação para ativo, ficando o grupo com lúpus em atividade com nove pacientes. A análise estatística não detectou diferença importante quando comparada aos resultados anteriores.

Em conclusão, frente aos resultados obtidos podemos afirmar que no ensaio dos polimorfoneutrófilos ativados há uma liberação significativamente maior do ânion SO do grupo dos LESJ inativos que na do grupo controle nos instantes iniciais do experimento, a denominada explosão respiratória; há uma liberação significativamente maior do ânion SO no grupo controle que no grupo dos LESJ em atividade no instante final do experimento. No ensaio dos monócitos espontâneos há uma maior liberação do ânion SO pelo grupo controle que pelo grupo LESJ sem atividade, e que esta é significativa em três momentos do experimento.

Não detectamos diferença na liberação de SO entre os grupos de pacientes lúpicos ativos e inativos.

Os testes de Mann-Whitney empregados secundariamente podem sugerir uma tendência dos resultados. Estes dados estatísticos, associados à grande amplitude dos valores obtidos na leitura da liberação do SO, sugerem um estudo posterior, com casuística ampliada ou, ainda melhor, que de cada paciente se obtenha uma alíquota de sangue nos diferentes estados de atividade da doença, utilizando-o desta forma como seu próprio controle.

7- CONCLUSÕES

7.1- Liberação de ânion SO pelos pacientes com LESJ

A liberação espontânea do ânion SO pelos polimorfoneutrófilos e monócitos dos pacientes com LESJ foi significativamente menor que a dos indivíduos controle em alguns instantes.

A liberação estimulada do ânion SO pelos polimorfoneutrófilos dos pacientes com LESJ foi significativamente maior nos instantes iniciais e depois menor que a dos indivíduos controle. A dos monócitos estimulados foi igual à dos controles.

A liberação estimulada do ânion SO pelos monócitos dos pacientes com LESJ é igual à dos indivíduos controle.

7.2- Liberação de ânion SO pelos pacientes com LESJ classificados quanto à atividade da doença

A liberação espontânea do ânion SO pelos polimorfoneutrófilos dos pacientes com LESJ independe do estado de atividade da doença e é igual ao do grupo controle.

A liberação espontânea do ânion SO pelos monócitos dos pacientes com LESJ inativo é igual à dos pacientes com LESJ ativo; é menor que a dos indivíduos controle sendo significativa em alguns instantes.

A liberação estimulada do ânion SO pelos polimorfoneutrófilos dos pacientes com LESJ inativo é significativamente maior nos instantes iniciais que a do grupo controle; a dos pacientes com LESJ ativo é significativamente menor nos instantes finais que a dos indivíduos controle.

A liberação estimulada do ânion SO pelos monócitos dos pacientes com LESJ independe do estado de atividade da doença e é igual ao do grupo controle.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Babior BM. Oxygen dependent microbial killing by phagocytes. Part I. N Engl J Med 1978; 298: 659-68.

Babior BM. Phagocytosis and oxydative stress. Am J Med 2000; 109:33-44.

Biasi D, Carletto A, Dell'agnola C, Caramaschi P, Montesanti F, Zavateri G, Zeminian S, Bellavite P, Bambara LM. Neutrophil migration, oxidative metabolism, and adhesion in elderly and young subjects. Inflammation 1996; 20:673-81.

Bombardier C, Gladman DD, Urowitz MB, Caron D, Chang CH. Committee on prognosis studies in SLE. Derivation of the SLEDAI. A disease Activity Index for Lupus Patients. Arthritis Rheum 1992; 35:630-40.

Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Scand J Clin Lab Invest 1968; 21 (Suppl. 97): 1-77.

Bruce I, McNally J, Bell A. Enhanced monocyte generation of reactive oxygen species in primary systemic vasculitis. J Rheumatol 1997; 24:2364-70.

Cassidy JT, Petty RE. Systemic lupus erythematosus. In: Cassidy JT, Petty RE. Textbook of Pediatric Rheumatology. 4th ed. Philadelphia: W.B.Saunders Co.; 2001. p.396-449.

Cassidy JT, Sullivan DB, Petty RE, Rasgade C. Lupus nephritis and encephalopathy. Prognosis in 58 children. Arthritis Rheum 1977; 20(Suppl):315-22.

Cederholm T, Gyllenhammar H. Impaired granulocyte formylpeptide-induced superoxide generation in chronically ill, malnourished, elderly patients. J Int Med 1999; 245:475-82.

Cencetti A, De Martino M, Graziani E, Maddali Bongi S, Palermo C, Pavari E, Zoppi M. Superoxide anion production by circulating polymorphonuclear leukocytes in rheumatoid arthritis. Clin Rheumatol 1990; 9:51-5.

Clements PJ, Paulus HE. Salicylate and nonsteroidal therapy. In: Wallace DJ, Hahn BH. Dubois' Lupus Erythematosus. 5th ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1997. p. 1109-16.

Costallat LTL, Coimbra AMV. Systemic Lupus Erythematosus: clinical and laboratory aspects related to age at disease onset. Clin Exp Immunol 1994; 12:603-7.

Crocker IP, Wellings RP, Fletcher J, Baker PN. Neutrophil function in women with pre-eclampsia. Br J Obstet Gynecol 1999; 106:822-8.

Crocker IP, Baker PM, Fletcher J. Neutrophil function in pregnancy and rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2000; 59:555-64.

Crouch SP, Crocker IP, Fletcher J. The effect of pregnancy on polymorphonuclear leukocytes function. *J Immunol* 1995; 155:5436-43.

Dandona P, Mohanty P, Hamouda W, Ghanim H, Aljada A, Garg R, Kumar V. Inhibitory effect of a two day fast on reactive oxygen species (ROS) generation by leucocytes and plasma ortho-tyrosine and meta-tyrosine concentrations. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:2899-902.

Davenpeck KL, Zagorski J, Schleimer RP, Bocchnr BS. Lipopolysaccharide-induced leukocyte rolling and adhesion in the rat mesenteric microcirculation: regulation by glucocorticoids and role of cytokines. *J Immunol* 1998; 161:6861-70.

De La Fuente H, Richaud-Patin Y, Jakez-Okampo J, Gonzales-Amaro R, Lorente L. Innate immune mechanism in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus (SLE). *Immunol Lett* 2001; 77:175-80.

Diaz-Gonzales F, Sanches-Madrid F. Inhibition of leukocyte adhesion: an alternative mechanism for action for anti-inflammatory drugs. *Immunol Today* 1998; 19:169-72.

Dobrinich R, Spagnuolo PJ. Binding of C-reactive protein to human neutrophils. Inhibition of respiratory burst activity. *Arthritis Rheum* 1991; 34:1031-8.

Freitas JP, Filipe P, Youssef A, Emerit I, Guerra-Rodrigo F. Oxidative stress in Adamantine-Behçet disease. *Dermatology* 1998; 197:343-8.

Gabbianelli R, Kantar A, Oggiano N, Forini R, Falcioni G, Giori PL. Metabolismo ossidativo in granulociti polimorfonucleati di bambini com trisomia 21 (Oxidative metabolism in polymorphonuclear granulocytes of children with trisomy 21). *Minerva Pediatr* 1993; 45:493-7.

Gallin JI. Inflammation. In Paul WE. *Fundamental Immunology*. 3rd ed. New York: Raven Press Ltd; 1993. p. 1015-32.

Ginzler EM. Infections in Systemic Lupus Erythematosus. In: Wallace DJ, Hahn BH. *Dubois' Lupus Erythematosus*. 5th ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1997. p. 903-13.

Gladman DD, Goldsmith CH, Urowitz MB, Bacon P, Bombardie C, Isenberg D, et al. Sensitivity to change of 3 systemic lupus erythematosus disease activity indices: international validation. *J Rheumatol* 1994; 21:1468-71.

Gougerot-Pocidalo MA, El-Bena J, Elbin C, Chollet-Martin S, Dang MC. Regulation de l'explosion oxydative des polynucléaires neutrophiles humains par les cytokines pro-et anti-inflammatoires. (Regulation of human neutrophils oxidative burst by pro-and anti-inflammatory cytokines). *J Soc Biol* 2002; 196:37-46.

Graça-Souza AV, Arruda MA, De Freitas MS, Barja-Fidalgo C, Oliveira PL. Neutrophil activation by heme: implications for inflammatory processes. *Blood* 2002; 99:4160-5.

Halliwel B. Free radicals; antioxidants; and human disease; curiosity; cause or consequence? *Lancet* 1994; 344:721-4.

Halliwel B. Oxygen radicals, nitric oxide and human inflammatory joint disease. *Ann Rheum Dis* 1995; 54:505-10.

Harvey AM, Shulan LE, Tumulty PH, Conley CL, Schoenrich EH. Systemic lupus erythematosus. A review of the literature and clinical analysis of 138 cases. *Medicine (Baltimore)* 1954; 33:291-437.

Hashimoto Y, Ziff M, Hurd ER. Increased endothelial cell adherence, aggregation, and superoxide generation by neutrophils incubated in systemic lupus erythematosus and Felty's syndrome sera. *Arthritis Rheum* 1982; 25:1409-18.

Hilário MOE, Fedrizzi MS, Goldenberg J, Sato EI, Naspitz C. Lupus eritematoso sistêmico em 25 crianças: avaliação clínica e laboratorial. *Rev Bras Reumatol* 1992; 32:178-82.

Hochberg MC. The incidence of systemic lupus erythematosus in Baltimore, Maryland, 1970-1977. *Arthritis Rheum* 1985; 28:80-6.

Hurst NP, French JK, Bell AL, Nuki G, O'Donnell ML, Betts WH, et al. Differential effects of mepacrina, chloroquine and hydroxychloroquine on superoxide anion generation, phospholipid methylation and arachidonic acid release by human blood monocytes. *Biochem. Pharmacol* 1986; 35:3038-89.

Hurst NP, French JK, Gorjatschko L, Betts WH. Studies on the mechanism of inhibition of chemotactic tripeptide stimulated human neutrophil polymorphonuclear leucocyte superoxide production by chloroquine and hydroxychloroquine. *Ann Rheu Dis* 1987; 46:750-6.

Hurst NP, French JK, Gorjatschko L, Betts WH. Chloroquine and hydroxychloroquine inhibit multiple sites in metabolic pathways leading to neutrophil superoxide release. *J Rheumatol* 1988; 15:23-7.

Jiang X, Chen F. The effect of lipid peroxides and superoxide dismutase on systemic lupus erythematosus: A preliminary study. *Clin Immunol Immunopathol* 1992; 63:39-44.

Jones OT. The mechanism of production of superoxide by phagocytes. *Mol Chem Neuropathol* 1993; 19:177-84.

Kaluniam KC. Definition, classification, activity, and damage Index. In: Wallace DJ, Hahn BH. *Dubois' Lupus Erythematosus*. 5th ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1997. p. 19–29.

Kitridou RC. The Mother in systemic lupus erythematosus. In: Wallace DJ, Hahn BH. *Dubois' Lupus Erythematosus*. 5th ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1997. p 967- 1002.

Komatsu H, Tsukimori K, Hata K, Satoh S, Nakano H. The characterization of superoxide production of human neonatal neutrophil. *Early Hum Dev* 2001; 65:11-9.

Kornreich H. Systemic Lupus Erythematosus in childhood. *Clin Rheum Dis* 1976; 2:429- , 1976.

Krensky AM, Strom TB, Bluestone JA. Immunomodulators: immunosuppressive agents, tolerogens, and immunostimulants. In Hardman, J.G.; Limbird, L.E.; Gilman, A.G. *Goodman & Gilman's. The pharmacological basis of therapeutics*. 10th ed. New York: McGraw-Hill; 2001. p.1463–84.

Kurien BT, Scofield RH. Free radical mediated peroxidase damage in systemic lupus erythematosus. *Life Sciences* 2003;73: 1655-66.

Laudanna C, Mirton S, Berton G, Rossi F. Tumor necrosis factor-alpha/cachectin activates the O₂(-)-generating system of human neutrophils independently of the hydrolysis of phosphoinositides and the release of arachidonic acid. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 166:308-15.

Laxer RM, Gazarian M. Pharmacology and drug therapy. In Cassidy JT, Petty RE. Textbook of Pediatric Rheumatology. 4th ed. Philadelphia: W. B. Saunders Co.; 2001. p.90–146.

Lehman TJA, McCurdy DK, Bernstein BH, King KK, Virgil H. Systemic lupus erythematosus in the first decade of life. *Pediatrics* 1989; 83:235-9.

Macconi D, Zanoli AF, Orisio S, Longaretti L, Magrini L, Rota S, et al. Methylprednisolone normalizes superoxide anion production by polymorphs from patients with ANCA-positive vasculitides. *Kidney Int* 1993; 44:215-20.

Marini R, Costallat LTL. Young age at onset, renal involvement, and arterial hypertension are of adverse prognostic significance in Juvenile Systemic Lupus Erythematosus. *Revue du Rhumatisme, (English, Edition)* 1999; 6:303-9.

Marzocchi-Machado CM, Alves CMOS, Azzolini AECS, Polizello ACM, Carvalho IF, Lucisano-Valim YM. Fc γ and complement receptors: expression, role and co-operation in mediating the oxidative burst and degranulation of neutrophils of brazilian systemic lúpus erythematosus patients. *Lupus* 2002; 11:240-8.

McCord JM., Fridovich I. Superoxide dismutase: An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem* 1969; 244:6049-55.

McCune WJ. Cytotoxic drugs. In: Wallace DJ, Hahn BH. Dubois' Lupus Erythematosus. 5th ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1997. p.1163-80.

McPhail LC, Snyderman R. Activation of the respiratory burst enzyme in human polymorphonuclear leukocytes by chemoattractants and other soluble stimuli. Evidence that the same oxidase is activated by different transductional mechanisms. *J Clin Invest* 1983; 72:192-200.

McPhail LC, Clayton CC, Snyderman R. The NADPH oxidase of human polymorphonuclear leukocytes. Evidence for regulation by multiple signals. *J Biol Chem* 1984; 259:5768-75.

McPhail LC, Shirley PS, Clayton CC, Snyderman R. Activation of the respiratory burst enzyme from human neutrophils in a cell-free system. Evidence for a soluble cofactor. *J Clin Invest* 1985; 75:1735-9.

Meislin AG, Rothfield N. Systemic Lupus Erythematosus in childhood. Analysis of 42 cases, with comparative data on 200 adult cases followed concurrently. *Pediatrics* 1968; 42:37-49.

Melamed Y, Sirota P, Dicker DR, Fishman P. Superoxide anion production by neutrophils derived from peripheral blood of schizophrenic patients. *Psychiatry Res* 1998; 77:29-34.

Miesel R, Hartung R, Kroeger H. Priming of NADPH oxidase by tumor necrosis factor alpha in patients with inflammatory and autoimmune rheumatic diseases. *Inflammation* 1996; 20:427-38.

Miyachi Y, Yoshioka A, Imamura S, Niwa Y. Antioxidant action of antimalarials. *Ann Rheum Dis* 1986; 45:244-8.

Mok CC, Lau CS, Wong RW. Risk factor for ovarian failure in patients with systemic lupus erythematosus receiving cyclophosphamide therapy. *Arthritis Rheum* 1998; 41:831-7.

Moon DG, Van der Zee H, Weston LK, Gudewiz PV, Fenton 2nd JW, Kaplan JE. Platelet modulation of neutrophil superoxide anion production. *Thromb Haemost* 1990; 63:91-6.

Mur E, Zabernigg A, Hilbe W, Eisterer W, Halder W, Thaler J. Oxidative burst of neutrophils in patients with rheumatoid arthritis: influence of various cytokines and medication. *Clin Exp Rheumatol* 1997; 15:233-7.

Nathan CF. Secretory products of macrophages. *J Clin Invest* 1987; 79:319-26.

Nielsen CH, Rasmussen JM, Voss A, Junker P, Leslie RG. Diminished ability of erythrocytes from patients with systemic lupus erythematosus to limit opsonized immune complex deposition on leukocytes and activation of granulocytes. *Arthritis Rheum* 1998; 41:613-22.

Niwa Y, Sakane T, Shingu M, Miyachi Y. Role of stimulated neutrophils from patients with systemic lupus erythematosus in disturbed immunoreactivity, with special reference to increased oxygen intermediates generated by the neutrophils. *J Clin Lab Immunol* 1984; 14:35-43.

Perskin MH, Cronstein BN. Age-related changes in neutrophil structure and function. *Mech Ageing Dev* 1992; 64:303-13.

Petri M, Genovese M, Engle E, Hochberg MC. Definition, incidence, and clinical description of flare in systemic lupus erythematosus: a prospective cohort study. *Arthritis Rheum* 1991; 34:937-44.

Poligano A, Tortorella C, Venezia A, Jirillo E, Antonaci S. Age-associated changes of neutrophils responsiveness in a human healthy elderly population. *Cytobios* 1994; 80: 145-53.

Pyne DB, Smith JA, Baker MS, Telford RD, Weidemann MJ. Neutrophil oxidative activity is differentially affected by exercise intensity and type. *J Sci Med Sport* 2000; 3:44-54.

Quismorio Jr FP. Hematological and lymphoid abnormalities in systemic lupus erythematosus. In: Wallace DJ, Hahn BH. *Dubois' Lupus Erythematosus*. 5th ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1997. p. 793-816.

Quismorio Jr FP. Systemic corticosteroid therapy in systemic lupus erythematosus. In: Wallace DJ, Hahn BH. *Dubois' Lupus Erythematosus*. 5th ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1997. p. 1141-62.

Rivkees SA, Crawford JD. The relationship of gonadal activity and chemotherapy-induced gonadal damage. *Jama* 1988; 259: 2123-25.

Roberts LJ, Morrow JD. Analgesic-antipyretic and antiinflammatory agents and drugs employed in the treatment of gout. In Goodman & Gilman's. *The pharmacological basis of therapeutics*. 10th ed. New York: McGraw-Hill, 2001. p. 687-731.

Robinson JM, Badwey JA, Karnovsky ML, Karnovsky MJ. Release of superoxide and change in morphology by neutrophils in response to phorbol esters: antagonism by inhibitors of calcium-binding proteins. *J Cell Biol* 1985; 101:1052-8.

Rothfield N. Clinical features of systemic lupus erythematosus. In Kelley, W.N.; Harris, E.D.; Ruddy, S.; Sledge, C.V.B. *Textbook of Rheumatology*. Philadelphia: W.B. Saunders Co., 1981.

Salmon D, Verdier F, Malhotra K, Pussard E, Clavie F, Le Bras J, et al. Absence of effect of chloroquine in vivo on neutrophil oxidative metabolism in human subjects. *J Antimicrob Chemother* 1990; 25:367-70.

Sambo P, Janino L, Candela M, Salvi A, Donini M, Dusi S. et al. Monocytes of patients with systemic sclerosis (scleroderma spontaneously release in vitro increased amounts of superoxide anion). *J Invest Dermatol* 1999; 112:70-84.

Sato EI, Natour J, Martinelli VPL, Assis LSS, Farão SR, Medeiros EL. et al. Seguimento clínico e laboratorial de 132 pacientes com lúpus eritematoso sistêmico. *Rev Bras Reumatol* 1991; 31:57-62.

Schimmer BP, Parer KL. Adrenocorticotrophic hormone; adrenocortical steroids and their synthetic analogs; inhibitors of the synthesis and actions of adrenocortical hormones. *In* Hardman, J.G.; Limbird, L.E.; Gilman, A.G. Goodman & Gilman's The pharmacological basis of therapeutics. 10th ed. New York: McGraw-Hill, 2001. p. 1649-77.

Scott RB, Wood HE, Main S, Kukreja RC, Hess ML. Superoxide radical production after phorbol ester stimulation in neutrophils of aged donors. *Exp Gerontol* 1990; 25:523-32.

Shapiro HS. Psychopathology in the patient with lupus. *In*: Wallace, D.J.; Hahn, B.H. Dubois' Lupus Erythematosus. 5th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1997. p.755-82.

Shih HC, Su CH, Lee CH. Superoxide production of neutrophils after severe injury: impact of subsequent surgery and sepsis. *Am J Emerg Med* 1999; 17:15-7.

Siegel M, Lee SL. The epidemiology of systemic lupus erythematosus. *Semin Arthritis Rheum* 1973; 3:1-54.

Steinberg AD, Klinman DM. Pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Rheum Dis Clin North Am* 1988; 14:25-41.

Stewart AG, Dubbin PN, Hirs T, Dusting GP. Platelet-activating factor may act as a second messenger in the release of eicosanoids and superoxide anions from leukocytes and endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci* 1990; 87:3215-9.

Tan EM, Cohen AS, Fries JFG, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, Schaller JG, Talal N, Winchester RJ. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982; 25:1271-7.

Uemeki S, Soejima R. Hydrocortisone inhibits the respiratory burst oxidase from human neutrophils in whole-cell and cell-free systems. *Biochim Biophys Acta* 1990; 1052:211-5.

Vane JR, Botting RM. New insights into the mode of action of anti-inflammatory drugs. *Inflamm Res* 1995; 44:1-10.

Wallace DJ. Antimalarial therapies. In: Wallace DJ, Hahn BH. *Dubois' Lupus Erythematosus*. 5th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1997. p. 1117- 39.

Wallace DJ, Dubois E.L.. Definition, classification and epidemiology of systemic lupus erythematosus. In: Wallace, D.J. *Dubois' Lupus Erythematosus*. 3rd ed. Philadelphia: Lea and Febiger, 1987. p.19-65

Waszczykowska E, Roba E, Wozniacka A, Narbutt J, Torzecka JD, Sysa-Jedrzejowska A. Estimation of SLE activity based on the serum level of chosen cytokines and superoxide radical generation. *Mediators Inflamm* 1999; 8:93-100.

Wiseman H, Halliwell B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem J* 1996; 313:17-29.

Yoshida T, Tanaka M, Sotomatsu A, Okamoto K, Hirai S. Serum of Behçet disease enhances superoxide production of normal neutrophils. *Free Radic Res* 1998; 28:39-44.

Yu CL, Chang KL, Chiu CC, Chiang BN, Han SH, Wang SR. Defective phagocytosis, decreased Tumor Necrosis Factor - α production, and lymphocyte hyporesponsiveness predispose patients with systemic lupus erythematosus to infection. *Scand J Rheumatol* 1989; 18:97-105.

9- ANEXOS

ANEXO 1

SLEDAI - SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS DISEASE ACTIVITY INDEX

Paciente: _____

H.C. __. __. __ - __

PESO	P	Manifestação	Definição
8		Convulsão	Início recente. Excluída causa metabólica, infecciosa ou drogas.
8		Psicose	Alteração comportamental, percepção da realidade, alucinações, incoerências, raciocínio ilógico, catatonia. Excluídas as metabólicas, infecciosas e as causadas por drogas.
8		Síndrome Orgânica Cerebral	Alteração das funções mentais, orientação, memória, função intelectual, perda da memória, alterações da fala, insônia, sonolência diurna, alterações psicomotoras. Excluídas as metabólicas, infecciosas e as causadas por drogas.
8		Distúrbio visual	Alterações retinianas. Corpo citóide, hemorragia, exsudatos neurite. Sem hipertensão ou infecção.
8		Acometimento nervo craniano	Início recente de acometimento de nervo craniano.
8		Cefaléia lúpica	Severa e persistente. Pode ser semelhante à enxaqueca.
8		Acidente Vascular Cerebral	Evento novo. Excluída aterosclerose.
8		Vasculite	Úlceras, gangrena, nódulos, infarto periungueal.
4		Artrite	Mais que duas articulações dolorosas e inflamadas.
4		Miosite	Dor ou fraqueza de musculatura proximal com enzimas musculares aumentadas. Eletro-neuromiografia alterada ou biópsia muscular.
4		Cilindros urinários	Cilindros hemáticos ou leucohemáticos.
4		Hematúria	Maior que 5 células por campo. Excluída litíase, infecção ou outra causa.
4		Proteinúria	Manifestação recente ou aumento de já existente - maior que 0,5 g / 24 hs.
4		Leucocitúria	Maior que 5 leucócitos por campo. Excluída infecção.
2		Rash novo	Surgimento ou exacerbação.
2		Alopecia	Surgimento ou exacerbação, difuso ou localizado.
2		Úlceras mucosas	Surgimento ou exacerbação de úlceras bucais ou nasais.
2		Pleurite	Dor torácica (pleural) com derrame pleural, ou atrito pleural.
2		Pericardite	Precordialgia com pelo menos um dos seguintes: atrito ou derrame pericárdico; alteração no ecocardiograma ou eletrocardiograma.
2		Hipocomplementemia	Diminuição dos níveis de CH50, C3 ou C4 ou valores abaixo dos padrões de normalidade.
2		Aumento do título do DNA	Maior que 1/10 ou subida maior que 25% do anterior.
1		Febre	Maior que 38° C, excluída causa infecciosa.
1		Plaquetopenia	Menor que 100.000 plaquetas / mm ³ .
1		Leucopenia	Menor que 3.000 leucócitos / mm ³ , excluída a causada por drogas.

TOTAL: _____

10- APÊNDICES

APÊNDICE 1



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
☐ Caixa Postal 6111
13083-970 Campinas, SP
☎ (0__19) 3788-8936
fax (0__19) 3788-8925
✉ cep@head.fcm.unicamp.br

CEP, 19/08/03
(Grupo III)

PARECER PROJETO: Nº 308/2003

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “ÂNION SUPEROXIDO EM PACIENTES COM LUPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO JUVENIL”
PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Roberto Marini
INSTITUIÇÃO: Ambulatório de Reumatologia Pediátrica/HC/UNICAMP
APRESENTAÇÃO AO CEP: 08/07/2003
APRESENTAR RELATÓRIO EM: 19/02/04

II - OBJETIVOS

Avaliar a correlação entre a produção do anion superóxido e a atividade da doença lúpus eritematoso sistêmico juvenil.

III - SUMÁRIO

Analisar e dosar os anions superóxidos no sangue em pacientes com lupus eritematoso e tentar correlacionar com a atividade inflamatória, a resposta aos tratamentos e ver se o anion pode ser usado como um dos parâmetros de acompanhamento de pacientes com lupus.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

O trabalho está bem equacionado, o termo de consentimento está adequado e não causa dano aos pacientes acompanhados, além de otimizar a colheita de exames com os que são normalmente colhidos para seguimento da doença de base.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa supracitado.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

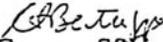
O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na VIII Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 19 de agosto de 2003.


Prof. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

APÊNDICE 2

CONSENTIMENTO PARA REALIZAÇÃO DE PESQUISA

Ânion Superóxido em pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico Juvenil

Paciente: _____

Data nascimento: / / Sexo: H.C.

Responsável:

Grau de parentesco: R.G. Idade:

Endereço: Fone:

Cidade: CEP:

O ânion Superóxido (SO) é normalmente produzido pelos glóbulos brancos do sangue quando o organismo sofre qualquer tipo de agressão, como uma parte da resposta do sistema imunológico.

A pesquisa tem a finalidade de estudar a produção do SO em pacientes do ambulatório de reumatologia pediátrica do HC UNICAMP com o diagnóstico de Lúpus Eritematoso Sistêmico.

Os objetivos da pesquisa são saber se:

- podemos estabelecer uma correlação direta entre níveis do SO e a atividade da doença
- a produção do SO tem correlação direta com outros marcadores de atividade inflamatória.
- a produção do SO é um indicador da atividade inflamatória.

O tratamento clínico do paciente será realizado conforme o consenso atual da literatura, regularmente aplicado aos pacientes com a mesma patologia, não havendo nenhuma alteração ou influência da terapêutica devida à pesquisa.

Não haverá nenhum procedimento diagnóstico ou cirúrgico, bem como internação ou exame radiológico especialmente realizados para a pesquisa.

Quando da coleta de exames rotineiramente utilizados para confirmação diagnóstica ou avaliação e controle laboratorial da patologia retiraremos, na mesma punção venosa, uma alíquota de sangue em frasco de polipropileno com anticoagulante (ACD) para a realização dos ensaios específicos para o SO.

Os exames laboratoriais serão solicitados conforme rotina já estabelecida (quadro 1).

Quadro 1: Exames laboratoriais de pacientes com LESJ.

EXAME Hemograma (HMG) Alfa 1 glicoproteína ácida (ALFA1GLI) Velocidade de Hemossedimentação (VHS) Proteína C Reativa (PCR) Fator Anti Núcleo (FAN) Anticorpo anti-DNA (AADNA) Urina I (URI) Proteinúria de 24 hs (PROT24) ou microalbuminúria (MICROALB) Fração C3 do complemento sérico (C3) Fração C4 do complemento sérico (C4) SUPERÓXIDO

Não haverá riscos ou transtornos adicionais ao paciente quando comparados a outros pacientes com a mesma patologia, pois a única diferença é a coleta da alíquota de sangue para realização do exame laboratorial.

Visto não haver nenhuma diferença no tratamento do paciente não se espera nenhum benefício específico para o mesmo, mas também não haverá nenhum dano, risco, efeito colateral ou adverso, gasto adicional, quando comparado a outros pacientes com a mesma patologia.

O benefício esperado da pesquisa será, caso as hipóteses se confirmem, a aplicabilidade aos demais pacientes do exame do SO para determinar, com mais sensibilidade, a intensidade de atividade inflamatória da patologia no paciente e com isto, se necessário, alterar o esquema terapêutico.

Os esclarecimentos acerca dos assuntos relacionados à pesquisa serão os mesmos que são dados a qualquer paciente com a mesma patologia, pois não haverá diferença quanto à conduta diagnóstica, terapêutica e acompanhamento do indivíduo incluído na pesquisa de outro não participante; as informações serão fornecidas no momento da consulta no ambulatório de reumatologia pediátrica do HC- UNICAMP.

O paciente poderá a qualquer momento deixar de participar da pesquisa, não permitindo a coleta da alíquota de sangue para as dosagens do SO fato que não implicará em nenhuma alteração no plano de acompanhamento clínico, laboratorial e terapêutico do paciente.

A assistência médica será realizada ou supervisionada pelo responsável pela pesquisa, pois os participantes são indivíduos matriculados no HC -UNICAMP e regularmente atendidos no ambulatório de reumatologia pediátrica.

A pesquisa não oferece nenhum risco adicional ao paciente; o acompanhamento clínico é o regularmente dispensado aos demais pacientes com a mesma patologia, seja nas consultas agendadas seja nas intercorrências.

Os exames rotineiros serão realizados no laboratório de Patologia Clínica do HC – UNICAMP e os de SO no laboratório do Centro de Investigações Pediátricas (CIPED).

Não há financiamento específico e nenhuma remuneração envolvida neste trabalho.

Médico responsável: Roberto Marini - CRMSP 25267
Ambulatório de Reumatologia Pediátrica - Departamento de Pediatria
Ambulatório de Pediatria - 3º e Hospital das Clínicas - UNICAMP
Fone: 0 XX 19 3788 - 7353 / 3788 – 7646
Pronto Socorro de Pediatria – HC – UNICAMP – 0 XX 19 3788-8768

Reclamações do paciente quanto a qualquer procedimento executado no HC – UNICAMP deverão ser feitas à **Comissão de Ética Médica do HC – UNICAMP - 0 XX 19 3788 8941**

Assinatura do Responsável pelo paciente

Assinatura do responsável pela pesquisa
Dr. Roberto Marini
CRM 25267

APÊNDICE 3

Tabela 16- LESJ: Exames laboratoriais dos pacientes, medicamentos em uso e SLEDAI no momento do ensaio do ânion SO.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
	SRF	FAP	ME	VGS	BCB	JMA	EAD	LLA	CSB	VSM	CFS	ECT	TCS	SVR	MSR	PJS	NFC	SNL	VJS	ILM	MCF	FAM	AGC
EXAME																							
complemento fração C3	↓	↓	-	-	↓	↓	-	↓	↓	↓	↓	↓	-	-	-	↓	↓	-	-	↓	-	↓	↓
complemento fração C4	↓	↓	-	-	-	-	-	↓	-	-	-	-	-	-	-	↓	-	-	-	-	-	-	-
Hemoglobina 10 g / dl	↓	↓	-	-	-	-	-	-	↓	-	-	-	-	-	-	↓	-	-	-	-	↓	-	-
Leucócitos 3.000 / mm ³	↓	-	-	-	↓	-	-	-	↓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Linfócitos 1.500 / mm ³	↓	-	-	-	-	-	-	-	↓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	↓	-	-
Plaquetas 100.000 / mm ³	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FAN 1/ 40 Hep-2	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
AADNA 1/10 <i>Crithidia luciliae</i>	↑	↑	↑	-	↑	-	-	-	↑	↑	-	-	↑	-	-	↑	-	↑	-	-	-	-	-
VHS 15 mm 1 ^a hora	↑	↑	NR	NR	-	↑	↑	NR	↑	-	-	↑	↑	-	-	↑	NR	↑	-	↑	↑	-	-
PCR 0,4 mg / dl	↑	-	NR	-	-	↑	-	-	-	↑	-	-	-	-	-	↑	↑	-	NR	NR	↑	-	-
Alfa 1 glicoproteína 125 mg / dl	↑		↑	-	-	↑	-	↑	↑	↑	-	↑	NR	↑	-	↑	↑	↑	↑	↑	NR	-	-
Hematúria 5 hemácias/campo	-	-	-	-	-	↑	-	-	↑	-	-	-	-	-	-	↑	-	-	-	-	-	-	-
Proteinúria 0,05 g / kg / dia	-	-	-	-	-	-	-	-	NR	-	-	-	-	-	-	↑	-	-	-	↑	-	-	-
MEDICAMENTOS EM USO																							
Prednisona			+	+	+	+		+				+	+		+			+		+		+	+
Cloroquina			+	+	+	+									+			+		+		+	+
Azatioprina					+							+											
Ciclosporina																							
AINH									+														
Outro															+								
SLEDAI	12	15	2	2	5	18	2	18	19	9	2	2	2	2	2	49	2	3	1	18	2	0	0

↓ abaixo do valor ou do mínimo do método padronizado utilizado

- dentro dos limites da normalidade do método padronizado utilizado

+ em uso do medicamento

AINH antiinflamatório não hormonal

↑ acima do valor ou do máximo do método padronizado utilizado

NR exame não realizado

SLEDAI Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index

APÊNDICE 4

Tabela 17- LESJ: Valores da pontuação do SLEDAI dos 23 pacientes no momento da coleta da amostra para o ensaio do ânion SO.

SLEDAI - SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS DISEASE ACTIVITY INDEX

PACIENTE	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	Manifestação	
PONTOS																									
8																X									Convulsão
8						X										X									Psicose
8																X									Síndrome Orgânica Cerebral
8																									Distúrbio visual
8																									Acometimento nervo craniano
8																X									Cefaléia lúpica
8																									Acidente Vascular Cerebral
8		X						X	X												X				Vasculite
4	X							X	X	X											X				Artrite
4																									Miosite
4																									Cilindros urinários
4						X										X									Hematúria
4																X					X				Proteinúria
4						X																			Leucocitúria
2	X	X	X					X	X						X	X									Rash novo
2																									Alopecia
2																X									Úlceras mucosas
2																									Pleurite
2																									Pericardite
2	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X		X	X				Hipocomplementemia
2	X	X		X				X	X	X		X			X										Aumento do título do DNA
1	X	X						X	X						X		X								Febre
1																									Plaquetopenia
1	X			X																X					Leucopenia
TOTAL	12	15	2	2	5	18	2	18	19	9	2	2	2	0	2	49	2	3	1	18	2	0	0		

APÊNDICE 5

Tabela 18- LESJ: Dados epidemiológicos dos 23 pacientes com LESJ conforme distribuição do sexo, etnia, idade ao início das manifestações clínicas, idade ao diagnóstico, idade no momento do ensaio laboratorial e tempo de acompanhamento no serviço no momento do estudo do ânion SO.

Paciente	sexo	etnia	idade* ao início dos sintomas	idade* ao diagnóstico	idade* no ensaio	tempo* de acompanhamento ao ensaio	pontuação SLEDAI
SRF	F	C	118	119	119	0,25	12
FAP	M	NC	125	125	125	0,25	15
ME	F	C	96	98	113	15	2
VGS	F	C	113	115	134	19	2
BCB	F	C	141	142	154	13	5
JMA	F	C	102	120	192	81	18
EAD	F	NC	70	197	209	135	2
LLA	F	C	142	144	144	0	18
CSB	M	C	115	123	123	0,25	19
VSM	F	C	117	119	119	0,25	9
CFS	F	NC	163	163	170	7	2
ECST	F	C	111	115	122	7	2
TCS	F	C	89	101	133	31	2
SRV	F	C	23	54	319	267	2
MSR	F	C	83	85	184	14	2
PJS	M	NC	148	150	150	0,25	49
NFSC	F	C	73	81	81	0,5	2
SNAL	F	C	95	101	102	1	3
VJSO	F	NC	165	165	167	4	1
ILM	F	C	122	125	125	0,25	18
MCSF	F	C	72	106	106	0,25	2
FAM	F	NC	115	117	126	7	0
AGC	F	C	131	136	141	0	0

* meses; C - caucasóide; NC - não caucasóide

APÊNDICE 6

Tabela 19- LESJ : Resultados brutos. Distribuição dos valores obtidos nos momentos 0, 5', 15', 25', 45' e 60' de superóxido, expresso em nmol por 10⁶ células por tempo de incubação, pelos polimorfo nucleares espontâneos e ativados pelo PMA no ensaio e a correspondente pontuação na escala SLEDAI do paciente.

Paciente	SLEDAI	Polimorfos espontâneos						Polimorfos ativados							
		0	5	15	25	45	60	0	5	15	25	45	60		
SRF	12	1,74	1,90	1,76	2,26	1,56	1,72								
FAP	15	0,80	1,83	2,05	1,62	2,73	2,39	2,96	6,73	7,38	7,70	8,46	9,02		
ME	2	0,74	0,94	0,59	0,92	1,64	0,80	5,70	11,26	13,92	13,56	13,06	12,84		
VGS	2	0,85	1,00	0,75	1,20	0,52	0,61	10,04	12,89	11,91	11,71	11,83	11,84		
BCB	5	0,84	0,95	0,90	1,52	1,37	0,61	1,28	3,51	7,59	11,41	13,64	12,96		
JMA	18	1,08	1,31	1,67	1,87	2,04	2,49	2,76	9,29	12,30	13,53	12,66	12,50		
EAD	2	1,05	1,30	1,94	1,85	1,28	2,64	7,10	13,43	12,83	13,15	10,79	11,76		
LLA	18	1,87	1,26	1,87	2,86	2,26	2,34	2,10	2,54	3,25	4,64	8,53	8,67		
CSB	19	0,38	1,44		1,61	1,59	1,24	2,55	7,90	8,05	5,68	9,13	6,84		
VSM	9	1,48	1,45	2,12	2,01	2,51	2,83	1,77	11,38	12,91	12,67	12,06	11,99		
CFS	2	1,63	0,47	2,90	3,48		2,90								
ECST	2	1,03	1,23	1,45	1,80	2,10	2,68								
TCS	2	1,00	1,35	1,38	1,70	3,15	2,43								
SVR	0			0,65	0,40	0,40	0,70	2,28	4,10	7,00	9,35	11,70	6,60		
MSR	2	0,65	1,06	1,26	2,51	2,73	2,88	2,60	6,80	7,76	7,78	8,54	7,26		
PJS	49	1,10	1,13	1,22	1,15	1,11	1,20	1,58	7,26	8,13	8,26	8,90	8,81		
NFSC	2	0,75	0,64	0,76	0,99	1,00	1,06	1,28	6,91	9,56	9,73	9,61	9,50		
SNAL	3	0,07	1,43	1,48	2,08	1,65	1,55								
VJS	1	0,85	0,78	0,93	1,05	1,16	1,30	4,29	7,99	9,96	9,98	9,81	9,74		
ILM	18	0,59	0,49	0,81	0,97	0,69	0,84	4,50	5,35	5,46	5,90	6,31	6,35		
MCSF	2	0,42	0,36	0,56	0,73	0,60	0,75	3,03	8,08	9,66	9,53	9,55	9,35		
FAM	0	1,38	0,98	1,38	1,28	0,69	0,57	4,04	7,50	8,78	8,39	8,11	8,11		
AGC	0	0,78	0,76	0,81	0,86	0,78	1,03	1,30	4,94	8,00	9,58	10,44	10,44		

Tabela 20- LESJ : Resultados brutos. Distribuição dos valores obtidos nos momentos 0, 5', 15', 25', 45' e 60' de superóxido, expresso em nmol por 10⁶ células por tempo de incubação, pelos monócitos espontâneos e ativados pelo PMA no ensaio e a correspondente pontuação na escala SLEDAI do paciente.

Paciente	SLEDAI	Monócitos espontâneos						Monócitos ativados						
		0	5	15	25	45	60	0	5	15	25	45	60	
SRF	12	2,01	2,11	2,08	1,90	2,17	2,02							
FAP	15	0,66	0,60	0,90	0,81	0,86	0,72	1,60	2,48	4,77	5,72	7,29	13,31	
ME	2	0,84	0,98	1,08	1,00	1,13	0,89	1,61	2,76	4,43	5,55	7,07	7,58	
VGS	2	0,94	0,93	0,98	1,14	0,93	1,00	1,62	2,20	2,85	3,18	3,51	3,55	
BCB	5	1,32	1,08	1,13	1,87	2,31	3,14	0,61	1,20	1,78	2,67	3,92	4,60	
JMA	18	0,98	1,57	2,09	3,00	4,50	5,28	1,82	4,17	5,68	7,34	9,41	10,11	
EAD	2				0,26	0,68	0,58	1,40	3,21	5,09	7,15	9,23	10,35	
LLA	18	1,38	1,32	1,42	1,49	1,52	1,54							
CSB	19	0,27	0,51	1,54	0,47	1,23	2,20	0,59	2,71	4,79	5,91	8,18	8,08	
VSM	9	1,39	1,44	1,41	1,69	1,81	1,04	0,55	0,73	1,26	1,33	1,78	2,70	
CFS	2	1,15	2,05	2,00		1,25	2,30	1,60	0,42	5,23	5,95	6,58	6,30	
ECST	2	1,28	0,85	1,13	0,95	1,03	1,55	3,75	5,50	9,23	10,73	11,80	12,88	
TCS	2	0,40	0,58	0,63	1,10	1,48	1,75		5,23	8,38	10,08	6,60	13,83	
SVR	0					0,30	5,30	3,70	4,85	6,40	8,20	12,05	8,97	
MSR	2	1,58	1,00	1,33	2,15	1,65	0,83	1,79	4,18	6,58	8,89	8,05	6,55	
PJS	49	0,47	0,22	0,84	0,89	0,95	1,13	2,53	7,33	8,68	8,74	8,76	8,45	
NFSC	2	0,39	0,06	0,61	0,50	0,63	0,66	1,03	2,04	3,39	4,41	5,44	5,90	
SNAL	3	1,38	0,40	0,30	0,83	0,67	1,41	1,53	2,29	2,83	4,63	5,24	5,50	
VJS	1	0,52	0,59	0,70	0,70	0,84	0,89	1,34	2,28	3,63	4,34	4,89	5,19	
ILM	18	1,24	1,10	1,11	1,43	1,43	1,44	4,36	6,88	9,33	10,26	9,59	9,35	
MCSF	2	0,66	0,83	0,83	0,68	0,91	0,84	1,00	1,98	2,70	3,14	3,59	3,83	
FAM	0	0,75	1,24	1,03	0,66	0,70	0,44	0,76	2,06	3,01	2,01	4,50	4,63	
A AGC	0	0,75	0,74	1,10	0,86	0,81	1,19	1,28	2,28	3,06	3,68	4,25	4,41	

APÊNDICE 7

Tabelas dos testes de MANN-WHITNEY analisando os 3 grupos, Controle, lúpus em atividade e lúpus sem atividade, comparados dois a dois.

Tabela 21- Análise da liberação de ânion SO pelos polimorfoneutrófilos espontâneos nos respectivos momentos do ensaio comparando o grupo controle com o grupo lúpus sem atividade.

	PME00	PME05	PME15	PME25	PME45	PME60
Mann-Whitney	153,50	159,50	167,50	256,00	134,00	154,50
Wilcoxon W	258,50	264,50	287,50	376,00	239,00	274,50
Z	- 2,025	- 1,781	- 2,011	-0,138	- 2,457	- 2,287
p	0,043	0,075	0,044	0,891	0,014	0,022

(p significante < 0,05)

Tabela 22- Análise da liberação de ânion SO pelos polimorfoneutrófilos espontâneos nos respectivos momentos do ensaio comparando o grupo Controle com o grupo lúpus em atividade.

	PME00	PME05	PME15	PME25	PME45	PME60
Mann-Whitney	139,00	113,50	91,00	99,50	131,50	123,00
Wilcoxon W	175,00	708,50	721,00	729,50	167,50	159,00
Z	-0,031	- 0,721	- 1,063	- 1,264	- 0,265	- 0,531
p	0,975	0,471	0,288	0,206	0,791	0,596

(p significante < 0,05)

Tabela 23- Análise da liberação de ânion SO pelos polimorfoneutrófilos espontâneos nos respectivos momentos do ensaio comparando o grupo lúpus sem atividade com o grupo lúpus em atividade.

	PME00	PME05	PME15	PME25	PME45	PME60
Mann-Whitney	38,143,0	161,002	24,50	41,00	37,00	44,00
Wilcoxon W	143,00	126,00	144,50	161,00	142,00	164,00
Z	- 1,229	- 2,389	- 1,975	- 1,226	- 1,298	- 1,033
p	0,219	0,017	0,048	0,220	0,194	0,302

(p significante < 0,05)

Tabela 24- Análise da liberação de ânion SO pelos polimorfoneutrófilos ativados nos respectivos momentos do ensaio comparando o grupo Controle com o grupo lúpus sem atividade.

	PMA00	PMA05	PMA15	PMA25	PMA45	PMA60
Mann-Whitney	95,00	72,00	102,50	135,00	131,00	84,00
Wilcoxon W	560,50	507,00	567,50	600,00	197,00	150,00
Z	- 2,045	- 2,651	- 1,839	- 0,883	- 1,001	- 2,383
p	0,041	0,008	0,066	0,377	0,317	0,017

(p significante < 0,05)

Tabela 25- Análise da liberação de ânion SO pelos polimorfoneutrófilos ativados nos respectivos momentos do ensaio comparando o grupo Controle com o grupo lúpus em atividade.

	PMA00	PMA05	PMA15	PMA25	PMA45	PMA60
Mann-Whitney	67,00	49,00	89,00	95,00	59,00	43,00
Wilcoxon W	532,00	484,00	554,00	123,00	87,00	71,00
Z	- 1,474	- 2,099	- 0,620	- 0,388	- 1,784	- 2,404
p	0,141	0,036	0,535	0,698	0,074	0,016

(p significante < 0,05)

Tabela 26- Análise da liberação de ânion SO pelos polimorfoneutrófilos ativados nos respectivos momentos do ensaio comparando o grupo lúpus sem atividade com o grupo lúpus em atividade.

	PMA00	PMA05	PMA15	PMA25	PMA45	PMA60
Mann-Whitney	31,00	34,00	28,00	20,00	24,00	28,00
Wilcoxon W	59,00	62,00	56,00	48,00	52,00	56,00
Z	- 0,680	- 0,408	- 0,951	- 1,675	- 1,313	- 0,951
p	0,497	0,684	0,342	0,094	0,189	0,342

(p significante < 0,05)

Tabela 27- Análise da liberação de ânion SO pelos monócitos espontâneos nos respectivos momentos do ensaio comparando o grupo Controle com o grupo lúpus sem atividade.

	MOE00	MOE05	MOE15	MOE25	MOE45	MOE60
Mann-Whitney	139,00	89,00	98,00	103,50	87,00	149,00
Wilcoxon W	230,00	180,00	189,00	194,50	207,00	269,00
Z	- 1,951	- 3,062	- 2,926	- 2,795	- 3,645	- 2,300
p	0,051	0,002	0,003	0,005	0,000	0,021

(p significante < 0,05)

Tabela 28- Análise da liberação de ânion SO pelos monócitos espontâneos nos respectivos momentos do ensaio comparando o grupo Controle com o grupo lúpus em atividade

	MOE00	MOE05	MOE15	MOE25	MOE45	MOE60
Mann-Whitney	114,50	115,50	125,00	132,50	117,00	112,50
Wilcoxon W	150,50	151,50	720,00	727,50	153,00	148,50
Z	- 0,689	- 0,543	- 0,352	- 0,112	- 0,609	- 0,753
p	0,491	0,587	0,724	0,911	0,543	0,452

(p significante < 0,05)

Tabela 29- Análise da liberação de ânion SO pelos monócitos espontâneos nos respectivos momentos do ensaio comparando o grupo lúpus sem atividade com o grupo lúpus em atividade

	MOE00	MOE05	MOE15	MOE25	MOE45	MOE60
Mann-Whitney	45,00	37,00	23,00	33,00	25,00	43,00
Wilcoxon W	136,00	128,00	114,00	124,00	145,00	163,00
Z	- 0,507	- 1,086	- 2,101	- 1,376	- 2,259	- 1,098
p	0,612	0,277	0,036	0,169	0,024	0,272

(p significante < 0,05)

Tabela 30- Análise da liberação de ânion SO pelos monócitos ativados nos respectivos momentos do ensaio comparando o grupo Controle com o grupo lúpus sem atividade.

	MOA00	MOA05	MOA15	MOA25	MOA45	MOA60
Mann-Whitney	223,00	195,00	217,00	244,00	208,50	180,00
Wilcoxon W	818,00	756,50	812,00	839,00	328,50	300,00
Z	- 0,340	- 1,157	- 0,824	- 0,239	- 1,009	- 1,627
p	0,734	0,247	0,410	0,811	0,313	0,104

(p significante < 0,05)

Tabela 31- Análise da liberação de ânion SO pelos monócitos ativados nos respectivos momentos do ensaio comparando o grupo Controle como grupo lúpus em atividade.

	MOA00	MOA05	MOA15	MOA25	MOA45	MOA60
Mann-Whitney	89,00	84,00	88,00	82,00	93,00	94,00
Wilcoxon W	684,00	625,00	661,00	677,00	688,00	689,00
Z	- 0,493	- 1,363	- 1,364	- 0,758	- 0,341	- 0,303
p	0,622	0,173	0,173	0,449	0,733	0,762

(p significante < 0,05)

Tabela 32- Análise da liberação de ânion SO pelos monócitos ativados nos respectivos momentos do ensaio comparando o grupo lúpus sem atividade com o grupo lúpus em atividade.

	MOA00	MOA05	MOA15	MOA25	MOA45	MOA60
Mann-Whitney	37,50	30,00	32,00	35,00	29,00	30,00
Wilcoxon W	142,50	150,00	152,00	155,00	149,00	150,00
Z	- 0,371	- 1,168	- 1,012	- 0 778	- 1,246	- 1,168
p	0,710	0,243	0,312	0,436	0,213	0,243

(p significante < 0,05)