UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

KARINA DE OLIVEIRA PELIÇARI

MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E LABORATORIAIS ASSOCIADAS À IL-17 NO LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO JUVENIL

Campinas

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

KARINA DE OLIVEIRA PELIÇARI

MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E LABORATORIAIS ASSOCIADAS À IL-17 NO LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO JUVENIL

Orientação: Profª Dra. Simone Appenzeller

Co-orientação: Profª Dra. Lilian Tereza Lavras Costallat

Co-orientação: Prof. Dr. Roberto Marini

Dissertação de mestrado apresentada à pós-graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, para obtenção do título de Mestra em Clínica Médica, área de concentração Clínica Médica

ESSE EXEMPLAR CORRESPONDE A VERSAO FINAL DA DISSERTACAO DEFENDIDA PELA ALUNA KARINA DE OLIVEIRA PELIÇARI E ORIENTADA PELA PROFª DRA. SIMONE APPENZELLER

_____

Campinas

2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARISTELLA SOARES DOS SANTOS – CRB8/8402
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

P363m

Peliçari, Karina de Oliveira, 1989-
Manifestações clínicas e laboratoriais associadas a IL-17 no lúpus eritematosos sistêmico juvenil / Karina de Oliveira Peliçari. -- Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador : Simone Appenzeller.
Coorientador : Lilian Tereza Lavras Costallat.
Coorientador : Roberto Marini.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Doenças autoimunes. 2. Citocinas. 3. Nefrite. I. Appenzeller, Simone. II. Costallat, Lilian Tereza Lavras, 1952-. III. Marini, Roberto. 1951. IV. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. V. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Clinical and laboratory manifestations associated to IL-17 in childhood-onset systemic lupus erythematosus.
Palavras-chave em inglês:
Autoimmune diseases
Cytokines
Nephritis
Área de concentração: Clínica Médica
Titulação: Mestra em Clínica Médica
Banca examinadora:
Simone Appenzeller [Orientador]
Manoel Barros Bértolo
Virgínia Paes Leme Ferriani
Data da defesa: 04-02-2013
Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

KARINA DE OLIVEIRA PELIÇARI

Orientadora PROFA. DRA. SIMONE APPENZELLER

MEMBROS:

1. **PROFA. DRA. SIMONE APPENZELLER** _____
2. **PROF. DR. MANOEL BARROS BÉRTOLO** _____
3. **PROFA. DRA. VIRGÍNIA PAES LEME FERRIANI** _____

Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas

Data: 04 de fevereiro de 2013

AGRADECIMENTOS

À Dra. Simone Appenzeller, pela orientação deste trabalho, agradeço por toda a dedicação, paciência e conselhos, com certeza, foram fundamentais para o meu amadurecimento científico e pessoal.

Ao Dr. Roberto Marini, pela prontidão em oferecer ajuda, tirar dúvidas e apoiar este trabalho, enriquecendo meu conhecimento.

Aos alunos e funcionários do laboratório, foi um privilégio dividir bancada, dúvidas, erros, acertos, conquistas, almoços, expectativas e sonhos com vocês!

À minha familia, por serem sempre imprecindíveis em todos os momentos da minha vida e por partilharem comigo os momentos de dúvidas, medos, ansiedades e principalmente por me ajudarem a supera-las, agradeço também por comemorarem comigo cada pequeno passo e pequena vitória, sempre me insentivando e inspirando.

Ao meu noivo, pelo carinho, compreensão e apoio, sempre me entendendo, até mesmo quando eu não sou capaz.

Aos voluntarios que participaram desta pesquisa, principalmente aos pacientes que foram realmente pacientes e compreensivos.

À FAPESP pelo apoio e incentivo financeiro, tornando possivel a realização deste trabalho.

"A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém pensou sobre aquilo que todo mundo vê"

(Arthur Schopenhauer)

ABREVIATURAS

aCL- Anti-cardiolipina

ACR - American College of Rheumatology

AIDS- Acquired immune deficiency syndrome

ANA- Anticorpo anti-nuclear

Anti-dsDNA - Anticorpos anti-DNA de fita dupla

Anti-Sm - Anticorpos anti-Smith

APC- células apresentadoras de antígenos

BAI- Inventário de ansiedade de Beck

BDI- Inventário de depressão de Beck

CDI- Inventário de depressão infantil

CMV- Citomegalovírrus

DNA- Ácido dexoxirribonucléico

DNT – Célula T duplo-negativo

ELISA- Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay

FAN - Fator anti-nuclear

FCM- Faculdade de Ciências Médicas

HC- Hospital de Clínicas

HLA- Antígeno leucocitário humano

IL- Interleucina

IL-17 – Interleucina 17

LA- Anticoagulante lúpico

LES - Lúpus eritematoso sistêmico

LES NP- Lúpus neuropsiquiátrico

LESj – Lúpus eritematosos sistêmico juvenil

mAb- Anticorpo monoclonal

NK – Natural Killer

NMDA- Anticorpos contra o receptor N-metil-d-aspartato

NP- Neuropsiquiátrico

PCR- Reação em cadeia da polimerase

PTX- Pentoxifilina

RM- Ressonância magnética

RNA- Ácido ribonucléico

RPM- Rotação por minuto

SLEDAI- Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index

SLICC/ACR (DI)- Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology Damage Index

SNC - Sistema nevoso central

SNP- Single-nucleotide polymorphism

TCLE- Termo de consentimento livre e esclarecido

Th – Célula T helper

UNICAMP- Universidade Estadual de Campinas

UV- radiação ultravioleta

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Critérios revisados para a classificação de LES_____18

Tabela 2: Manifestações neuropsiquiátricas segundo o ACR _____21

Tabela 3: Características demográficas e clínicas_____47

Tabela 4: Manifestações clínicas apresentadas pelos pacientes com LESj_____48

Tabela 5: Níveis de IL-17 em relação à manifestações clínicas_____50

Tabela 6: Níveis de IL-17 em relação à atividade da doença e dano comulativo_____51

Tabela 7: Níveis de IL-17 em relação à manifestações neuropsiquiátricas_____51

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Níveis de IL-17 nos grupos avaliados_____52

SUMÁRIO

Resumo 14

Abstract 15

1. Introdução 16

1.1 Definição 16

1.2 Epidemiologia do LES 16

1.3 Critérios classificatórios do LES 17

1.4 Manifestações clínicas 19

1.5 Apresentação clínica no LES juvenil 22

1.6 Patogênese 23

1.7 Interleucina 17 28

2. Justificativa 35

3. Hipótese 36

4. Objetivos 37

5. Pacientes e métodos 38

5.1 Tipo do estudo 38

5.2 Seleção de pacientes 38

5.3 Seleção de familiares de primeiro grau 38

5.4 Seleção de controles sadios 39

5.5 Termo de consentimento livre e esclarecido 39

5.6 Análise clínica-laboratorial 39

5.7 Análise de atividade e dano da doença 41

5.8 Manifestações do SNC 41

5.9 Tratamento 42

5.10 Investigação laboratorial 42

5.11 Análise estatística 45

6. Resultados 47

7. Discussão 53

8. Conclusões 56

9. Referências bibliográficas 57

10. Apêndice 81

10.1 Apêndice 1 81

10.2 Apêndice 2 85

RESUMO

Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é uma doença autoimune, crônica e mutissistêmica, caracterizada por períodos de atividade e remissão. Anormalidades hematológicas e imunológicas são comumente encontrados. A avaliação laboratorial, incluindo o perfil de citocinas, auxilia no diagnóstico e na determinação da atividade da doença. O presente estudo, de característica transversal, teve como objetivo avaliar os níveis de IL-17 em pacientes com LESj (início da doença ≤16 anos), familiares de primeiro grau e controles sadios e ainda elucidar sua associação com a atividade da doença, dados laboratoriais e de tratamento. Foram selecionados pacientes consecutivos com LESj acompanhados na Unidade de Reumatologia Pediátrica da UNICAMP entre 2009/2011. Manifestações clínicas, laboratoriais, atividade da doença [SLE Disease Activity Index (SLEDAI)], dano cumulativo [Lupus International Collaborating Clinics / American College of Rheumatology Damage Index (SDI)] e medicação em uso foram avaliados. Os transtornos de humor foram determinados através dos inventários de Depressão (BDI) e Ansiedade (BAI) de Beck. A dosagem da citocina foi realizada por ELISA. Níveis séricos de IL-17 estavam aumentados no LESj ($p \leq 0,05$) quando comparado controles sadios. Observamos uma associação entre os níveis séricos de IL-17 e migrânea ($p = 0,03$) e nefrite ($p = 0,01$). Níveis de IL-17 não foram associados com atividade da doença ($p = 0,32$), dano cumulativo ($p = 0,34$), medicação ($p = 0,63$), ansiedade ($p = 0,42$) e depressão ($p = 0,42$). Estudos longitudinais são necessários para determinar se a dosagem de IL-17 pode ser utilizado como um biomarcador em LESj.

ABSTRACT

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a chronic, multisistemic autoimmune disease, , characterized by periods of activity and remission. Haematological and immunological abnormalities are commonly observed. Laboratory evaluation, including the cytokine profile, aids in the diagnosis and determination of disease activity. The present transverse study, we aimed to evaluate levels of IL-17 in patients with childhood-onset SLE (cSLE) (disease onset ≤ 16 years), first-degree relatives and healthy controls and to determine the association between IL-17 levels and disease activity, laboratory data and treatment. We selected consecutive patients with cSLE followed at the Pediatric Rheumatology Unit at UNICAMP between 2009/2011. Clinical, laboratory, disease activity [SLE Disease Activity Index (SLEDAI)], cumulative damage [Systemic Lupus International Collaborating Clinics / American College of Rheumatology Damage Index (SDI)] and medication use were assessed. Mood disorders were measured using the Beck´s Depression Inventory (BDI) and Anxiety Inventory (BAI). Determination of cytokine levels was carried out by ELISA. Serum levels of IL-17 were increased in SLE ($p \leq 0.05$) when compared to healthy controls. An association was observed between serum IL-17 levels and migraine ($p = 0.03$) and nephritis ($p = 0.01$). IL-17 levels were not associated with disease activity ($p = 0.32$), cumulative damage ($p = 0.34$), medication ($p = 0.63$), anxiety ($p = 0.42$) and depression ($p = 0.42$). Longitudinal studies are needed to determine if serum IL-17 levels can be used as a biomarker in SLE.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Definição

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença autoimune, caracterizada pela produção de autoanticorpos que diversifica o leque de manifestações clínicas, atinge o tecido conjuntivo e consiste em periodos de atividade e remissão da doença (Sung, 2006; Dubois & Tuffanelli, 1964; West, 1994; Ruiz-Irastorza, 2001; Rahman & Isenberg, 2008; O´Neill, 2010).

1.2 Epidemiologia

O LES pode acometer ambos os sexos, porém, é predominante no sexo feminino, sendo em cerca de 90% dos casos onde surge geralmente durante a vida reprodutiva (Sato, 2006; Dubois & Tuffanelli, 1964; Siegel & Lee, 1973; Petri, 2002).

A prevalência do LES é de aproximadamente 0,1% na população geral (Siegel & Lee, 1973; Petri, 2002). Quanto às diferentes raças, observa-se a frequência de 1 para cada 250 mulheres negras nos Estados Unidos da América; 22,4 para cada 100.000 asiáticos e 10,3 para cada 100.000 caucasianos (Fessel, 1974; Hopkinson, 1994; Johnson, 1995; Alarcon, 2001; Petri, 2002; O'Neill, 2010). Entretanto, apresenta-se como uma doença rara entre os negros africanos (Molina, 1997; Molokhia, 2001). No Brasil, foi observado uma incidência maior entre caucasóides, principalmente na região sudeste do país (Chahade, 1995). Em um estudo realizado em Natal no Rio Grande do Norte, observou-se uma incidência de LES na população de 8,7/100.000/ano (Vilar, 2002).

Cerca de 15% a 20% dos diagnósticos de LES acontecem na infância (Hashimoto, 1987; Pande, 1993; Cervera, 1993; Costallat & Coimbra, 1994; Tucker,

1995; Rood, 1999; Carreño, 1999; Klein-Gitelman, 2002; Mok, 2005; Gómez, 2006; Tucker, 2008; Ramirez Gomez, 2008; Hoffman, 2009; Feng, 2010; Livingston, 2011). A idade para o diagnóstico de LES juvenil varia na literatura entre 14 e 18 anos (Appenzeller, 2005; Font, 1998; Hashimoto, 1987). Mais recentemente determinou-se que o pacientes com ínicio dos sintomas até 18 anos fossem considerados como LES juvenil (Silva, 2012). Nas crianças, a relação entre sexo feminino e masculino é de 1,4 a 5,8:1; nos adultos varia de 8:1 a 13:1; nos indivíduos de idade mais avançada, esta relação é de 2:1 (Hashimoto, 1987; Pande, 1993; Cervera, 1993; Costallat & Coimbra, 1994; Tucker, 1995; Press, 1996; Font, 1998; Rood, 1999; Marini, 1999; Carreño, 1999; Huemer, 2001; Klein-Gitelman, 2002; Huang, 2004; Mok, 2005; Gómez, 2006; Tucker, 2008; Ramírez Goméz, 2008; Hoffman, 2009 Feng, 2010; Livingston, 2011; Pineles, 2011).

1.3 Critérios classificatórios do LES

Não existem critérios de diagnósticos para o LES e, em pacientes com suspeita da doença, é imprescindível a exclusão de outras doenças, principalmente, infecciosas e neoplásicas. Existem sim, critérios classificatórios, que foram proposto em 1982 pelo Colégio Americano de Reumatologia (ACR), utilizados para uniformizar os trabalhos de pesquisa, contudo, muitas vezes, são utilizados para o diagnóstico. O paciente deve apresentar pelo menos quatro dos onze critérios, para ser fechado o quadro clínico (Tan, 1982; Hochberg, 1997). Estes critérios foram revisados em 1997, e o item "presença de células LE", constante do critério "alterações imunológicas", foi excluído, e o teste falso positivo para sífilis foi substituído pela presença de anticorpos antifosfolípides (Hochberg, 1997) (Tabela 1).

Tabela 1. Critérios revisados para a classificação de LES (Hochberg, 1997)

Critério	**Observações**
Rash malar	Lesão eritematosa fixa em região malar, plana ou em relevo.
Lesão discóide	Lesão eritematosa, infiltrada, com escamas queratóticas aderidas e tampões folicurares que evolui com cicatriz atrófica e discromia.
Fotossensibilidade	Exantema cutâneo como reação não-usual à exposição à luz solar.
Úlceras orais/ nasais	Úlceras orais ou nasofaríngeas, usualmente indolores.
Artrite	Não erosiva de 2 ou mais articulações
Serosite	Pleurite Pericardite
Doença renal	Proteinúria maior que 0,5 g/dia Cilindros
Envolvimento do sistema nervoso central (SNC)	Convulsão Psicose
Alterações hematológicas	Anemia hemolítica Leucopenia menor que 4.000/mm3 Linfopenia menor que 1.500/mm3 Plaquetopenia menor que 100.000 /mm3
Alterações imunológicas	Anticorpos Anti-dsDNA Anticorpos Anti-Sm Anticorpos antifosfolípide (anticardiolipina IgG/IgM; anticoagulante lúpico, VDRL falso positivo)
Anticorpos anti-nucleares (FAN)	Título anormal, em qualquer época e na ausência de drogas conhecidas por estarem associadas à sindrome do lúpus induzido por drogas

1.4 Manifestações clínicas

As manifestações clínicas são variáveis no LES, alguns pacientes apresentam desde o início, um caráter multissistêmico e em outros, apenas um órgão é envolvido. Esse fator depende do tipo de anticorpo presente e da resposta inflamatória gerada pelo organismo (Zonana-Nacach, 2007). portanto o curso da doença pode ser sistematicamente diferente entre os pacientes. O tratamento correto, e a detecção precoce pode minimizar permanentes ao paciente (Zonana-Nacach, 2007; Meinao, 1996).

Pacientes com LES podem apresentar sintomas como artrite e artralgias, lesões cutâneas, nefrite, lesões no SNC, fenômeno de Raynald, alterações hematológicas, porém, também podem apresentar sintomas não específicos como febre, alopécia, perda de peso e fadiga, que afeta a maior parte desses pacientes (Uppal, 2009).

As manifestações cutâneas são as mais comuns no LES, afetando até 90% dos pacientes. Observamos principalmente, rash malar, lesões discóides e fotossensibilidade, porém, outras manifestações são comumente observados, como alopécia, que é frequentemente transitória associada à atividade da doença, mas pode ocasionar cicatrizes quando associadas a lesões discóides. Úlceras orais recorrente, especialmente no palato mole é também uma característica de doença ativa. Outras manifestações incluem fluxo reduzido da glândula salivar e ocular, resultando em boca e/ou olhos secos, como resultado da síndrome de Sjögren secundária ao LES (Manson, 2006; Rahman & Isenberg 2008; Magalhães, 2003).

O comprometimento renal pode ocorrer em qualquer momento da doença, e afeta cerca de 30% dos pacientes, sendo uma das manifestações mais letais no LES. A nefrite lúpica é muitas vezes assintomática, porém pode ser identificada pela alteração no exame de urina, como, proteinúria (≥0,5 g/24 horas) e presença de sedimentos

urinários (hematúria, leucocitúria), além de achados histológicos (Barr, 2003; Rahman & Isenberg 2008; O'Neill, 2010).

O envolvimento do sistema nervoso central (SNC) pode ocorrer de 25% a 70% dos pacientes dependendo do critério dianóstico aplicado (Johnson, 1968; Ested, 1971; Feinglass, 1976; Adelmann, 1986; McCune, 1988; Joseph, 2007; Stojanovich, 2007; Harly, 2007; Bruns, 2006). As manifestações podem acontecer em qualquer período da doença, incluindo o primeiro sinal clínico do LES, os sintomas podem se apresentar em conjunto ou isoladamente, e pode estar associado ou não a outros sinais de atividade do LES (Ested, 1971; Feinglass, 1976; Adelmann, 1986; Muscal, 2010). As apresentações clínicas mais frequentes nos pacientes com LES são cefaléia (20-40%), disfunção cognitiva (10-20%), alterações de humor (10-20%), convulsões (7-10%), doenças cerebrovasculares (7-10%) e desordens de ansiedade (4-8%) (Bertsias, 2010).

As manifestações neuropsiquiátricas (NP) podem ser consideradas primários se diretamente relacionado ao LES em atividade no SNC ou sistema nervoso periférico (SNP), ou secundário, quando relacionados com o tratamento, infecções, alterações metabólicas anormalidades ou outras manifestações sistêmicas, tais como uremia e hipertensão (Johnson RT, Richardson, 1968).

A dificuldade no diagnóstico consiste na distinção entre alterações neurológicas causadas pelo LES e anormalidades imunológicas tendo papel preponderante eventos secundários, como complicações da hipertensão arterial sistêmica (HAS), distúrbios de coagulação, distúrbios metabólicos, infecção severa, corticoterapia e arterosclerose (ACR, 1999). Em 1999, o ACR elaborou um consenso para a terminologia e definição das síndromes NP que ocorrem no LES (ACR, 1999), com a participação de reumatologistas, neurologistas, psiquiatras, entre outros, e definiu 19 síndromes mais prevalentes (Tabela 2). Estes critérios foram posteriormente validados apresentando

uma sensibilidade de 91% e especificidade de 46% (Ainiala, 2001). A baixa especificidade se deu devido à presença de ansiedade, cefaléia, depressão leve, distúrbio cognitivo leve e polineuropatia não confirmada por eletroneuromiografia (Ainiala, 2001). Quando estas manifestações foram excluídas, observou-se uma especificidade de 93% (Ainiala, 2001).

Tabela 2: Manifestações neuropsiquiátricas segundo o ACR (ACR,1999)

Sistema Nervoso Central	**Sistema Nervoso Periférico**
Meningite asséptica	Síndrome de Guillain-Barré
Estado confusional agudo	Disfunção autonômica
Ansiedade	Neuropatia craniana
Doença cerebrovascular	Mononeuropatia
Disfunção cognitiva	Miastenia grave
Síndrome desmielinizante	Plexopatia
Cefaléia	Polineuropatia
Transtorno de movimento (Coréia)	
Transtorno do humor	
Mielopatia	
Psicose	
Convulsão	

Artralgia e mialgia acometem a maioria dos pacientes. Artrite afeta, geralmente as pequenas articulações da mão e não progride para erosões. A clássica "Artropatia de Jaccoud", embora não causando uma artrite destrutiva, pode resultar em deformidade e incapacidade funcional significativa (Manson, 2006; Rahman & Isenberg 2008).

Pacientes com LES que desenvolvem manifestações pulmonares, geralmente têm um quadro de pneumonite aguda, com baixa taxa de acometimento dentre os quadros pulmonares. Porém, a forma aguda pode ser cronificada. Outra manifestação seria o derrame pleural, onde o paciente relata dor torácica, porém, podendo ser diagnosticado com raios-X de tórax (Magalhães, 2003). Pleurite, causando dor no peito, tosse e falta de ar é a manifestação pulmonar mais comum no LES. Embora os sintomas possam estar relacionados diretamente à atividade da doença, embolia pulmonar deve ser sempre considerada, principalmente naqueles que têm anticorpos antifosfolípides positivos (Paran, 2004).

As alterações cardíacas mais comumentes descrina no LES são pericardite, miocardite, endocardite e as lesões coronarianas (Bulkley, 1975; Cervara, 1992; Doherty, 1985; Giunta, 1993). Diversos autoanticorpos são encontrados no LES, destacando-se entre estes, o ACL que têm sido associados à presença e patogênese das lesões cardíacas no LES (Cervara, 1992; Guinta, 1993; Nihoyannupoulos, 1990; Asherson, 1988)

1.5 Apresentação clínica no LES juvenil

O LES juvenil (LESj) (início da doença ≤16 anos) muitas vezes apresenta manifestações clínicas mais agudas e severas quando comparado ao LES de início adulto. Envolvimento renal (50% a 67%), neurológico (22-95%) e hematológico (77%), além de febre e linfadenopatia são mais frequentes em crianças quando comparado com ao LES de início adulto (Font, 1998; Carreño, 1999; Sibbitt, 2002; Brunner, 2008; Ramírez Gómez, 2008; Hoffman, 2009; Mina, 2010). Pleurite, presença dos anticorpos anti-Smith (anti-Sm), anti-Ro/SSA e anti-La/SSB têm similar frequência no LES de inicio adulto e juvenil (Font, 1998; Mina, 2010). Artrite, fotossensibilidade, lesões

discóides, por outro lado, são mais frequente observadas no LES de início adulto (Font, 1998, Hoffman, 2009; Carreño, 1999). Em relação à atividade da doença, pacientes juvenis têm uma doença significativamente mais ativa, não só no início da doença, mas também ao longo do tempo quando comparado com LES de início adulto (Tucker, 1995; Hersh, 2009).

A consciência ao fato de que o LES de início infantil é uma doença potencialmente fatal, e que o tratamento agressivo deve ser introduzido precocemente no curso da doença, pode melhorar significativamente a sobrevida dos pacientes LESj (Appenzeller, 2005).

1.6 Patogênese

A patogenia do LES deve-se, principalmente a lesões teciduais provocadas por reações imunológicas, ou seja, produção de auto-anticorpos e o clearance prejudicado a produção de corpos apoptóticos (Mok, 2003; Rahman, 2008; O'Neill, 2010). A etiologia do LES é parcialmente desconhecida, porém sabe-se que o LES pode ser desencadeado pela interação de diversos fatores como: genético, infeccioso, imunológico, hormonal e ambiental (Zonana-Nacach, 2007).

1.6.1 Susceptibilidade genética

A probabilidade de desenvolvimento do LES em gêmeos monozigóticos e dizigóticos é de 24-57% e 2-5%, respectivamente, indicando que a genética tem um papel importante na patogênese do LES (Rhodes , 2008; Muñoz, 2010). Genes do antígeno leucocitário humano (HLA), particularmente HLA-DRB1e HLA-DQB1 têm sido associados a susceptibilidade ao LES (Reveille 1991; Walport, 1982; Muchinechi , 1998; Gladman, 1999; Wakeland , 2001; Graham, 2002; Smikle, 2002; Farabosco, 2006; Graham, 2007; Fu, 2011). O perfil HLA-DRB1*0301 tem sido associado à

susceptibilidade em indivíduos latino-americanos (Fu, 2011). Análises sorológicas específicas mostram que tanto o HLA-DR3 como o HLA-DR2 também são fatores de risco (Fu, 2011). Já o HLA-DR3-DQ2 é um haplótipo que tem forte associação no desenvolvimento do LES em caucasianos (Fu, 2011).

Embora seja conhecida por ocorrer dentro de famílias, não houve ainda identificação de um gene como responsável. Apenas 10% dos LES, vão ter um parente próximo (pai ou irmão), que já tenha ou venha a desenvolver a doença; apenas 5% de filhos de pacientes com LES vão desenvolver o LES, porém, é comum em gêmeos idênticos; HLA: está associado com HLA-DR2 e HLA-DR3 (Zonana-Nacach, 2002).

1.6.2 Fatores ambientais

Sabe-se que fatores ambientais podem induzir ou agravar o LES como, por exemplo: luz ultravioleta (40 a 60% dos pacientes são fotossensíveis), alguns fármacos (como Hidralazina e a procainamida), dietas ricas em gorduras saturada, poluentes e cigarro (Crow, 1997).

Há evidências de que a exposição à radiação UV altera a química do DNA e sua localização, bem como a disponibilidade dos antígenos ribonucleiprotéicos (RNP) e Ro (Sontheimer, 1996). Outro fator ambiental envolvido é a exposição a determinados vírus como o Epstein-Bar (EBV) e citomegalovírus (CMV). Após o contato com esses vírus, ocorre um mecanismo chamado de mimetismo molecular entre os antígenos próprios e externos, seguido da ativação inespecífica de linfócitos T e B, resultando na liberação de auto-antígenos mais imunogênicos (Zandman-Goddard, 2008).

1.6.3 Sistema neuroendócrino

Anormalidades na função do hipotálamo e/ou hipófise contribuem para a patogênese do LES. Foi observado que alguns pacientes têm hiperprolactinemia e outros têm níveis inadequados do hormônio antidiurético (Chrousos, 1995).

1.6.4 Produção de auto-anticorpos

Os anticorpos anti-nucleares (ANA) são frequêntes em pacientes com LES, originalmente descritos em 1957 através de um ensaio de imunofluorescência com o tecido do fígado de roedores como substrato (Ippolito , 2011; Radic, 2011). Mais de 90% dos pacientes com LES têm ANA positivo. Valores de 1,80 ou maiores são aceitos como títulos significativos. Embora sensíveis estes auto-anticorpos não são específicos para o LES (Ippolito, 2011).

Anti-dsDNA é um auto-anticorpo altamente específico para o LES, presente em até 70% dos pacientes, mas em menos de 0,5% dos indivíduos sadios ou pacientes com outras doenças autoimunes (Isenberg, 1985; Ippolito, 2011). Entre os pacientes que têm títulos elevados de anti-dsDNA e doença clinicamente quiescente, 80% têm a doença que se torna clinicamente ativa dentro de 5 anos após a detecção de títulos elevados deste auto-anticorpo (Ng, 2006).

Aproximadamente 70% dos pacientes com lesões subagudas possuem anticorpo anti-Ro (SSA), que pode estar associado a anticorpos anti-La (SSB) (Castellino, 2007). O anti-Ro e o anti-La são imunoglobulinas específicas contra as proteínas do RNA, sendo que o anti-La normalmente coexiste com o anti-Ro, raramente sendo encontrado sozinho. Além disso, a presença de anti-Ro e anti-La, ou ambos durante a gravidez confere um risco de 1 a 2% maior de bloqueio cardíaco fetal (Buyon, 2003).

Os anticorpos anti-receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), NR2a e NR2b têm sido observados em pacientes com manifestações NP. Embora anticorpos anti-NR2 têm sido estudados em pacientes com LES, apenas anticorpos anti-NR2 no líquido cefalorraquidiano (LCR), e não no soro, estão associados com manifestações NP difusas no LES (Arinuma, 2008). Os anticorpos anti-receptores NMDA no LCR acometem o SNC independente de eventos trombóticos ou vasculite (DeGiorgio, 2001). Estes

anticorpos no LCR foram associados com manifestações NP em geral (Yoshio, 2006) e manifestações NP difusas (Arinuma, 2008); já no soro, foram descritas associações com distúrbio cognitivo (Omdal, 2005), depressão (Omdal, 2005), défcit de memória recente e de aprendizado (Omdal, 2005).

Proteína P ribossomal é um pentâmero composto por 3 fosfoproteínas diferentes, formando o monômero P0 e os dímeros P1 e P2. Ela desempenha um papel importante em todas as etapas da síntese protéica. A presença de anticorpos anti-P pode estar associada ao comprometimento do SNC (Tzioufas, 2000; Abdel-Nasser, 2008; Hirohata, 2007; Briani, 2009), rins (Hulsey , 1995; Chindalore , 1998; Monova, 2001) e/ou danos no fígado (Koren , 1993; Arnett , 1995; Koscec , 1997).

1.6.5 Hiperatividade de células B e T

Anormalidades imunológicas no LES incluem a hiperatividade funcional dos linfócitos T e B com grande produção de anticorpos policlonais autoreativos, deposição de complexos imunes no tecido conjuntivo, e outras alterações funcionais de linfócito natural Killer. A elevação de células B tem sido o principal mecanismo proposto para a geração de anticorpos anti-nucleares no LES (Tsao, 2001).

Por outro lado, a manutenção de uma resposta imune auto-agressiva é facilitada por alteração na função supressora e liberação da resposta humoral. Desconhecemos ainda quais dos múltiplos defeitos imunológicos são fundamentais como causa da doença e quais os secundariamente induzidos. Embora a participação da imunidade humoral seja evidente, acredita-se também na participação da imunidade celular na patogênese do LES (Tsao, 2001).

Os mecanismos de hiperatividade de células B e T envolvem a produção de autoantígenos, que está relacionada ao aumento da apoptose e ao *clearance* prejudicado de corpos apoptóticos fornecidos continuamente pelo dano tecidual. Um único antígeno

inicia uma resposta, mas na ausência do mecanismo de tolerância imunológica, a resposta imune torna-se ininterrupta, envolvendo mais células B e T com especificidade relacionada ao antígeno inicial, até que ambas sejam ativadas por antígenos múltiplos, muitos dos quais são antígenos próprios (Chan, 1999). Outro mecanismo importante sobre hiperatividade é a expressão aumentada de moléculas de superfície que participam da ativação de células em ambas as populações de células (células B e T) (Chan, 1999). Auto-anticorpos podem ativar células T e ajudam na sua diferenciação. O estímulo aumentado na diferenciação e maturação de células T leva a uma produção anormal de citocinas em pacientes com LES (Chan, 1999).

Embora vários grupos de pesquisa estudem a patogênese, poucos biomarcadores têm sido validados até o presente momento. Alguns autores consideram o anticorpo anti-DNAds ou diminuição de complementos como indicadores de atividade renal, embora não haja consenso sobre isto (Illei, 2004). A ausência de biomarcadores dificulta não somente a avaliação precisa de atividade de doença, mas também dificulta a identificação de pacientes com riscos de agudização e da ocorrência de lesão cumulativa em órgãos alvos (Chun, 2007).

As citocinas são proteínas de baixo peso molecular, produzidas por diferentes células do sistema imunológico inato e adaptativo (Yap, 2010). Elas mediam a ativação e regulação funcional do sistema imunológico através da ligação aos receptores de superfície celular, desempenhando um papel fundamental na diferenciação, maturação e ativação de várias outras células (Wozniacka, 2006; Yap, 2010).

No LES, o perfil de citocinas pode determinar alguns aspectos disfuncionais do sistema imunológico e o envolvimento de vários órgãos. O LES é uma doença heterogênea quanto à apresentação, gravidade da doença e resposta ao tratamento. Perfis

alterados de citocinas podem ser responsáveis por essas variações observadas na prática clínica (Yap, 2010).

As citocinas têm um papel importante na patogênese, na atividade do LES e na quebra da BHE (Kowal, 2006; Diamond, 2006; Kasama, 2008; Fragoso-Loyo, 2007). Um papel importante tem se dado na interação de células Th1/Th2. As principais citocinas associadas a imunidade celular (Th1) são IL-12, TNF alfa e interferon gama (IFN-g), enquanto que as IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 estão associadas com a produção de anticorpos e indução de imunidade humoral (Th2) (Lit, 2006; Lit, 2007). Anormalidades ou desbalanço entre a produção de citocinas tanto Th1 e Th2 estão associados com a patogênese no LES (Lit, 2006; Lit, 2007).

Mais recentemente foi identificado o Th17 é, portanto um terceiro subtipo independente de células T com um papel importante na proteção contra patógenos extracelulares (Bettelli, 2007). A seguir, descreveremos o papel da IL-17, um subproduto da célula Th17

1.7 Interleucina 17

A interleucina 17 (IL-17) é uma citocina pró-inflamatória potente produzida por linfócitos T ativados, sendo a célula Th17 seu produtor mais importante (Yap, 2010; Crispín, 2010; Korn , 2009).

A célula Th17 é o terceiro subtipo de célula Th e foi descoberta recentemente expandindo o paradigma Th1/Th2, a função primaria da célula Th17 está ligada a depuração de agentes patogênicos que não são adequadamente tratados por Th1 ou Th2 (Korn, 2009; Críspin 2010; Yap, 2010). No entanto, as células Th17 são indutores potentes da inflamação dos tecidos e têm sido associadas com a patogênese de muitas doenças autoimunes e condições inflamatórias (Korn, 2009).

As células Th17 são um subconjunto de linfócitos T CD4 + e são considerados como um distinto subconjunto de células T helper e se originam de células T näive, só apresentam um perfil de liberação de citocinas característica quando devidamente preparado por fatores de transcrição exclusivos (Yap, 2010; Crispin, 2010).

A combinação de IL-6 e factor de crescimento transformante (TGF) β foi mostrado para induzir a diferenciação de células T näive em células Th17 (Bettelli, 2006; Korn, 2009).

IL-17 é o membro fundador da família de citocinas IL-17, que inclui IL-17A (também chamado de IL-17), IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E (também chamado de IL-25), e IL-17F. IL-17E (ou IL-25), não é produzido pelas células Th17, mas é produzida por células Th2 (Korn, 2009).

Além de ser produzida por células Th17, tanto a IL-17A quanto IL-17F são também produzidas por uma variedade de tipos de células, incluindo células T, células NK γδ, células NK, neutrófilos e eosinófilos. Assim, IL-17 e IL-17F são citocinas efetoras, que são produzidos por células do sistema inato e adquirido, sugerindo uma função de ligação deste tipo de imunidade inata e adaptativa entre as respostas imunes (Korn, 2009).

A IL-17 representa um sistema de citocina único que pode estar envolvido num certo número de doenças inflamatórias, mas também em rejeição de transplantes e crescimento tumoral (Witowski, 2000). Esta citocina também desempenha um papel essencial na resposta imune contra bactérias e fungos (Críspin, 2010; Peck, 2010).

IL-17 também facilita a ativação das células T e infiltração nos tecidos por expressão da molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) e amplifica a resposta imune ao induzir a produção de IL-6, a prostaglandina E2, granulócito-macrófago estimulador

de colónias fator (GM-CSF), e fator estimulante de colônias de granulócitos (Crispín, 2010).

Várias citocinas importantes, incluindo a IL-6, IL-21 e IL-23 são de associação intimamente com IL-17 (Yap, 2010)

Mais recentemente foi verificado que a produção de IL-17 e IL-17F pode ser desencadeada por IL-23, uma citocina produzida por células dendríticas. Curiosamente, a IL-23 parece estimular a produção de IL-17, principalmente na memória, mas não células T näive (Witowski, 2010).

Tomados em conjunto, estes resultados sugerem a presença de um novo eixo T auxiliar funcional (IL-23/IL-17 eixo) que pode ser importante na patogênese de doenças autoimunes (Yap, 2010).

A IL-17 é uma interleucina nova e de grande influência no sistêma imunológico, estudos demonstram sua importancia na autimunidade, porém existem poucos estudos que avaliaram seu papel no LES.

1.7.1 IL-17 no LES

A IL-17 e outros Th17 foram frequentemente descritas como citocinas pró-inflamatória, devido à sua expressão em lesões de pacientes com doenças inflamatórias crônicas e a indução de outras citocinas pró-inflamatórias, tais como IFN-γ, IL-2 e estimulação de granulócitos e monócitos (Zhao, 2010).

As evidências indicam que a produção de IL-17 é anormalmente elevada em pacientes com LES (Rana, 2012; Chen, 2010; Wong, 2008; Dolff, 2010; Wong, 2009; Gigante, 2011). Os níveis aumentam de IL-17 no soro de pacientes com LES está correlacionado com a atividade da doença (Rana, 2012; Chen, 2010; Wong, 2008; Dolff, 2010; Wong, 2009; Gigante, 2011). Além disso, a frequência da produção de IL-17 é aumentado no sangue periférico de pacientes com LES (Críspin, 2010)

A IL-17 pode ter um papel importante na patogênese da nefrite lúpica através da indução de IgG, anti-dsDNA e superprodução de anticorpos e IL-6 expressas por células mononucleares do sangue periférico de pacientes com nefrite. Estudos confirmaram que a IL-17 pode promover a doença autoimune, induzindo a formação de centros germinais espontâneos. (Mok, 2010; Dolff, 2010; Dong, 2006; Crispín, 2008; Zhao, 2010)

Em adição à sua capacidade pró-inflamatória, IL-17 exerce os seus efeitos através do recrutamento de monócitos e neutrófilos pelo aumento da produção local de quimiocinas, e facilitação da infiltração de células T e a ativação por estimulação da expressão da molécula de adesão IL-1 (Nalbandian, 2009)

Um trabalho recente demonstrou que o aumento da produção de IL-17 é detectada em pacientes com LES é resultado da síntese excessiva de células T CD4 + e de expansão de CD3 + CD4 CD8 duplo negativos (DN) do grupo celulas T, além disso, foi demonstrado que a IL-17 e IL-23 pode ser detectada nos rins de pacientes com nefrite lúpica sugerindo que estas citocinas podem contribuir para a lesão renal (Pernis, 2009).

1.7.2 Estudos em modelos animais

Originalmente acreditava-se que o LES era dependente de IL-12, e assim, era mediado por Th1, no entanto, a relevação de que a IL-12 partilha uma subunidade, a p40, com uma citocina recentemente descoberta, a IL-23, e que esta nova citocina foi necessária para a indução da doença e assim houve a preparação para a investigação do Th17 em modelo animal (Perry, 2011; Cua, 2003; Murphy, 2003).

Mais Recentemente, várias linhas de pesquisa relataram aumento produção de IL-17 e as funções de Th 17 em modelos murinos de lúpus.

BXD2 é um dos 20 BXD recombinantes, modelo puro derivado de um cruzamento entre C57BL/6J (B6) e DBA/2J. Estes camundongos desenvolvem lúpus espontâneamente e dependente da idade síndrome semelhante ao LES denotado por produção de anti-DNA e autoanticorpos de fator reumatóide, assim como a esplenomegalia, a glomerulonefrite (GN) e artrite erosiva (Perry, 2011; Hsu, 2006, Mountz, 2005). BXD2 células T CD4 + têm reforçado o desenvolvimento de Th 17 e consequentemente aumentado o níveis séricos de IL-17 (Xie, 2011).

Além disso, a IL-17 secretadoras de células CD4+ foram demonstradas por localizar centros germinativos (CGs) no baço do BXD2 (Hsu, 2008). Esta resposta aumentada de IL-17 estava associada com o desenvolvimento de CG e maior estabilidade no baço BXD2, em comparação com os controles B6. Bem como, BXD2 tem aumentado a quantidade de IL-17R e células B, essas células B tem ambos um aumento basal e uma ativação de IL-17R induzida via NFκβ, resultando em um aumento de expressão do regulador da proteina de sinalização G (RGS) (Xie, 2010). As células B BXD2 foram mostrado ter uma reduzida resposta quimiostática de CXCL12 e CXCL13, especialmente na presença de IL-17 (Hsu, 2008; Xie, 2010). Este potencial aumento de células B acumularam a produção de CXCL12 e CXCL13, tais como áreas ricas em células dendríticas foliculares, é a causa provável da formação GC melhorada na espécie BDX2 (Cohen , 1991; Allen, 2007). Além disso, a produção simultânea de IL-17 por células Th 17 em CGs promove ainda mais a célula B acumulação e estabilidade CG (Hsu, 2008). Assim, a IL-17 tem um papel central na patogénese do LES, observada neste modelo (Perry, 2011).

O modelo MRL / lpr é um tipo clássico de lúpus espontâneo. Ela exibe uma desordem linfoproliferativa que se manifesta com a produção de autoanticorpos, GN, e acumulação de CD4-CD8-duplo-negrativo T (DNT) células na periferia (Cohen 1991;

Perry, 2011). MRL / lpr têm uma expansão massiva de células T duplos negativos que aumenta ao longo do desenvolvimento de um síndrome semelhante ao lúpus caracterizada pela produção de anticorpos anti-DNA, GN, e dermatite (Nalbandian, 2009)

Uma mutação em Fas é responsável pelo fenótipo lpr e é o principal contribuinte funcional da patogênese deste modelo (Adachi, 1993; Kono, 2006). Recentemente, foi demonstrado que as células deficientes em Fas DNT são capazes de produzir quantidades significativas de IL-17 (Zhang, 2009). As células IL-17 e DNT foram encontradas em biópsias de rins de pacientes com nefrite lúpica ativa. Estes dados adicionados a estudos anteriores que mostraram que células DNT pode proporcionar ajuda às células B e contribuem para o perfil anormal de autoanticorpos em pacientes com LES. Além disso, demonstrou-se que o soro de pacientes com LES contém níveis elevados não só de IL-17, mas também e de IL-23 (Zhang, 2009). Tomados em conjunto, estes resultados sugerem que um eixo IL-23/IL-17 anormalmente ativada pode estar contribuindo para a patogênese da nefrite lúpica (Kyttaris, 2010; Zhang, 2009).

O modelo do rato SNF1, derivado da F1 da Nova Zelândia, uma linhagem pura, desenvolve uma síndrome semelhante ao lúpus espontâneo que pode ser acelerado por imunização de peptídeos nucleosomal (Kaliyaperumal, 1996). Após a indução da doença, os autoanticorpos são produzidos, e GN com infiltração Th 17 é iniciado
(Kang, 2007). Curiosamente dose terapêuticas baixas de um peptido de histona derivada tolerogénico causou aumento de TGF-β e diminuição da expressão de IL-6 em célula dendrítica e resultou na melhoria da Treg funcional e uma redução na infiltração de Th 17 renal (Kang, 2007). O tratamento com anti-CD3 oral ou nasal também melhora a produção de autoanticorpos e nefrite, neste modelo, induzido por um

subconjunto de células T reguladoras e reduzindo a produção de IL-17 por células Th foliculares (Wu, 2008; Wu, 2009). Estes resultados indicam que terapias que regulam a homeostase Treg/Th 17 em favor de Treg pode ser eficaz em moderação patogênese do LES (Perry, 2011).

1.7.3 Estudos em humanos

Assim como nos modelos lúpus murino, a evidência de um papel importante da IL-17 no LES humano é também de considerável. Vários estudos recentes mostram que o IL-17 no plasma e IL-17 produtoras de células T são aumentadas em pacientes com LES (Mok, 2010; Crispín, 2008; Doreau, 2009; Shah, 2010; Wong, 2008; Chen, 2010). Além disso, atividade e gravidade da doenças estão associadas à produção aumentada de IL-17 (Doreau, 2009; Shah, 2010; Wong, 2008; Chen, 2010).

Estudos suportam um papel pró-inflamatório da IL-17 em pacientes com LES (Rana, 2012; Chen, 2010; Mok, 2010; Crispín, 2008; Wong, 2008; Dolff, 2010; Wong, 2009).

Em estudo recente com LESj, foi observado um aumento de IL-17 quando comparado com controles sadios e uma associação do aumento de IL-17 com manifestações cutâneas e hematológicas (Rana, 2012).

2. JUSTIFICATIVA

Existe apenas um estudo abordando o papel da IL-17 no LESj, portanto, observou-se que a IL-17 tem um papel importante no LES e que mais estudos são necessários para confirmação deste dado.

2. HIPÓTESES

1. Os níveis de IL-17 estão aumentado em pacientes com LESj em relação a controles saudáveis e familiares de primeiro grau.

2. Os níveis de IL-17 estão aumentados em familiares de primeiro grau comparados a controles saudáveis.

3. Níveis elevados de IL-17 estão associados a atividade da doença, manifestações clínicas, e laboratoriais e dano da doença.

4. OBJETIVOS

Determinar os níveis de IL-17 em pacientes e controles e correlacionar os níveis de IL-17 com manifestações clínicas e laboratoriais apresentadas pelos pacientes com LESj.

5. PACIENTES E MÉTODOS

5.1 Tipo do estudo

Trata-se de um estudo transversal, com grupo controle.

5.2 Pacientes

Foram selecionados pacientes consecutivos com LESj seguidos no ambulatório de Reumatologia Pediátrica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP cujas manifestações clínicas e laboratoriais foram rotineiramente estudadas de acordo com protocolo já estabelecido.

Critérios de inclusão

1. Foram incluídos pacientes com diagnóstico de LES segundo os critérios estabelecidos pelo ACR (Hochberg, 1997) e acompanhados rotineiramente nos ambulatórios de Reumatologia da UNICAMP
2. Pacientes com idade de início da doença ≤ 16 anos
3. Pacientes que tinham, no mínimo, 6 meses de acompanhamento nos ambulatórios de Reumatologia da UNICAMP

Critérios de exclusão

1. Foi excluido apenas um paciente que não concordou em participar da pesquisa.

5.3 Seleção dos familiares de primeiro grau

Este grupo foi constituído por familiares de primeiro grau dos pacientes com LESj já selecionados anteriormente. Os familiares de primeiro grau, acompanhantes

dos pacientes com LESj na visita clínica, foram convidados a participar do estudo após a consulta clínica e a coleta de sangue foi realizada no mesmo dia, não necessitando outras visitas ao HC/UNICAMP. Foram incluídos indivíduos sadios, sem infecção na data da coleta de sangue e sem histórico pessoal de doença autoimune.

5.4 Seleção dos controles sadios

O grupo controle foi constituído por voluntários sadios com idade e distribuição de gênero semelhante ao grupo de pacientes com LESj, que não apresentaram infecções na data da coleta de sangue e que concordaram em participar do projeto de pesquisa. Foram excluídos voluntários com doenças autoimunes e antecedentes familiares de doença autoimune. Os controles sadios foram recrutados após esclarecimento do projeto e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

5.5 Termo de consentimento livre e esclarecido

Todos os pacientes e voluntários foram previamente informados e assinaram o TCLE, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP (nº1021/2010).

5.6 Análise clínica-laboratorial

As variáveis clínicas, laboratoriais e o uso de medicações foram analisadas na inclusão do paciente no estudo, após os primeiros 6 meses de seguimento. Manifestações pregressas foram analisadas através da revisão do prontuário médico. Foram analisadas as seguintes manifestações clínicas, laboratoriais e de tratamento: presença de adinamia; emagrecimento (> 4 kg); febre (≥37,8° C); artrite (não erosiva em duas ou mais articulações periféricas, vista pelo médico); necrose asséptica

(documentada por radiografia simples, cintilografia ou ressonância magnética); deformidades articulares (geralmente redutíveis vistas pelo médico); eritema malar (eritema fixo sobre as eminências malares e/ou pregas naso-labiais); lesões discóides (placas eritematosas com descamação podendo ocorrer atrofia nas lesões antigas); alopécia; úlcera oral e/ou nasal (ulceração oral e/ou em nasofaringe, geralmente dolorosa, observadas por médico); fotossensibilidade (*rash* cutâneo resultado da exposição à luz solar, relatado na história clínica ou observada por médico); nefrite (definida pela presença de proteinúria maior que 0,5 g/l em 24 horas, aumento progressivo de creatinina sérica ou ainda alterações histopatológicas quando compatíveis com nefrite lúpica, segundo critérios da Organização Mundial de Saúde); hipertensão arterial: pressão sistólica maior que 130 mmHg e/ou pressão diastólica maior que 85 mmHg; síndrome nefrótica (proteinúria maior que 3 g/l em 24 horas); serosite (presença de pleurite, pericardite ou ambas documentada no exame clínico e por imagem); outras manifestações pulmonares como hipertensão pulmonar, pneumonite e hemorragia pulmonar; outras manifestações cardíacas como miocardite, endocardite própria do LES e infarto do miocárdio; miopatia (revelada por fraqueza muscular, alterações enzimáticas, alterações da biópsia muscular e /ou da eletromiografia).

Outros fatores avaliados foram: envolvimento intestinal, hepático, e do sistema retículo-endotelial, presença de tromboembolismo pulmonar e alterações oculares e a presença do fenômeno de Raynaud.

Tratamento prescrito no momento da retirada de sangue, bem como seus eventos adversos relacionados ao uso de drogas, foi analisado através da revisão dos prontuários. Doses orais e parenterais de corticosteróides foram analisadas e convertidas para o equivalente em doses de prednisona.

Os seguintes exames, solicitados rotineiramente no diagnóstico e monitoramento do LES foram realizados de acordo com as técnicas utilizadas no Laboratório de Patologia Clinica e no Laboratório de Investigação em Alergia e Imunologia/UNICAMP. Foram considerados: leucopenia (< 4000 células/mm3); linfopenia (<1500 cels/mm); anemia hemolítica (Coombs direto positivo); trombocitopenia (< 100000 cels/mm); FAN (por imunofluorescência indireta, positivo em títulos maiores que 1:80); anticorpo anti-dsDNA (por imunofluorescência indireta com *Crithidia luciliae* como substrato) (Harris, 1987); anticorpo anti-Sm (por imunodifusão dupla); anticorpo anti-cardiolipina (por método imunoenzimático); anticoagulante lúpico (por TTPA e Russel) (Brandt, 1995).

5.7 Análise da atividade de doença e dano

A atividade da doença foi avaliada pelo *Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index* (SLEDAI) e doença foi considerada ativa quando a somatória de pontos do SLEDAI foi igual e/ou superior a três pontos (Bombardier, 1992; Yee, 2011). O dano cumulativo foi avaliado através de um questionário especificamente desenvolvido para este fim, o *Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology Damage Index* (SLICC/ACR-DI) (Gladman, 1997). O SDI consiste em 38 itens e a pontuação pode variar de 0 a 47 pontos. Foi considerada a presença de dano se a pontuação foi igual e/ou superior a 1.

5.8 Manifestações do SNC

Todos os indivíduos completaram os Inventários de Ansiedade (BAI) (Beck, 1988; Cunha, 2001) e Depressão de Beck (BDI) (Beck, 1961; Cunha, 2001). Para pacientes com menos de 16 anos foi aplicado o Inventário de Depressão Infantil (CDI)

(Kovacs, 1985; Cunha, 2001). Essas escalas consistem em 21 itens, cada um descrevendo um sintoma comum a ansiedade/ depressão. O entrevistado foi convidado a avaliar o quanto ele ou ela foi incomodado por cada sintoma durante o mês passado em uma escala de 4 pontos variando de 0 a 3. Os itens são somados para obter uma pontuação total que pode variar de 0 a 63. Os valores de corte utilizados para o BDI/CDI são: 0-13: sem depressão / mínimo; 14-19: depressão leve; 20-28: depressão moderada e 29-63: depressão grave e para o BAI: 0-7: não / nível mínimo de ansiedade; 15/08: ansiedade leve; 16-25: ansiedade moderada; 26-63: ansiedade severa.

5.9 Tratamento

Foram consideradas as medicações prescritas na data da coleta da amostra sanguínea do paciente. As medicações consideradas foram prednisona, hidroxicloroquina e outras drogas imunossupressivas (azatioprina, ciclofosfamida, ciclosporina, metotrexato e micofenolato mofetil).

5.10 Investigação laboratorial

Foi coletado um total de 8 mL de sangue venoso de cada paciente, no centro de coleta, em conjunto com os exames de rotina solicitados regularmente para avaliação de atividade de doença. A coleta de sangue dos familiares/controles foi realizada em no mesmo dia da coleta do paciente.

As amostras de sangue, após coagulação em temperatura ambiente de 30 minutos, foram centrifugadas, aliquotadas e conservadas a –80°C, para posterior análise no Laboratório de Reumatologia FCM/UNICAMP.

Foram dosados os níveis de IL-17 pelo método de *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA), conforme previamente apresentado na literatura e descritos a seguir.

5.10.1 Técnica de ELISA

AMOSTRA: Soro; colhido em tudo seco com gel. Coagulação a temperatura ambiente durante 30 min. Centrifugação a 4000 rpm por 10 min.

PREPARO DE REAGENTES:

1. Solução de lavagem: Dilui-se 100 mL do concentrado em água destilada ou deionizada para um volume final de 1000 mL.
2. Substrato: Reconstituiu-se o substrato liofilizado com 6,0 mL de diluente de substrato, pelo menos, 10 minutos antes de usar. Tampou-se novamente o frasco e homogeneizar.
3. Reconstituiu-se o amplificador liofilizado com de 6,0 mL de diluente do amplificador, pelo menos 10 minutos antes de usar. Tampou-se novamente o frasco e homogeneizar.
4. Padrão: Reconstituiu-se o padrão com o volume de diluente Calibrador impressa no rótulo do frasco do padrão para produzir uma solução estoque. Agitou-se. Esta reconstituição produziu uma solução de 1X. Preparou-se 15 minutos antes das demais diluições.

    a. Usou-se tubos de polipropileno. Pipetou-se 500 µL de Calibrador Diluente cada tubo. Usou-se o estoque solução para produzir uma série de diluição (abaixo). Misturou-se cuidadosamente cada tubo antes da próxima transferência. O padrão diluído serviu de padrão elevado. Calibrador Diluente serviu como padrão zero (0 pg/mL).

PROCEDIMENTO:

1. Preparou-se todos os reagentes, amostras e padrões de trabalho, conforme indicado nas seções anteriores.
2. Definiu-se a quantidade necessária de tiras na microplaca. O excesso de tiras foi guardado na embalagem e fechada para posteriores análises.
3. Adicionou-se 50 µL de Diluente de amostra em todos os poços.
4. Adicionou-se 200 µL de padrão, amostra ou controle em cada poço. Cobriu-se com a fita adesiva fornecida. Incubou-se por 3 horas à temperatura ambiente.
5. Lavagem

   a. Removeu-se o líquido dos poços por aspiração ou invertendo a placa e descartando o conteúdo.

   b. Retirou-se o excesso de líquido, segurando firmemente a placa e batendo a placa invertida em toalha de papel limpa (5X).

   c. Encheu-se cada poço com 400 µL de tampão de lavagem usando multicanal automática.

   d. Removeu-se o líquido dos poços por aspiração ou invertendo a placa e descartando o conteúdo.

   e. Repetiu-se os passos b, c, d 5X para um total de seis lavagens. Após a última lavagem, bateu-se bem sobre o papel toalha para garantir eliminação completa do tampão de lavagem.
6. Adicionou-se 200 µL de Conjugado em cada poço. Cubriu-se com uma fita adesiva nova. Incubou-se por 2 horas à temperatura ambiente.
7. Repetiu-se a lavagem como no passo 5.

8. Adicionou-se 50 µL de substrato em cada poço. Cubriu-se com uma fita adesiva nova. Incubou-se durante uma 1hora à temperatura ambiente. Após incubação a placa não foi lavada.
9. Adicionou-se 50 µL de amplificador em cada poço. Cobriu-se com uma fita adesiva nova. Incubou-se durante 30 minutos em temperatura ambiente. Obs.: A adição de Amplificador iniciou o desenvolvimento da cor da solução. Após incubação a placa não foi lavada.
10. Adicionou-se 50 µL de solução de parada a cada poço. Adição de solução de parada não afetou a cor dos poços.
11. Determinou-se a densidade óptica de cada poço dentro de 30 minutos, usando uma leitora de microplacas ajustada para 490 nm.

5.10.2 Obtenção de resultados

Após obtenção da média das duplicatas (absorbância), foi subtraída a média do padrão zero. A curva padrão foi desenhada a partir da densidade óptica (absorbância) e as concentrações dos padrões já conhecidos. Os dados puderam ser linearizados por log/log.

Para determinar a concentração de cada citocina de cada amostra, primeiro, encontrou-se o valor da absorbância no eixo-y e estendeu-se uma linha horizontal para a curva padrão. No ponto de intersecção, estendeu-se uma linha vertical para o eixo-x e leu-se a concentração correspondente a citocina.

5.11 Análise estatística

As variáveis numéricas foram avaliadas pelo teste de Shapiro-Wilks para determinar a normalidade

Os resultados foram analisados através de teste não-paramétricos. O Teste *Kruskal-Wallis* foi usado para comparar os níveis das citocinas entre os 3 grupos, a correlação de *Spearman* foi usada para correlacionar as variáveis contínuas [níveis das citocinas e SLEDAI, SLICC/ACR (DI), BDI e BAI]. Para todas as análises, $p<0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

6. RESULTADOS

6.1 Dados demográficos

Foram incluídos 67 pacientes consecutivos com LESj. Sessenta e um (91,04%) eram do sexo feminino com idade mediana de 18 (intervalo 11-31). Tempo de duração doença foi de 5 anos (intervalo 0-26 anos).Cinquenta e cinco familiares de primeiro grau com idade mediana de 40 anos (intervalo 29-52) foram incluídos. O grupo controle foi constituído por 47 voluntários sadios (42 mulheres) com idade mediana de 19 (intervalo 6-30) (Tabela 3). Pacientes e controles tinham idade e sexo similar. Familiares de primeiro grau eram significativamente mais velhos conforme esperado ($p<0,05$).

Tabela 3: Características demográficas, clínicas e resultados

	Pacientes LESj N=67	**Familiares de pirmeiro grau N=55**	**Controle saudáveis N=47**
Sexo Feminino	61 (91.04%)	50 (90.90%)	42 (89.36%)
Idade atual (anos) (em mediana)	18 (intervalo 11-31)	40* (intervalo 29-52)	19 (intervalo 6-30)
Tempo de doença (anos) (em mediana)	5 (intervalo 0-25)	-----	-----
SLEDAI Doença ativa N=35 Doença inativa N=32 (em mediana)	4 (intervalo 0-24) 8 (intervalo 4-24) 0 (intervalo 0-2)	-----	-----
SDI (em mediana)	0 (intervalo 0-3)	-----	-----

Tratamento Sem medicação Com medicação	 6 (8.9%) 61 (91.1%)	-----	-----
IL-17 (pg/ml) (em mediana)	36.3* (17.36-105.92)	32.22 (18.93-88.54)	29.47 (15.16-62.17)

*$P \leq 0.05$

6.2 Características clínicas, laboratoriais e tratamento

No momento de entrada no estudo, 35 (52,2%) pacientes com LESj tinham doença ativa (SLEDAI ≥3), com pontuação mediana de SLEDAI de 8 (intervalo 4-24). Pacientes com doença inativa [N = 32 (47,7%)] tinham uma pontuação mediana de SLEDAI de 0 (intervalo 0-2). No dia da consulta os pacientes com LESj, apresentaram nefrite ativa (35,8%), *rash* malar novo (8,9%), alopécia (4,5%) e vasculite cutânea (4,5%) foram as manifestações clínicas mais frequentemente observadas (Tabela 4).

Tabela 4: Manifestações clínicas apresentadas pelo pacientes com LESj

Manifestações Clínicas	**Pacientes LESj N=67**
Alopécia	3 (4,5%)
Nefrite	24 (35,8%)
Rash Malar	6 (8,9%)
Serosite	3 (4,5%)
Vasculite	3 (4,5%)

No que diz respeito aos transtornos de humor e ansiedade, observamos que 16 (24%) pacientes apresentaram sintomas leves de ansiedade, 6 (9%) pacientes apresentaram sintomas moderados e 4 (6%) pacientes tinham sintomas graves de

ansiedade. Em relação a depressão, observamos que 5 (8%) pacientes tinham sintomas de depressão leve, 1 (1%) paciente foi considerado com sintomas moderados e 2 (3%) pacientes foram considerados como depressão severa.

Na data da coleta de sangue, 6 (9%) pacientes estavam sem qualquer medicação. Cinquenta e nove (88%) pacientes estavam em uso de prednisona, 38 (57%) hidroxicloroquina e 26 (39%) pacientes estavam em uso de outras drogas imunossupressoras (Tabela 3).

6.3 Dosagem dos níveis séricos de IL-17

A mediana do nível serológico de IL-17 foi de 36.3 (intervalo 17.36-105.92) pg/mL em pacientes LESj e 29.47 (intervalo 15.16-62.17) pg/mL, os níveis de IL-17 foram significativamente maiores em pacientes com LESj quando comparados a controles sadios (p=0,009). Não houve diferença significativa nos níveis de IL-17 entre pacientes e familiares de primeiro grau 32.22 (intervalo 18.93-88.54) pg/mL (p=0,41). Não observamos diferença significativa nos níveis de IL-17 entre familiares de primeiro grau e controles sadios (p=0,11) (Gráfico 1).

Os níveis de IL-17 estavam significativamente aumentados em pacientes LESj que apresentava migrânea no dia da coleta de sangue (p = 0,03), em pacientes com nefrite ativo (p = 0,01) e em pacientes com febre (p=0,05), porém apenas um paciente estava com febre no dia da coleta e não podemos dizer se está relacionado com a IL-17 .No entanto, os níveis de IL-17 não foram associados com a atividade da doença (p = 0,32), dano cumulativo (p = 0,34), medicação (p = 0,63), ansiedade (p = 0,42) e depressão (p = 0,42) (Tabela 5, 6 e 7).

Tabela 5: Níveis de IL-17 em relação as manifestações clínicas

Manifestações Clínicas	**Mediana**	**IQR**	***P***
Rash Malar			0,5
Sim (N=6)	37,11	10,28	
Não (N=61)	36,30	12,66	
Alopécia			0,1
Sim (N=3)	29,47	12,26	
Não (N=64)	36,30	12,26	
Manifestação Cutânea			0,2
Sim (N=8)	33,16	12,93	
Não (N=59)	36,30	12,78	
Febre			0,05*
Sim (N=1)	36,30	12,78	
Não (N=66)	31,52	12,10	
Nefrite			0,01*
Sim (N=24)			
Não (N=43)	36,86	16,41	
	21,31	11,60	
Vasculite			0,9
Sim (N=4)			
Não (N=63)	39,49	12,55	
	35,27	12,55	

*p≥0,05

Tabela 6: Níveis de IL-17 em relação a atividade da doença e dano cumulativo

Atividade /Dano	**Mediana**	**IQR**	**P**
SLEDAI			0,3
≥3 (N=35)			
<3 (N= 32)	34,91	13,48	
	36,30	13,89	
SDI			0,3
≥1 (N=22)			
<1 (N=45)	34,55	12,63	
	36,30	11,92	

Tabela 7: Níveis de IL-17 em relação a manifestações neuropsiquiátricas

Manifestação Neuropsiquiátrica	**Mediana**	**IQR**	**P**
BAI			0,4
Sim (N=26)			
Não(N=41)	36,86	10,90	
	38,05	11,67	
BDI			0,4
Sim (N=8)			
Não (N=59)	36,58	9,29	
	36,88	11,85	
Migrânea			0,03*
Sim (N=3)	36,58	13,55	
Não (N=64)	28,33	12,12	

*p≥0,05

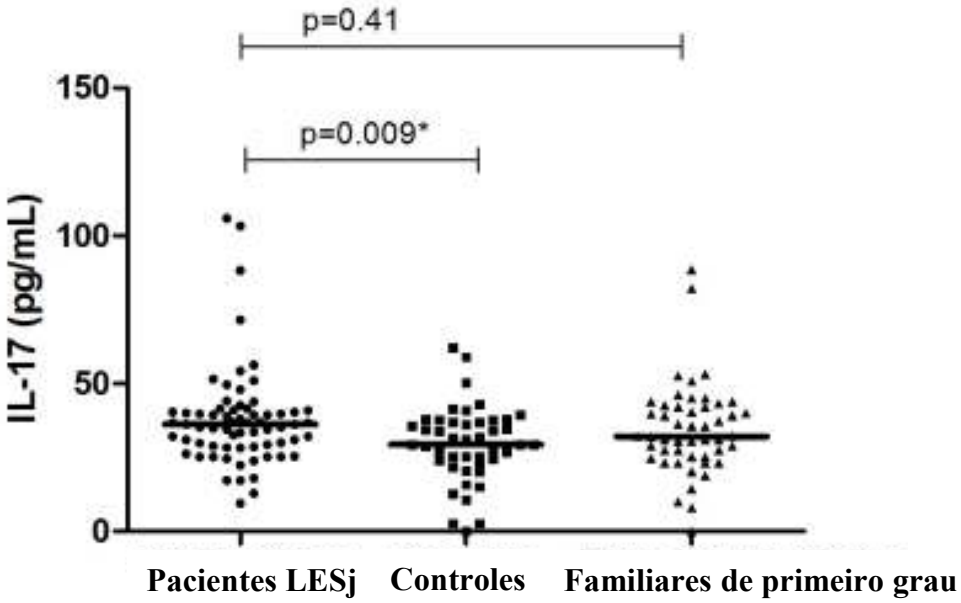

Gráfico 1: Níveis de IL-17 nos grupos avaliados

7. DISCUSSÃO

Th 17 foi identificado como novo subconjunto de células T e a IL-17 foi inicialmente descrita como um produto ativo de CD4 + memória de células T, as citocinas de assinatura secretadas pelas células Th17 incluem IL-17A, IL-17F, IL-21 e IL- 22 (Chen, 2010; Okada, 2012; Yap, 2010). Este conjunto de citocinas podem estimular os linfócitos B, e partir para inflamação local e lesão tecidual levando à patogênese do LES. Evidências que apoiam o papel da IL-17 na patogenia da LES são encontrados em estudos com humano e em modelo animal (Yap, 2010; Zhang,2009).

A IL-17 foi descrita com frequência como uma citocina pró-inflamatória, devido à sua expressão em lesões de pacientes com doenças inflamatórias crônicas e a sua indução da inflamação (Zhao, 2010; Mok, 2010).

Observamos um aumento do nível de IL-17 em pacientes LESj quando comparados com controles saudáveis. Nossos dados também corroboram alguns estudos em pacientes adultos com LES (Crispín, 2010; Chen, 2010; Zhao, 2010; Mok, 2010; Wong, 2008; Dolff, 2010; Wong, 2009; Gigante, 2011). Outro estudo que utilizou apenas os pacientes com LESj também encontrou um aumento no nível de IL-17 em pacientes comparados com controles saudáveis (Rana, 2012).

A associação entre os níveis de IL-17 e atividade da doença ainda é controversa. Enquanto alguns estudos observaram uma associação positiva (Rana, 2012; Chen, 2010, Wong, 2008; Dolff, 2010; Wong, 2009; Gigante, 2011),o nosso e outros estudos não observaram essa associação (Zhao, 2010; Mok 2010). Esta diversidade de resultados podem ser explicados pela heterogeneidade das manifestações clínicas e laboratoriais no LES, o tamanho diferente das amostras nos estudos citados acima e para variações no princípio e sensibilidade dos testes ELISA.

Detectamos níveis mais elevados de IL-17 em pacientes com LESj e nefrite. Nossos dados estão de acordo com estudos anteriores que sugerem que a IL-17 pode contribuir para a patogênese da lesão renal em pacientes com LES (Mok, 2010; Dolff, 2010; Dong, 2006). O suporte para o papel patogênico da IL-17, deriva do fato de que a IL-17 produtoras de células T foram observadas em rins de pacientes com nefrite lúpica (Crispín, 2008). IL-17 é produzida principalmente por células CD4 +, CD8 +, CD4-/CD8- e γ / δ células T e células Th17. Na nefrite lúpica humana, foi relatado que a IL-17 produtora células T migram para o rim e contribuir para o processo inflamatório (Mok, 2010; Crispín, 2008; Miyake, 2011). Por outro lado, um estudo recente com pacientes com LESj não observou uma associação entre a IL-17 e nefrite (Rana, 2012). Isto pode ser devido ao pequeno número de pacientes incluídos (Rana, 2012).

Estudos em modelos animais têm demonstrado que as células T que expressam IL-17 infiltram nos rins de pacientes com LES. Uma parte significativa destas células são CD3 + CD4-CD8- DNT (Zhang, 2009). Este estudo recente, mostrou que as células de DNT MRL / lpr expressam quantidades elevadas de IL-17 e que a doença piora progressivamente, a expressão do receptor IL-17 e da IL-23 em linfócitos destes ratos aumenta (Zhang, 2009).

Em outro estudo, foi observado que a IL-23R camundongos deficientes propensos lúpus C57BL/6-lpr/lpr apresentam diminuição do número de células CD3 + CD42CD82 e IL-17ª células produtoras nos gânglios linfáticos e produzem menos anti-DNA. O documento apresentado demonstra a importância da IL-23R na sinalização mediadas no desenvolvimento de nefrite lúpica e impelir a consideração dos biológicos apropriados para o tratamento da doença (Kyttaris, 2010).

Estudo recente demonstrou que as células Th17 reagem na barreira HE, autoantigenos, e manifesta uma maior capacidade de migração para o SNC parênquima

em comparação com outras subpopulações de células T, devido à sua capacidade de penetrar a barreira hematológica do cérebro (Okada, 2012). Envolvimento do SNC em pacientes LESj é frequentemente observada (Postal, 2011). Em nosso estudo, observamos uma associação entre aumento dos níveis de IL-17 e migrânea. Não há estudos na literatura que associa o aumento dos níveis de IL-17 com migrânea, no entanto, não há dados na literatura explorando esta associação no LESj até agora. Estudo anterior demonstrou uma associação entre transtornos de humor e IL-17, mas não observamos este achado em nosso estudo (Liu, 2012; Vieira, 2010). Em um estudo com pacientes com artrite reumatóide com níveis elevados de IL-17 foi demonstrado que em pacientes com ansiedade aumentada e os níveis de IL-17 foram independentemente associados com maior escore de ansiedade (Liu, 2012). Outro estudo que analisou os níveis de IL-17 em pacientes com transtornos de humor através de cultura de células, observaram nestes pacientes, os níveis de IL-17 era aumentados quando comparados aos controles saudáveis (Vieira, 2010).

Um recente estudo com LESj observou uma correlação entre os níveis de IL-17 e atividade da doença, manifestações cutâneas e hematológicas (Rana, 2012). Nós não observamos nenhum destes achados em nosso estudo. Isto pode ser explicado pela diversidade de manifestações do LES e diferença de amostras, ao passo que no nosso estudo tinham um maior número de pacientes

Como observado em estudos anteriores, não observamos diferenças em níveis de IL-17 de acordo com o uso ou não de medicamentos (Zhao, 2010; Cheng, 2009).

8. CONCLUSÕES

1. Níveis de IL-17 estão mais elevados em pacientes com LESj quando comparados com controles saudáveis. Não observamos diferença significativa nos níveis dos pacientes com LESj quando comparados com familiares de primeiro grau.

2. Níveis mais elevados de IL-17 associou-se a presença de migrânea e nefrite.

3. A IL-17 pode ser um biomarcador no LES, porém estudos longitudinais são necessários para determinar o seu papel no LESj

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdel-Nasser AM, Ghaleb RM, Mahmoud JA, Khairy W, Mahmoud RM. Association of anti-ribosomal P protein antibodies with neuropsychiatric and other manifestations of systemic lupus erythematosus. Clin Rheumatol. 2008;27(11):1377-85.

ACR Ad Hoc Committee on Neuropsychiatric Lupus Nomencalture. The American College of Rheumatology nomenclature and case definitions for neuropsychiatric lupus syndromes. Arthritis Rheum 1999;42:599–608.

Adachi M, Watanabe-Fukunaga R, Nagata S. Aberrant transcription caused by the insertion of an early transposable element in an intron of the Fas antigen gene of lpr mice. *Proceedings* of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1993; 90: 1756–1760.

Adelmann DC , Saltiel E, Klinenberg JR. The neuropsichiatric manifestations of SLE: an overview. Semin Arthr Rheum 1986:15:185-199.

Ainiala H, Hietaharju A, Loukkola J, et al. Validity of the new American College of Rheumatology criteria for neuropsychiatric lupus syndromes: a population-based evaluation. Arthritis Rheum. 2001; 45:419-23.

Alarcon GS. Of ethnicity race and lupus. Lupus. 2001; 10:594-596.

Allen CDC, Ansel KM, Low C, et al. Germinal center dark and light zone organization is mediated by CXCR4 and CXCR5. Nature Immunology. 2004; 5: 943–952.

Allen CDC, Okada T, Cyster JG. Germinal-center organization and cellular dynamics. Immunity. 2007; 27: 190–202.

Appenzeller S, Marini R, Costallat, LTL. Damage did not independently influence mortality in childhood systemic lupus erythematosus. Rheumatol Int. 2005; 25: 619–624.

Arinuma Y, Yanagida T, Hirohata S. Association of cerebrospinal fluid anti-NR2 glutamate receptor antibodies with diffuse neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum. 2008; 58:1130-5.

Arnett FC, Reichlin M. Lupus hepatitis: an under-recognized disease feature associated with autoantibodies to ribosomal P. Am J Med. 1995;99(5):465-72.

Asherson R, Lubbe W - Cerebral and valve lesions in SLE. Association with antiphospholipid antibodies. J Rheumatol 1988; 15: 539-43.

Barr RG, Selinger S, Appel GB, Zuniga R, et al. Prognosis in proliferative lupus nephritis: the role of sócio-economic status and race/ ethnicity. Nephrol Dial Transplant. 2003; 18:2039-46.

Bertsias GK, Boumpas DT. Pathogenesis, diagnosis and management of neuropsychiatric SLE manifestations. Nat Rev Rheumatol 2010; 6: 358-67.

Bettelli E, Korn T, Kuchroo VK.Th17: the third member of the effector T cell trilogy. Curr Opin Immunol. 2007; 6:652-7.

Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. Nature 2006; 441:235–38.

Briani C, Lucchetta M, Ghirardello A, Toffanin E, Zampieri S, Ruggero S, et al. Neurolupus is associated with anti-ribosomal P protein antibodies: an inception cohort study. J Autoimmun. 2009;32(2):79-84.

Bruns A, Meyer O.Neuropsychiatric manifestations of systemic lupus erythematosus. Joint Bone Spine. 2006;73:639-45.

Bulkley BH, Roberts WC - The heart in systemic lupus erythematosus and the changes induced in it by corticosteroid therapy. Am J Med 1975; 58: 243-64.

Buyon JP, Clancy RM. Maternal autoantibodies and congenital heart block: mediators, markers, and therapeutic approach. Semin Arthritis Rheum. 2003;33(3):140-54.

Carreño L, López-Longo FJ, Monteagudo I, Rodríguez-Mahou M, Bascones M, González CM, et al. Immunological and clinical differences between juvenile and adult onset of systemic lupus erythematosus. Lupus. 1999; 8: 287–92.

Castellino G, Corallini F, Trotta F, Secchiero P. Elevated levels of TRAIL in systemic lupus erythematosus are associated to the presence of anti-SSA/SSB antibodies. Lupus. 2007;16(7):479-82.

Cervera R, Font J, Paré C et al - Cardiac disease in systemic lupus erythematosus: prospective study of 70 patients. Ann Rheum Dis 1992; 51: 156-9.

Cervera R, Khamashta MA, Font J, Sebastiani GD, Gil A, Lavilla P, et al. Systemic lupus erythematosus: clinical and immunologic patterns of disease expression in a cohort of 1,000 patients. The European Working Party on Systemic Lupus Erythematosus. Medicine (Baltimore) 1993; 72:113–124.

Chahade WH, Sato EI, Moura JE Jr, Costallat LT, Andrade LE. Systemic lupus erythematosus in São Paulo/Brazil: a clinical and laboratory overview. Lupus. 1995; 4:100-3.

Chan OT, Madaio MP, Sholmchik MJ. The central and multiple roles of B cells in lupus pathogenesis. Immunol Rev. 1999; 169: 107-121.

Cheng F, Guo Z, Xu H, *et al.* Descreased plasma IL-22 levels, but not increased IL-17 and IL-23 levels, correlate with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. Ann Rheum Dis. 2009; 68:604-6.

Chindalore V, Neas B, Reichlin M. The association between anti-ribosomal P antibodies and active nephritis in systemic lupus erythematosus. Clin Immunol Immunopathol. 1998;87(3):292-6.

Chrousos GP. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. N Engl J Med. 1995;332:1351-62.

Chun HY, Chung JW, Kim HA, et al. Cytokine IL-6 and IL-10 as biomarkers in systemic lupus erythematosus. J Clin Immunol. 2007; 27:461-6

Crispín JC, Oukka M, Bayliss G, et al. Expanded double negative T cells in patients with systemic lupus erythematosus produce IL-17 and infiltrate the kidneys. J Immunol. 2008; 181:8761-8766.

Crispín JC, Tsokos GC. Interleukin-17-producing T cells in lupus. Rheumatology. 2010: 22:499-503.

Crispín JC, Tsokos GC. IL-17 in Systemic Lupus Erythematosus. Journal of Biomedicine and Biotechnology. 2010; 22: 1–4.

Cohen PL, Eisenberg RA. Lpr and gld: single gene models of systemic autoimmunity and lymphoproliferative disease. Annual Review of Immunology. 1991; 9: 243–269.

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

Crow MK, Fredman SM, Klipel JH, Dipper AP. Celular Immunology. Rheumatology. 1997; 6:1-7.

Cua J, Sherlock J, Chen Y, et al.Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. Nature. 2003; 421:744–748.

DeGiorgio LA, Konstantinov KN, Lee SC, Hardin JA, Volpe BT, Diamond B. A subset of lupus anti-DNA antibodies cross-reacts with the NR2 glutamate receptor in systemic lupus erythematosus. Nat Med. 2001; 7(11):1189-93.

Diamond B, Volpe BT.Antibodies and brain disease: a convergence of immunology and physiology. PLoS Med. 2006;3:e498

Doherty NE, Siegel RJ - Cardiovascular manifestations of systemic lupus erythematosus. Am Heart J 1985; 110: 1257-65.

Dolff S, Quandt D, Wilde B, *et al*. Increased expression of costimulatory markers CD134 and CD80 on interleukin-17 producing T cells in patients with systemic lupus erythematosus. Arthritis Res. Ther. 2010; 12:R150.

Dong C. Diversification of T-helper-cell lineages: finding the family root of IL-17 producing cells. Nat Rev. Immunol. 2006; 6:329-33

Dubois EL, Tuffanelli DL. Clinical manifestations of systemic lupus erythematosus. Computer analysis of 520 cases. JAMA. 1964; 190:104-11.

Estes D, Christian, CL. The natural history of systemic lupus erythematosus studied by prospective analysis. Medicine, 1971:50: 85-95.

Farabosco P, Gorman JD, Cleveland C, Kelly JA, Fisher SA, Ortmann WA, et al. Meta-analysis of genome-wide linkage studies of systemic lupus erythematosus. Genes Immun 2006;7:609–14.

Feinglass EJ, Arnett FC, Dorsh CA, Zizic TM, Stevens MB: Neuropsychiatric manifestations of systemic lupus erythematosus: diagnosis, clinical spectrum and relationship to the other features of the disease. Medicine 1976; 55:323-339.

Feng JB, Ni JD, Yao X, Pan HF, Li XP, Xu JH, et al. Gender and age influence on clinical and laboratory features in Chinese patients with systemic lupus erythematosus: 1,790 cases. Rheumatol Int. 2010; 30:1017–23.

Fessel EJ. Systemic lupus erythematosus in the community. Incidence, prevalence, outcome, and first symptoms; the high prevalence in black women. Arch Intern Med. 1974; 134:1027-35.

Fragoso-Loyo H, Richaud-Patin Y, Orozco-Narváez A, Dávila-Maldonado L, Atisha-Fregoso Y, Llorente L, Sánchez-Guerrero J.Interleukin-6 and chemokines in the neuropsychiatric manifestations of systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum. 2007;56:1242-5

Font J, Cervera R, Espinosa G, Pallarés L, Ramos-Casals M, Jiménez S, et al. Systemic lupus erythematosus (SLE) in childhood: analysis of clinical and immunological findings in 34 patients and comparison with SLE characteristics in adults. Ann Rheum Dis. 1998; 57:456–9.

Fu SM, Deshmukh US, Gaskin F. Pathogenesis of systemic lupus erythematosus revisited 2011: end organ resistance to damage, autoantibody initiation and diversification, and HLA-DR. J Autoimmun. 2011;37:104-12.

Giunta A, Picillob U, Maione S et al - Spectrum of cardiac involvement in systemic lupus erythematosus: echocardiography, echo-Doppler observations and immunological investigation. Acta Cardiol 1993; 48: 183-97.

Gladman DD, Urowitz MB, Darlington GA. Disease expression and class II HLA antigens in systemic lupus erythematosus. Lupus 1999;8:466–70.

Gómez J, Suárez A, López P, Mozo L, Díaz JB, Gutiérrez C. Systemic lupus erythematosus in Asturias, Spain: clinical and serologic features. Medicine (Baltimore) 2006; 85:157–68.

Graham RR, Ortmann W, Rodine P, Espe K, Langefeld C, Lange E, et al. Specific combinations of HLA-DR2 and DR3 class II haplotypes contribute graded risk for disease susceptibility and autoantibodies in human SLE. Eur J Hum Genet 2007;15:823–30.

Gigante A, Gasperini ML, Afeltra A, *et al*. Cytokines expression in SLE nephritis. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2011; 15:15-24.

Graham RR, Ortmann WA, Langefeld CD, Jawaheer D, Selby SA, Rodine PR, et al. Visualizing human leukocyte antigen class II risk haplotypes in human systemic lupus erythematosus. Am J Hum Genet 2002;71:543–53.

Hanly JG.New insights into central nervous system lupus: a clinical perspective. Curr Rheumatol Rep. 2007;9:116-24.

Hashimoto H, Tsuda H, Hirano T, Takasaki Y, Matsumoto T, Hirose S. Differences in clinical and immunological findings of systemic lupus erythematosus related to age. J Rheumatol. 1987; 14:497–501.

Herrmann M, Voll RE, Zoller OM, Hagenhofer M, Ponner BB, Kalden JR. Impaired phagocytosis of apoptotic cell material by monocyte-derived macrophages from patients with systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum. 1998;41:1241-50.

Hirohata S, Arinuma Y, Takayama M, Yoshio T. Association of cerebrospinal fluid anti-ribosomal p protein antibodies with diffuse psychiatric/neuropsychological syndromes in systemic lupus erythematosus. Arthritis Res Ther. 2007;9(3):R44.

Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 1997; 40:1725.

Hoffman IE, Lauwerys BR, De Keyser F, Huizinga TW, Isenberg D, Cebecauer L, et al. Juvenile-onset systemic lupus erythematosus: different clinical and serological pattern than adult-onset systemic lupus erythematosus. Ann Rheum Dis. 2009; 68:412–5.

Hopkinson ND, Doherty M, Powell RJ. Clinical features and race-specific incidence/prevalence rates of systemic lupus erythematosus in a geographically complete cohort of patients. Ann Rheum Dis. 1994; 53:675-80.

Hsu HC, Yang PA, Wang J, et al. Interleukin 17- producing T helper cells and interleukin 17 orchestrate 10 Arthritis autoreactive germinal center development in autoimmune BXD2 mice. *Nature Immunology*. 2008; 9:166–175.

Hsu HC, Zhou T, Kim H, et al. Production of a novel of class polyreactive pathogenic autoantibodies in BXD2 mice causes glomerulonephritis and arthritis. Arthritis and Rheumatism. 2006; 54: 343–355.

Huang JL, Yao TC, See LC. Prevalence of pediatric systemic lupus erythematosus and juvenile chronic arthritis in a Chinese population: a nation-wide prospective population-based study in Taiwan. Clin Exp Rheumatol. 2004; 22:776–80.

Huemer C, Huemer M, Dorner T, Falger J, Schacherl H, Bernecker M, et al. Incidence of pediatric rheumatic diseases in a regional population in Austria. J Rheumatol 2001; 28:2116–9.

Hulsey M, Goldstein R, Scully L, Surbeck W, Reichlin M. Anti-ribosomal P antibodies in systemic lupus erythematosus: a case-control study correlating hepatic and renal disease. Clin Immunol Immunopathol. 1995;74(3):252-6.

Illei G, Tackey E, Lapteva L, et al. Biomarkers in systemic lupus erythematosus. I. General overview of biomarkers and their applicability. Arthritis Rheum 2004; 50:1709–20

Ippolito A, Wallace DJ, Gladman D, Fortin PR, Urowitz M, Werth V, et al. Autoantibodies in systemic lupus erythematosus: comparison of historical and current assessment of seropositivity. Lupus. 2011;20:250-5.

Isenberg DA, Shoenfeld Y, Walport M, Mackworth-Young C, Dudeney C, Todd-Pokropek A, et al. Detection of cross-reactive anti-DNA antibody idiotypes in the serum of systemic lupus erythematosus patients and of their relatives. Arthritis Rheum. 1985;28(9):999-1007.

Johnson AE, Gordon C, Palmer RG, Bacon PA. The prevalence and incidence of systemic lupus erythematosus in Birmingham, England. Relationship to ethnicity and country of birth. Arthritis Rheum. 1995; 38:551–8.

Johnson RT, Richardson, EP. The neurological manifestations of systemic lupus erythematosus. Medicine. 1968; 47:337-369.

Joseph FG, Lammie GA, Scolding NJ.CNS lupus: a study of 41 patients. Neurology. 2007;69:644-54.

Kaliyaperumal A, Mohan C, Wu W, Datta SK. Nucleosomal peptide epitopes for nephritis-inducing T helper cells of murine lupus. Journal of Experimental Medicine. 1996; 183: 2459–2469.

Kang HK, Liu M, Datta SK. Low-dose peptide tolerance therapy of lupus generates plasmacytoid dendritic cells that cause expansion of autoantigen-specific regulatory T cells and contraction of inflammatory Th17 cells. Journal of Immunology. 2007; 178: 7849–7858, 2007.

Kasama T, Odai T, Wakabayashi K, Yajima N, Miwa Y.Chemokines in systemic lupus erythematosus involving the central nervous system. Front Biosci. 2008;13:2527-36

Klein-Gitelman M, Reiff A, Silverman ED. Systemic lupus erythematosus in childhood. Rheum Dis Clin North Am. 2002; 3:561-77.

Kono DH, Theofilopoulos AN. Genetics of SLE in mice. Springer Seminars in Immunopathology. 2006; 28: 83–96.

Koren E, Schnitz W, Reichlin M. Concomitant development of chronic active hepatitis and antibodies to ribosomal P proteins in a patient with systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum. 1993;36(9):1325-8.

Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 cells. Annual Review of Immunology. 2009; 27: 485– 517.

Koscec M, Koren E, Wolfson-Reichlin M, Fugate RD, Trieu E, Targoff IN, et al. Autoantibodies to ribosomal P proteins penetrate into live hepatocytes and cause cellular dysfunction in culture. J Immunol. 1997;159(4):2033-41.

Kowal C, Degiorgio LA, Lee JY, Edgar MA, Huerta PT, Volpe BT, Diamond B.Human lupus autoantibodies against NMDA receptors mediate cognitive impairment. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103:19854-9

Kyttaris VC, Zhang Z, Kuchroo KV, et al. Cutting Edge: IL:23 Receptor Deficiency prevents the development of Lupus Nephritis in C57BL/6-ipr/ipr Mice. J Immunol. 2010; 184:4605-9.

Levine JS, Koh JS. The role of apoptosis in autoimmunity: immunogen; antigen and accelerant. Semin Nephrology. 1999; 19: 34-47.

Lit LC, Wong CK, Tam LS, Li EK, Lam CW.Raised plasma concentration and ex vivo production of inflammatory chemokines in patients with systemic lupus erythematosus. Ann Rheum Dis. 2006;65:209-15

Lit LC, Wong CK, Li EK, Tam LS, Lam CW, Lo YM.Elevated gene expression of Th1/Th2 associated transcription factors is correlated with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. J Rheumatol. 2007; 34:89-96

Liu Y, Ho RC, Mak A. The role of interleukin (IL)-17 in anxiety and depression of patients with rheumatoid arthritis. Int J of Rheumatic Disease. 2012; 15:183-187.

Livingston B, Bonner A, Pope J. Differences in clinical manifestations between childhood-onset lupus and adult-onset lupus: a meta-analysis. Lupus. 2011;20:1345-55.

Magalhães MB, Donadi EA, Junior PL. Manifestações clínicas do lúpus eritematoso sistêmico: abordagem diagnóstica e terapêutica na sala de 61 urgência. Medicina Ribeirão Preto, Simpósio: Urgências e emergências imunológicas. 2003 36:409-417.

Manson JJ, Rahman A. Systemic lupus erythematosus. Orphanet J Rare Dis. 2006; 1-6.

Marini R, Costallat LT. Young age at onset, renal involvement, and arterial hypertension are of adverse prognostic significance in juvenile systemic lupus erythematosus. Rev Rheum Engl. 1999; 66:303-9.

McCune WJ, Golbus I Neuropsychiatric lupus. Rheum Dis Clin North Amer 1988; 14:149-166.

Meinao IM, Sato EL, Andrade LE, et al. Controlled trial whit chloroquine diphosphate in systemic lupus erythematosus. Lupus. 1996; 4:237-41.

Mevorach D. Clearance of dying cells and systemic lupus erythematosus: the role of C1q and the complement system. Apoptosis. 2010;15:1114-23.

Miyake K, Akahoshi M, Nakashima H. Th Subset balance in Lupus Nephritis. J Biomed Biotechnol. 2011; 980286.

Mok CC, Mak A, Chu WP, To CH, Wong SN. Long-term survival of Southern Chinese patients with systemic lupus erythematosus: a prospective study of all age-groups. Medicine (Baltimore). 2005; 84:218–24.

Mok, MY, Wu, HJ, Lo Y, Lau, CS. The relation of interleukin 17 (IL-17) and IL-23 to Th1/Th2 cytokines and disease activity in systemic lupus erythematosus. J Rheumatol. 2010; 37:2046-2052.

Molina JF, Molina J, García C, Gharavi AE, Wilson WA, Espinoza LR. Ethnic differences in the clinical expression of systemic lupus erythematosus: a comparative study between African-Americans and Latin Americans. Lupus. 1997; 6:63-7.

Molokhia M, McKeigue PM, Cuadrado M, Hughes G. Systemic lupus erythematosus in migrants from West Africa compared with Afro-Caribbean people in the UK. Lancet. 2001; 357:1414-5.

Monova D, Argirova T, Monov S. Antiribosomal P antibodies in patients with lupus glomerulonephritis. Clin Nephrol. 2001;55(5):425-6.

Mountz JD, Yang P, Wu Q, et al. Genetic segregation of spontaneous erosive arthritis and generalized autoimmune disease in the BXD2 recombinant inbred strain of mice. Scandinavian Journal of Immunology. 2005; 61: 128– 138, 2005.

Muchinechi SR, Persoli LB, Dutra SB, Lavras LT. HLA antigens and susceptibility to systemic lupus erythematosus in Brazilian patients. Rev Bras Reumatol 1998;38:332–6.

Muñoz LE, Janko C, Schulze C, Schorn C, Sarter K, Schett G, et al. Autoimmunity and chronic inflammation - two clearance-related steps in the etiopathogenesis of SLE. Autoimmun Rev. 2010;10:38-42.

Murphy A, Langrish CL, Chen Y, et al. Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. Journal of Experimental Medicine 2003; 198: 1951–1957.

Muscal E, Traipe E, de Guzman MM, Myones BL, Brey RL, Hunter JV. Cerebral and cerebellar volume loss in children and adolescents with systemic lupus erythematosus: a

review of clinically acquired brain magnetic resonance imaging. J Rheumatol. 2010;37:1768-75.

Nalbandian A, Crispín JC, Tsokos GC. Interleukin-17 and systemic lupus erythematosus: current concepts. Clin and Exp Immunology. 2009; 157:209-215.

Ng KP, Manson JJ, Rahman A, Isenberg DA. Association of antinucleosome antibodies with disease flare in serologically active clinically quiescent patients with systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum. 2006;55(6):900-4.

Nihoyannoupoulos P, Gomez PM, Joshi J, Loizou S, Walport MJ, Oakley CM Cardiac abnormalities in systemic lupus erythematosus. Association with raised anticardiolipin antibodies. Circulation 1990; 82: 369-75.

Okada, H, Khoury SJ. Type 17 T-Cell in Central Nervous System Autoimmunity and tumors. J Clin Immunol. 2012; 32:802-808.

Omdal R, Brokstad K, Waterloo K, Koldingsnes W, Jonsson R, Mellgren SI. Neuropsychiatric disturbances in SLE are associated with antibodies against NMDA receptors. Eur J Neurol. 2005; 12(5):392-8.

O'Neill S, Cervera R. Systemic lupus erythematosus. Best Pract Res Clin Rheumatol. 2010; 6:841-55.

Pande I, Sekharan NG, Kailash S, et al. Analysis of clinical and laboratory profile in Indian childhood systemic lupus erythematosus and its comparison with SLE in adults. Lupus. 1993; 2:83–7.

Paran D, Fireman E, Elkayam O. Pulmonary disease in systemic lupus erythematosus and the antiphospholpid syndrome. Autoimmun Rev. 2004;3(1):70-5.

Peck and E. D. Mellins, "Precarious balance: Th17 cells in host defense," Infection and Immunity. 2010; 78: 32–38.

Petri M. Epidemiology of systemic lupus erythematosus. Best Pract Res Clin Rheumatol. 2002; 16:847-58.

Perry D, Peck AB, Carcamo WC, et al. The current concept of Th17 cells and their expanding role in systemic lupus erythematosus. Arthritis. 2011; 810649.

Pineles D, Valente A, Warren B, Peterson M, Lehman T, Moorthy L. Worldwide incidence and prevalence of pediatric onset systemic lupus erythematosus. Lupus. 2011; 20:1187-92.

Postal M, Costallat LTL, Appenzeller S. Neuropsychiatric manifestations in systemic lupus erythematosus: epidemiology pathophysiology and management. CNS Drugs. 2011; 9:721-36.

Press J, Palayew K, Laxer RM, Elkon K, Eddy A, Rakoff D, et al. Antiribosomal P antibodies in pediatric patients with systemic lupus erythematosus and psychosis. Arthritis Rheum. 1996; 39: 671–6.

Radic M, Herrmann M, van der Vlag J, Rekvig OP. Regulatory and pathogenetic mechanisms of autoantibodies in SLE. Autoimmunity. 2011;44(5):349-56.

Rahman A, Isenberg DA. Systemic lupus erythematosus. N Engl J Med. 2008; 358:929-39.

Ramírez-Gómez LA, Uribe Uribe O, Osio Uribe O, Grisales Romero H, Cardiel MH, Wojdyla D, et al. Childhood systemic lupus erythematosus in Latin America. The GLADEL experience in 230 children. Lupus. 2008; 17:596–604.

Rana A, Minzi RW, Aggarwali R, *et al*. Gene expression of cytokines (TNF-a, IFN-c), serum profiles of IL-17 and IL-23 in pediatric systemic lupus erythematosus. Lupus. 2012; 0:1-8.

Rastin M, Hatef MR, Tabasi N, Mahmoudi M. The pathway of estradiol-induced apoptosis in patients with systemic lupus erythematosus. Clin Rheumatol. 2012; 31:417-24.

Reveille JD, Macleod MJ, Whittington K, Arnett FC. Specific amino acid residues in the second hypervariable region of HLAN DQA1 and DQB1 chain genes promote the Ro (SS-A)/La (SS-B) autoantibody responses. J Immunol 1991;146:3871–6.

Rhodes B, Vyse TJ. The genetics of SLE: an update in the light of genome-wide association studies. Rheumatology (Oxford) 2008;47:1603–11.

Rood MJ, ten Cate R, van Suijlekom-Smit LW, den Ouden EJ, Ouwerkerk FE, Breedveld FC, et al. Childhood-onset Systemic Lupus Erythematosus: clinical presentation and prognosis in 31 patients. Scand J Rheumatol. 1999; 28:222-6.

Ruiz-Irastorza G, Khamashta MA, Castellino G, Hughes GR. Systemic lupus erythematosus. Lancet. 2001; 357:1027-32.

Sato EL, Bonfá ED, Costallat LTL, et al. Lúpus eritematoso sistêmico: acomentimento cutâneo/ articular. Revista da Associação Médica Brasileira, 2006;52: 375-88.

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

Silva CA, Avcin T, Brunner HI. Taxonomy for systemic lupus erythematosus whit onset before adulthood. Art Care & Res. 2012; 64:1787-1793.

Smikle M, Christian N, DeCeulaer K, Barton E, Roye-Green K, Dowe G, et al. HLA-DRB alleles and systemic lupus erythematosus in Jamaicans. South Med J 2002;95:717–9.

Sontheimer RD. Photoimmunology of lupus erythematosus and dermatomyositis: a speculative review. Photochem Photobiol. 1996; 42: 583-94.

Stojanovich L, Zandman-Goddard G, Pavlovich S, Sikanich N.Psychiatric manifestations in systemic lupus erythematosus. Autoimmun Rev. 2007;6:421-6 .

Sultan SM, Begum S, Isenberg DA. Prevalence, patterns of disease and outcome in patients with systemic lupus erythematosus who develop severe hematological problems. Rheumatology (Oxford). 2003;42:230-4.

Sung YK, Park B L, Shin H D, et al. Interleukin-10 gene polymorphisms are associated with the SLICC/ACR Damage Index in systemic lupus erythematosus. Rheumatology, v. 45, p. 400-404, 2006.

Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum. 1982; 25:1271-7.

Tsao PB, Grossman JM. The genetics of human systemic lupus erithematosus. Current Rheumatology Reports. 2001;3:83-90.

Tucker LB, Menon S, Schaller JG, Isenberg DA. Adult- and childhood-onset systemic lupus erythematosus: a comparison of onset, clinical features, serology, and outcome. Br J Rhematol. 1995; 34:866–72.

Tucker LB, Uribe AG, Fernández M, Vilá LM, McGwin G, Apte M, et al. Adolescent onset of lupus results in more aggressive disease and worse outcomes: results of a

nested matched case-control study within LUMINA, a multiethnic US cohort (LUMINA LVII). Lupus. 2008;17:314-22.

Tzioufas AG, Tzortzakis NG, Panou-Pomonis E, Boki KA, Sakarellos-Daitsiotis M, Sakarellos C, et al. The clinical relevance of antibodies to ribosomal-P common epitope in two targeted systemic lupus erythematosus populations: a large cohort of consecutive patients and patients with active central nervous system disease. Ann Rheum Dis. 2000;59(2):99-104.

Uppal SS, Hayat SJ, Raghupathy R. Efficacy and safety of infliximab in active SLE: a pilot study. Lupus. 2009: 18;690-697.

Vieira MMM, Ferreira TB, Pacheco PAF, et al. Enhanced Th17 phenotype in individuals with generalized anxiety disorder. J of Neuroimmunology. 2010; 229:212-218.

Vilar MJ, Sato EL. Estimating the incidence of systemic lupus erythematosus in a tropical region (Natal, Brazil). Lupus. 2002; 11:528-32.

Xie S, Li J, Wang JH, et al. IL-17 activates the canonical NF-κB signaling pathway in autoimmune B cells of BXD2 mice to upregulate the expression of regulators of G-protein signaling 16. Journal of Immunology. 2010; 184:2289–2296.

Wakeland EK, Liu K, Graham RR, Behrens TW. Delineating the genetic basis of systemic lupus erythematosus. Immunity 2001;15:397–408.

Walport MJ, Black CM, Batchelor JR. The immunogenetics of SLE. Clin Rheum Dis, 1982, 8, 3-21.

West SG. Neuropsychiatric lupus. Rheum Dis Clin North Am. 1994; 20:129-58.

Witowski J, Pawlaczyk K, Breborowicz A, Scheuren A, Kuzlan-Pawlaczyk M, et al. IL-17 stimulates intraperitoneal neutrophil infiltration through the release of GROα chemokine from mesothelial cells. J. Immunol. 2010;165:5814–21.

Wong CK, Ho CY, Li EK, Lam CWK. Elevation of pro-inflammatory cytokine (IL-18, IL17, IL-12) and Th2 cytokine (IL-4) concentrations in patients with systemic lupus erythematosus. Lupus. 2009; 9:589-593.

Wong CK, Lit LCW, Tam LS, *et al.* Hyperproduction of IL-23 and IL-17 in patients with systemic lupus erythematosus implications for Th17 mediated inflammation in auto-immunity. Clinical Immunology. 2008; 127:385-393.

Wu HY, Center EM, Tsokos GC, Weiner HL. Suppression of murine SLE by oral anti-CD3: inducible CD4+CD25−LAP+ regulatory T cells control the expansion of IL-17+ follicular helper T cells. Lupus. 2009;18:586–596.

Wu HY, Quintana FJ, Weiner HL. Nasal anti-CD3 antibody ameliorates lupus by inducing an IL-10-secreting CD4+CD25−LAP+ regulatory T Cell and is associated with down-regulation of IL-17+CD4+ICOS+CXCR5+ follicular helper T cells. Journal of Immunology. 2008; 181: 6038–6050.

Yap DY, Lai KN. Cytokines and their roles in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus: from basics to recent advances. J Biomed Biotechnol. 2010; 2010:365083.

Yoshio T, Masuyama JI, Minota S, Kaneko N, Iwamoto M, Okazaki H, et al. A close temporal relationship of liver disease to antiribosomal P0 protein antibodies and central nervous system disease in patients with systemic lupus erythematosus. J Rheumatol. 1998; 25(4):681-8.

Zanana-Nacach A, Yanez P, Jiménez-Balderaz FJ, et al. Disease activity damage and survival in Mexican patients with acute severe systemic lupus erythematosus. Lupus. 2007; 16:997-1000.

Zandman-Goddard G, Berkun Y, Barzilai O, Boaz M, Ram M, Anaya JM, Shoenfeld Y. Neuropsychiatric lupus and infectious triggers. Lupus. 2008;17(5):380-4

Zhang Z, Kyttaris VC, Tsokos GC. The role of IL-23/IL-17 Axis in Lupus Nephritis. J Immunol 2009;183:3160-3169

Zhao XF, Pan HF, Yuan EH, *et al*. Increased serum interleukin 17 in patients whit systemic lupus erythematosus. Mol Biol Rep. 2010; 37:81-85.

10. Apêndice

10. 1 Apêndice 1

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

OBJETIVO DA PESQUISA:

Eu _____ entendo que fui convidado (a) a participar em um projeto de pesquisa envolvendo pacientes com lúpus eritematoso sistêmico juvenil. O objetivo geral do estudo é o de determinar a utilidade de exames específicos de sangue no Lúpus Eritematoso Sistêmico Juvenil e correlacionar as alterações encontradas à atividade da doença, a manifestações clínicas diversas como dor de cabeça e problemas de memória. A identificação e quantificação dessas anormalidades no cérebro, pode eventualmente melhorar o diagnóstico e levar a um melhor tratamento desta doença. As informações médicas a meu respeito que forem obtidas para esse estudo, poderão ser compartilhadas com outros pesquisadores que trabalham com diversos tipos de doenças reumatologicas, podendo, assim, ser utilizadas, eventualmente, para outros fins de pesquisa sobre Lúpus Eritematoso Sistêmico Juvenil. O sigilo será mantido em todos os estudos colaborativos através da utilização de um número de código para a identificação dos indivíduos participantes.

A coleta de sangue será realizada em um dos braços no dia da sua coleta de sangue no centro de coleta. É importante ter várias amostras ao longo de sua doença para comparar a atividade do lúpus.

PROCEDIMENTO:

Eu entendo que se concordar em participar desse estudo, os pesquisadores participantes farão perguntas a respeito dos meus antecedentes médicos e de minha família. Responderei a um questionário para avaliar a presença de depressão, ansiedade e qualidade de vida. Eu serei submetido a um exame físico, neurológico e um teste para diagnostico de distúrbios cognitivos para estabelecer meu estado clínico e cognitivo. Hospitalização não será necessária.

Uma amostra de sangue venoso será colhida (10 ml, o equivalente a uma colher de sopa) a cada visita ao ambulatório e na ocasião da sua coleta de sangue de rotina que são pedidos para cada visita no ambulatório de reumatologia. O sangue será identificado por um número e será congelado. Este estudo terá duração de 2 anos. Os exames poderão ser feitos durante um período máximo de 30 anos após a coleta. As células que por ventura forem isoladas do meu sangue serão preservadas para utilização durante todo o estudo e depois que ele se completar serão destruídas.

Não vai haver nenhuma forma de reembolso de dinheiro, já que com a participação na pesquisa você não vai ter nenhum gasto

VANTAGENS:

Eu entendo que não obterei nenhuma vantagem direta com a minha participação nesse estudo e que o meu diagnóstico e o meu tratamento provavelmente não serão modificados. Contudo, os resultados desse estudo podem, a longo prazo, oferecer vantagens para os indivíduos com Lúpus Eritematoso Sistêmico Juvenil, possibilitando um melhor diagnóstico e um tratamento mais adequado. Os resultados do meu exame de sangue ficarão a disposição dos médicos responsáveis pelo meu tratamento, e poderão ser úteis no futuro.

RISCO E DESCONFORTO:

Os riscos associados a coleta de sangue são mínimos, podendo ocorrer dor e manchas roxas (equimoses) no local da coleta do sangue. O desconforto será mínimo pois se trata de uma coleta de sangue geralmente da veia do braço que será realizada por profissional treinado e devidamente habilitado para realizar esse procedimento.

SIGILO:

Eu entendo que todas as informações médicas decorrentes desse projeto de pesquisa farão parte do meu prontuário médico e serão submetidos aos regulamentos do HC- UNICAMP referentes ao sigilo da informação médica. Se os resultados ou informações fornecidas forem utilizados para fins de publicação científica, nenhum nome será utilizado.

FORNECIMENTO DE INFORMAÇÃO ADICIONAL:

Eu entendo que posso requisitar informações adicionais relativas ao estudo a qualquer momento. A Dra Simone Appenzeller, tel (019) 3521-7372 estará disponível para responder minhas questões e preocupações. Em caso de recurso, dúvidas ou reclamações contactar a secretaria da Comissão de Ética da Faculdade de Ciências Médicas-UNICAMP, tel. (019) 3521-8942

RECUSA OU DESCONTINUAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO:

Eu entendo que a minha participação é voluntária e que eu posso me recusar a participar ou retirar meu consentimento e interromper a minha participação no estudo a qualquer momento sem comprometer os cuidados médicos que recebo atualmente ou receberei no futuro no HC- UNICAMP.

Eu confirmo que o(a) Dr(a)._____

me explicou o objetivo do estudo, os procedimentos aos quais serei submetido e os riscos, desconforto e possíveis vantagens advindas desse projeto de pesquisa. Eu li e compreendi esse formulário de consentimento e estou de pleno acordo em participar desse estudo.

_____HC:_____ Idade:_____

Nome do participante e responsável (se necessário)

_____ _____

Assinatura do participante ou responsável data

_____

Nome da testemunha

_____ _____

Assinatura da testemunha data

Telefone de contato:_____

Endereço:_____
_____

RESPONSABILIDADE DO PESQUISADOR:

Eu expliquei a _____ o objetivo do estudo, os procedimentos requeridos e os possíveis riscos e vantagens que

poderão advir do estudo, usando o melhor do meu conhecimento. Eu me comprometo a fornecer uma cópia desse formulário de consentimento ao participante ou responsável.

_____

Nome do pesquisador ou associado

_____ _____

Assinatura do pesquisador ou associado data

10.2 Apêndice 2

Interleukin 17 levels in childhood-onset systemic lupus erythematosus

Karina de Oliveira Peliçari, Mariana Postal, Nailú Angelica Sinicato, Fernando Augusto Peres, Roberto Marini, Lilian Tereza Lavras Costallat, Simone Appenzeller

Department of Medicine, Rheumatology Unit, Faculty of Medical Science, State University of Campinas

Department of Pediatrics, Pediatric Rheumatology Unit, Faculty of Medical Science, State University of Campinas

Running title: Interleukin-17 and childhood-onset systemic lupus erythematosus

Word count:

Keywords: Interleukin-17, Childhood-onset systemic lupus erythematosus

Grants: Fundação Amparo À Pesquisa Estado São Paulo-Brasil (FAPESP 2008/02917-0 and 2010/13636-2), Conselho Nacional Pesquisa Desenvolvimento-Brasil CNPq (300447/2009-4)

Correspondence to: Simone Appenzeller - Department of Medicine, Faculty of Medical Science, State University of Campinas, Cidade Universitária, Campinas SP, Brazil, CEP 13083-970; FAX: +55 19 3289-1818

Email: appenzellersimone@yahoo.com

Abstract

Objectives: To determine the sera IL-17 levels in childhood-onset systemic lupus erythematosus (cSLE) patients and to evaluate the association between IL-17 and clinical manifestations, disease activity, laboratory findings and treatment.

Methods: We included 67 consecutive cSLE patients [61 women; median age of 18 years (range 11-31)], 55 first-degree relatives [50 women; median age of 40 years (range 29-52)] and 47 healthy controls [42 women; median age of 19 years (range 6-30)] matched for age and sex. cSLE patients SLE patients were assessed for clinical and laboratory SLE manifestations, disease activity [SLE Disease Activity Index (SLEDAI)], cumulative damage [Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology Damage Index (SDI)] and current drug. Mood and anxiety disorders were determined through Beck Depression and Anxiety Inventory (BAI and BDI). Sera IL-17 levels were measured by enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) using commercial kits. Results: The mean sera IL-17 level was 36.3 (range 17.36-105.92) pg/mL in cSLE patients and 29.47 (range 15.16-62.17) pg/mL in healthy controls (p=0.009). We observed an association between sera IL-17 levels and migraine (p=0.03), and active nephritis (p=0.01). Sera IL-17 levels were not associated with disease activity (p=0.32), cumulative damage (p=0.34), medication (p=0.63), anxiety (p=0.42) and depression (p=0.42). Conclusion: IL-17 is increased in cSLE and may play a role in the pathogenesis of neuropsychiatric and renal manifestations. Longitudinal studies are necessary to determine the role of IL-17 in cSLE.

Introduction

Interleukin-17 (IL-17) is a potent pro-inflammatory cytokine produced by activated T lymphocytes (1). These Th17 cells are, in fact, a subset of $CD4^+$ T lymphocytes named after its hallmark cytokine IL-17 (2). It represents the prototype of a recently identified family of cytokines that comprises six members (IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E, IL-17F) and five receptors (IL-17RA, IL-17RB, IL-17RC, IL-17RD, IL-17RE) and the production of IL-17 is stimulated by IL-23 (3).

IL-17 promotes inflammation by inducing local secretion of chemokines and cytokines (4). It is essential for the clearance of certain pathogens, such as bacteria and fungi. Moreover, it has been linked to the instigation of immune mediated organ damage in the context of several autoimmune diseases (3). Evidence indicates that production of IL-17 is abnormal in patients with systemic lupus erythematosus (SLE) (4-9, 21,22). IL-17 levels are increased in SLE sera and correlate disease activity (9, 27, 28,29,30). In addition, it has been shown that the frequency of IL-17-producing T cells is increased in the peripheral blood of SLE patients (4,6).

SLE is a heterogenic autoimmune inflammatory disease (5, 7), characterized by a wide spectrum of clinical manifestations and abundant production of high titer autoantibodies directed towards nuclear autoantigens (8). Although the pathogenesis of SLE is not completely clear; genetic, environmental and hormonal factors play a key role in susceptibility and heterogeneous clinical manifestations (5).

Childhood-onset SLE (cSLE) has a clinically different phenotype than the adult onset disease (9). For instance, cSLE patients have increased involvement of the kidney and central nervous system (10). This could be due to an exaggerated proinflammatory cytokine milieu in cSLE (9). Its levels are increased in SLE sera and correlate with SLE

disease activity. Moreover, the frequency of IL-17-producing T cells is increased in the peripheral blood of patients with SLE. (4,6).

A recent study demonstrated increased sera IL-17 levels in cSLE patients compared to healthy controls. This study found an association of increased levels of IL-17 with active disease, cutaneous manifestations and hematological manifestations (9).

The aim of our study was to determine the sera IL-17 levels in cSLE patients, their first-degree relatives and healthy controls. In addition, we evaluated the association of IL-17 with disease activity, laboratory findings and treatment features.

Methods

Subjects

Sixty-seven consecutive cSLE patients followed at the Pediatric Rheumatology Unit of the State University of Campinas were invited to participate in this cross-sectional study. Patients were included in the present study if they: (i) fulfilled at least four of the American College of Rheumatology criteria (11), (ii) were younger than 16 years of age at disease onset, and (iii) had a follow-up duration of at least 6 months. Forty-seven first-degree relatives were included in this study. Fifty-five healthy controls without a history of any chronic disease (including personal history of autoimmune diseases) were included as control groups. The healthy controls were matched for age, sex and demographic background. This study was approved by the ethics committee at our institution, and informed written consent was obtained from each participant and/or legal guardian.

Clinical, laboratory and treatment features

The medical histories, clinical and serological features of each patient were taken from a special computer database. The variables included in this database are onset of disease (defined as the age at which the first symptoms clearly attributable to SLE occurred), age at diagnosis (defined as the age at which the patients fulfilled four or more of the 1982 revised criteria for the classification of SLE (12); and follow-up time, defined as the time from disease onset until July 2011.

All clinical manifestations and laboratory findings were recorded on the day of blood withdrawal. Active nephritis was diagnosed on the basis of renal items of the SLEDAI (proteinuria exceeding 0.5 g/L, abnormal urinary sediment, low complement levels). Nephrotic syndrome was defined as proteinuria in excess of 3 g/day. Hematological abnormalities were ascribed to lupus only in the absence of bone-

marrow suppression (leukopenia <4000 cells/mm^3, thrombocytopenia <100,000 cells/mm^3, and hemolytic anemia). We also assessed the presence of malar rash, discoid lesions, subacute cutaneous lesions, cutaneous vasculitis, photosensitivity, oral ulcers, arthritis, and serositis. Neurological and psychiatric involvement was defined according to the ACR guidelines (11).

The treatment prescribed at the time of blood withdrawal and any adverse events related to medication use were recorded. Doses of oral and parenteral corticosteroids were analyzed and converted to the equivalent doses of prednisone.

Antinuclear antibodies (ANA) were determined by indirect immunoflurescence using HEp-2 cells as substrate, and regarded as positive if higher than 1:40. Double-stranded DNA (dsDNA) antibodies were determined by indirect immunoflurescence using *Crithidia* as substrate and considered positive if higher than 1:10. Precipitating antibodies to extractable nuclear antigens (ENA), including Ro (SSA), La (SSB), and Sm were detected by a standardized enzyme-linked immunosorbentassay (ELISA) method, and considered positive if higher than 1:80. Rheumatoid factor (RF) was detected by nefelometry, and regarded as positive if higher than 10 UI/ml. Anticardiolipin antibodies (aCL) of the IgG and IgM isotypes were measured by ELISA method (13). The lupus anticoagulant (LA) activity was detected by coagulation assays in platelet-free plasma obtained by double centrifugation, following the recommendation of the subcommittee on LA of the Scientific and Standardization Committee of the International Society of Thrombosis and Homeostasis (14). These measurements were carried out twice, at an interval of 12 weeks.

Diseases Activity/ Cumulative Damage Evaluation

Disease activity was measured by the Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index (SLEDAI) (15). SLEDAI consists of 24 weighted items grouped into 9

domains, or organ systems. SLEDAI scores range between 0 and 105. Scores greater than 3 were considered active disease (16).

Cumulative SLE-related damage was determined in all patients using the Systemic Lupus International Collaborating Clinics (SLICC)/ACR Damage Index (SDI) at time of blood withdrawal. SDI score ranges from 0 to 47. Damage was considered if scores ≥ 1 (17).

Mood and anxiety evaluation

All subjects completed the Beck Depression Inventory (BDI) (18) and Beck Anxiety Inventory (BAI) (19) at study entry. For patients under sixteen years old, Children's Depression Inventory (CDI) was applied. These scales consist of 21 items, each describing a common symptom of depression/anxiety. The respondent is asked to rate how much he or she has been bothered by each symptom over the past month on a 4-point scale ranging from 0 to 3. The items are summed to obtain a total score that can range from 0 to 63. The cutoffs used for the BDI are: 0–13: no/minimal depression; 14–19: mild depression; 20–28: moderate depression; and 29–63: severe depression and for the BAI: 0-7: no/minimal level of anxiety; 8-15: mild anxiety; 16-25: moderate anxiety; 26-63: severe anxiety. The cutoff used for CDI was 17.

IL-17 assay

A blood sample was collected from all participants, centrifuged at 3000 rpm for 15 min after being allowed to clot for 30 min at room temperature. Separated sera were kept in aliquots at −80°C until the time of assay. None of the samples was taken during an episode of acute or chronic infection (20). Sera IL-17 levels were measured by ELISA, using commercially available kits from R&D Systems (London, UK), carried

out in accordance with the manufacturer's instructions. The detection range for IL-17 was 31.2–2000 pg/ml with a sensitivity of 15 pg/ml (human IL-17 kit).

Statistical analysis

Kruskal-Wallis **test** was used to compare cytokines levels between groups. Spearman's correlation was used to correlate continuous variables (e.g. cytokines levels and SLEDAI, SDI, BDI and BAI scores). Cytokine levels and categorical variables were compared by Mann–Whitney *U* test. We use the Systat 12 program to perform the statistics. The level of significance was set to $P<0.05$.

Results

Demographics

We included 67 consecutive cSLE patients. Sixty-one (91.04%) were female with a median age of 18 years (range 11-31). Disease duration was 5 years (range 0-26). We included 55 first-degree relatives with a median age of 40 years (range 29-52). The control group consisted of 47 healthy volunteers (42 women) with a median age of 19 (range 6-30). Patients and healthy controls were statistically comparable in terms of age and sex (Table 1).

Clinical, laboratory and treatment features

At the time of study entry, 35 (52.2%) cSLE patients had active disease (SLEDAI≤3) with median SLEDAI scores of 8 (range 4-24). Patients with inactive disease [N = 32 (47.8%)] had a median SLEDAI score of 0 [(range 0-2)]. Active nephritis (35.8%), new malar rash (8.9%), new alopecia (4.5%), cutaneous vasculitis (4.5%) and migraine (4.5%) were the most frequently observed clinical manifestations.

At the time of blood withdrawal, 6 (8.9%) patients were not taking any medication. Fifty-nine (88%) patients were receiving prednisone, 38 (57%) were receiving hydroxychloroquine, and 26 (39%) patients were receiving other immunosuppressive drugs.

With regard to mood and anxiety disorders, we found that 41 (61%) patients cSLE showed no anxiety symptoms, 16 (24%) had mild symptoms, 6 (9%) had moderate symptoms and 4 (6%) had severe symptoms anxiety. As for depression, we found that 59 (88%) patients cSLE showed no symptoms of depression, 5 (8%) were considered to have mild depression, 1 (1%) were considered moderate depression and 2 (3%) were considered depression severe

IL-17 Assay

The median sera IL-17 level was 36.3 (range 17.36-105.92) pg/mL in cSLE patients and 29.47 (15.16-62.17) pg/mL in healthy controls (p=0.009). There was no difference between the sera level of patients and first-degree relatives 32.22 (18.93-88.54) pg/mL (p=0.41). There was also no significant difference between healthy controls and first-degree relatives (p=0.11).

Sera IL-17 levels were significantly increased in cSLE patients with migraine (p=0.03) and in patients with active nephritis (p=0.01). However, sera IL-17 levels were not associated with disease activity (p=0.32), cumulative damage (p=0.34), anxiety (p=0.42) and depression (p=0.42). Sera IL-17 levels did not differ between patients with and without immunosuppressants (p=0.63). When analyzing each individual medication, we also did not observe any association.

Discussion

Recently, Th17 cell was identified as new T cell subset, the signature cytokines secreted by the Th17 cells include IL-17A, IL-17F, IL-21, and IL-22 (2,21,22). This array of cytokines can stimulate B lymphocytes, and set off local inflammation and tissue injury leading to the pathogenesis of SLE. Evidences supporting the role of IL-17 in SLE pathogenesis are found in human lupus and also in an animal model (2,23).

IL-17 and other Th17 cytokines have been most commonly described as a proinflammatory cytokine due to its expression in lesions of patients with chronic inflammatory diseases and its induction of inflammation (24,25). A significant fraction of the IL-17 produced in SLE patients derives from double negative (DN) TCR-αβ+CD4−CD8− T cells (26). DN T cells represent a small T cell subset in healthy individuals. These cells are expanded in peripheral blood of SLE patients and produce proinflammatory chemokines and cytokines including IL-17, IFN-γ, and IL-1β (26). We observe an increase in sera IL-17 levels in cSLE patients compared to healthy controls. Our data also corroborate some studies in adult SLE patients (6,21,24,25, 27). Another study using only cSLE patients also found an increase in IL-17 in patients compared with healthy controls (9).

Several studies observed increased IL-17 levels in SLE patients (9,21,27,28,29,30). The association between IL-17 levels and disease activity is still controversial (9, 21, 27, 28,29,30). Whereas some studies observed a positive association, our study corroborated with other studies that found no association between IL-17 levels and disease activity (24,25). This diversity of findings may be explained by the heterogeneity of clinical and laboratory manifestations in SLE, the different sample

size in the above mentioned studies and to variations in principle and sensitivity of the ELISA tests.

We detected higher levels of IL-17 in SLE patients with nephritis. Our data are in agreement with previous studies that suggest that IL-17 could contribute to the pathogenesis of kidney involvement in SLE patients (25,28,31). Support for their pathogenic role derives from the fact that IL-17-producing T cells have been observed in kidneys of patients with lupus nephritis (26). IL-17 is mostly produced by $CD4^+$, $CD8^+$, $CD4^-/CD8^-$, and γ/δ T cells, and Th17 cells. In human lupus nephritis, it was reported that IL-17 expressing T cells migrate to the kidney and contribute to inflammatory processes (25,26,32). On the other hand, a recent study with cSLE patients did not demonstrate an association between IL-17 and nephritis (9). This may be due to the smaller number of patients included.

Studies in animal models have shown that T cells that express IL-17 infiltrate the kidneys of patients with SLE. A significant proportion of these cells are CD3+CD4-CD8- double-negative T cells (23). In this recent study, the author showed that double-negative T cells from MRL/lpr mice express high amounts of IL-17 and that as disease progressively worsens, the expression of IL-17 and of IL-23 receptor in lymphocytes from these mice increases (23).

In another study, it was seem that IL- 23R–deficient lupus-prone C57BL/6–lpr/lpr mice display decreased number of CD3+CD42CD82 cells and IL-17A–producing cells in the lymph nodes and produce less anti-DNA. In addition, clinical and pathology measures of lupus nephritis are abrogated. The presented experiments document the importance of IL-23R–mediated signaling in the development of lupus

nephritis and urge the consideration of proper biologics for the treatment of the disease (33).

Recent study demonstrated that Th17 cells react to central nervous system (CNS) autoantigens, and manifest a higher migratory capability to the CNS parenchyma compared to other T cell subpopulations due to their ability to penetrate the blood brain barrier (22). Involvement of CNS in cSLE patients is frequently observed (34). In our study, we observed an association between increased levels of IL-17 and migraine. There are no studies, in the literature so far that explored this association up to date.

Previous study demonstrated an association between mood disorders and IL-17 (35,36). The first study observed increased IL-17 levels in patients with rheumatoid arthritis and anxiety and IL-17 levels were independently associated with higher anxiety scores (35). Another study observed increased IL-17 levels in patients with mood disorders when compared to healthy controls (36). In our study we did not observe an association between IL-17 and mood disorders. However, Beck Depression Inventory is used for self-evaluation of depressive symptoms and it is not a diagnostic tool for diagnosis the disease. This may have influenced the negative results.

A recent study with cSLE cohort observed a correlation between IL-17 levels and disease activity, cutaneous and hematological manifestations (9). We did not observe any of these findings in our cohort. This can be explained by the different genetic background and by the difference of the sample, whereas in our study had a larger number of patients.

As observed in previous studies, we did not observe differences in IL-17 levels according to the use of immunosuppressants (24,37).

In summary, IL-17 may play a role in the pathogenesis of neuropsychiatric and renal manifestations in cSLE patients. These findings may be the beginning of the new studies of IL-17 in cSLE cohort. Therefore, longitudinal studies are necessary to determine the role of IL-17 in cSLE.

Reference

1. Nakae S, Nambu A, Sudo K, Iwakura Y. Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice. J Immunol 2003; 171:6173-6177.
2. Yap DYH, Lai KN. Cytokines and their roles in pathogenesis of systemic lupus erythematosus: From basic to recent advances. J Biomed Biotechnol. 2010; 365083.
3. Nalbandian A, Crispín JC, Tsokos GC. Interleukin-17 and systemic lupus erythematosus: current concepts. Clin and Exp Immunology. 2009; 157:209-215.
4. Crispín JC, Tsokos GC. IL-17 in Systemic Lupus Erythematosus. Journal of Biomedicine and Biotechnology. 2010; 22: 1–4.
5. Su DL, Lu ZM, Shen MN, *et al.* Roles of pro and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of SLE. J Biomed Biotechnol. 2012; 2012:347141.
6. Crispín JC, Tsokos GC. Interleukin-17-producing T cells in lupus. Rheumatology. 2010: 22:499-503.
7. Sung YK, Park BL, Shin HD, Kim LH, Kim SY, Bae SC. Interleukin-10 gene polymorphisms are associated with the SLICC/ACR Damage Index in systemic lupus erythematosus. Rheumatology, 2006; 45:400-404.
8. Ma J, Yu J, Tao X, Cai L, Wang J, Zheng SG. The imbalance between regulatory and IL-17 secreting CD4+T cells in lupus patients. Clin Rheumatol. 2010; 29:1251-8.
9. Rana A, Minzi RW, Aggarwali R, *et al*. Gene expression of cytokines (TNF-a, IFN-c), serum profiles of IL-17 and IL-23 in pediatric systemic lupus erythematosus. Lupus. 2012; 0:1-8.

10. Tucker LB, Menon S, Sohaller JG, Isenberg DA. Adult and childhood-onset systemic lupus erythematosus: a comparison of onset, clinical features, serology and outcome. Br J Rheumatol. 1995; 34:866-872
11. ACR Ad Hoc Committee on Neuropsychiatric Lupus Nomencalture. The American College of Rheumatology nomenclature and case definitions for neuropsychiatric lupus syndromes. Arthritis Rheum. 1999:42:599-608.
12. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum. 1982; 25:1271-7.
13. Harris EN, Gharavi AE, Patel SP, Hughes GR. Evaluation of the anticardiolipin antibody test: report of an international workshop held 4 April 1986. Clin Exp Immunol. 1987; 68:215-22.
14. Brandt JT, Triplett DA, Alving B, Scharrer I, *on behalf of the* Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibody of the Scientific and Standardisation Committee of the ISTH. Criteria for the diagnosis of lupus anticoagulants: an update. *Thromb Haemost* 1995*;* **74***:* 1185–90.
15. Bombardier C, Gladman DD, Urowitz MB, Caron D, Chang CH. Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE. Arthritis Rheum. 1992; 35: 630–40.
16. Yee CS, Farewell VT, Isenberg DA, Griffiths B, Teh LS, Bruce IN, et al. The use of Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index-2000 to define active disease and minimal clinically meaningful change based on data from a large cohort of systemic lupus erythematosus patients. Rheumatology (Oxford). 2011;50:982-8.

17. Gladman DD, Urowitz MB, Goldsmith CH, Fortin P, Ginzler E, Gordon C, et al. The reliability of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology Damage Index in patients with systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 1997;40:809–13.
18. Beck AT, Ward CH, Mendelson M, Mock J, Erbaugh J. An inventory for measuring depression. Arch Gen Psychiatry. 1961;4:561-71
19. Beck AT, Epstein N, Brown G, Steer RA. An inventory for measuring clinical anxiety: Psychometric properties. J Consult Clin Psychol. 1988;56:893-7
20. Galley HF, Webster NR. The immuno-inflammatory cascade.Br J Anaesth. 1996;77:11-6
21. Chen XQ, Yu YC, Deng HH, *et al*. Plasma IL-17A is increased in new-Onset SLE patients and associated whit disease activity. J Clin Immunol. 2010; 30:221-225.
22. Okada, H, Khoury SJ. Type 17 T-Cell in Central Nervous System Autoimmunity and tumors. J Clin Immunol. 2012; 32:802-808.
23. Zhang Z, Kyttaris VC, Tsokos GC. The role of IL-23/IL-17 Axis in Lupus Nephritis. J Immunol 2009;183:3160-3169
24. Zhao XF, Pan HF, Yuan EH, *et al*. Increased serum interleukin 17 in patients whit systemic lupus erythematosus. Mol Biol Rep. 2010; 37:81-85.
25. Mok, MY, Wu, HJ, Lo Y, Lau, CS. The relation of interleukin 17 (IL-17) and IL-23 to Th1/Th2 cytokines and disease activity in systemic lupus erythematosus. J Rheumatol. 2010; 37:2046-2052.
26. Crispín JC, Oukka M, Bayliss G, *et al*. Expanded double negative T cells in patients with systemic lupus erythematosus produce IL-17 and infiltrate the kidneys. J Immunol. 2008; 181:8761-8766.

27. Wong CK, Lit LCW, Tam LS, *et al.* Hyperproduction of IL-23 and IL-17 in patients with systemic lupus erythematosus implications for Th17 mediated inflammation in auto-immunity. Clinical Immunology. 2008; 127:385-393
28. Dolff S, Quandt D, Wilde B, *et al*. Increased expression of costimulatory markers CD134 and CD80 on interleukin-17 producing T cells in patients with systemic lupus erythematosus. Arthritis Res. Ther. 2010; 12:R150.
29. Wong CK, Ho CY, Li EK, Lam CWK. Elevation of pro-inflammatory cytokine (IL-18, IL17, IL-12) and Th2 cytokine (IL-4) concentrations in patients with systemic lupus erythematosus. Lupus. 2009; 9:589-593.
30. Gigante A, Gasperini ML, Afeltra A, *et al*. Cytokines expression in SLE nephritis. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2011; 15:15-24.
31. Dong C. Diversification of T-helper-cell lineages: finding the family root of IL-17 producing cells. Nat Rev. Immunol. 2006; 6:329-33
32. Miyake K, Akahoshi M, Nakashima H. Th Subset balance in Lupus Nephritis. J Biomed Biotechnol. 2011; 980286.
33. Kyttaris VC, Zhang Z, Kuchroo KV, et al. Cutting Edge: IL:23 Receptor Deficiency prevents the development of Lupus Nephritis in C57BL/6-ipr/ipr Mice. J Immunol. 2010; 184:4605-9.
34. Postal M, Costallat LTL, Appenzeller S. Neuropsychiatric manifestations in systemic lupus erythematosus: epidemiology pathophysiology and management. CNS Drugs. 2011; 9:721-36.
35. Liu Y, Ho RC, Mak A. The role of interleukin (IL)-17 in anxiety and depression of patients with rheumatoid arthritis. Int J of Rheumatic Disease. 2012; 15:183-187.

36. Vieira MMM, Ferreira TB, Pacheco PAF, *et al.*Enhanced Th17 phenotype in individuals with generalized anxiety disorder. J of Neuroimmunology. 2010; 229:212-218.

37. Cheng F, Guo Z, Xu H, *et al.* Descreased plasma IL-22 levels, but not increased IL-17 and IL-23 levels, correlate with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. Ann Rheum Dis. 2009; 68:604-6.

Table 1: Demographic and clinical characteristics and IL-17 levels of patients and controls included in the study

	Childhood-onset SLE patients N=67	**First-degree relatives N=55**	**Healthy controls N=47**
Sex			
Female	61 (91.04%)	50 (90.90%)	42 (89.36%)
Age (years)	18 (range 11-31)	40* (range 29-52)	19 (range 6-30)
Disease duration (years)	5 (range 0-25)	-----	-----
SLEDAI	4 (range 0-24)	-----	-----
Active disease N=35	8 (range 4-24)		
Inactive disease N=32	0 (range 0-2)		
SDI	0 (range 0-3)	-----	-----
Treatment		-----	-----
No medication	6 (8.9%)		
Medication	61 (91.1%)		
Clinical finding			
Nephritis	24 (35.8%)		
Rash malar	6 (8.9%)		
Alopecia	3 (4.5%)		
Vasculits	3 (4.5%)		
Migraine	3 (4.5%)		
IL-17 (pg/ml)	36.3* (17.36-105.92)	32.22[#] (18.93-88.54)	29.47*[#] (15.16-62.17)

*$P \leq 0.05$