

LUCIANA DE DEUS VIEIRA DE MORAES



ESTUDO DAS POSSÍVEIS ASSOCIAÇÕES ENTRE O HORMÔNIO
DEHIDROEPIANDROSTERONA (DHEA) E CITOCINAS PRODUZIDAS POR
CÉLULAS T EM INDIVÍDUOS PORTADORES DE LUPUS ERMITEMATOSO
SISTÊMICO

Dissertação de Mestrado apresentada ao
curso de Pós-Graduação em Imunologia do
Departamento de Microbiologia e Imunologia
do Instituto de Biologia da Universidade
Estadual de Campinas.

Orientador: Prof. Dr. Morton A. Scheinberg

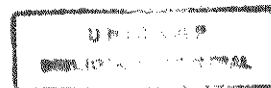
CAMPINAS

1998

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato(a)
*Luciana de Deus
Vieira de Moraes*
e aprovada pela Comissão Julgadora
08/01/98 *[Signature]*

M791e

33949/BC



UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	711/unicamp
	m.791e
V.	Ex.
TOMBO BC/	33949
PROC.	395/98
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	26/05/98
N.º CPD	

CM-00111367-2

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

m791e **Moraes, Luciana de Deus Vieira de**

~~M821e~~ Estudo das possíveis associações entre o hormônio
dehidroepiandrosterona (DHEA) e citocinas produzidas por células T
em indivíduos portadores de lupus eritematoso sistêmico / Luciana de
Deus Vieira de Moraes. -- Campinas, SP: [s.n.], 1998.
142f.: ilus.

Orientadora: Morton A. Scheinberg
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas,
Instituto de Biologia.

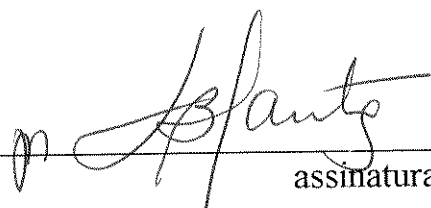
1. Lupus eritematoso sistêmico. 2. Linfócitos. 3. Hormônio.
I. Scheinberg, Morton A. II. Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia. III. Título.

Campinas, 08 de janeiro de 1998.

BANCA EXAMINADORA:

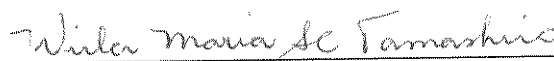
TITULARES:

Prof. Dr. Morton Aaron Scheinberg (orientador)



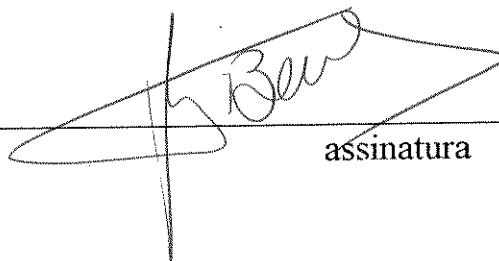
assinatura

Profa. Dra. Wirla M.S.C. Tamashiro



assinatura

Prof. Dr. Manoel Barros Bértolo



assinatura

SUPLENTES:

Prof. Dr. Paulo M.F. Araújo

assinatura

Trabalho realizado no Laboratório de Neuroimunologia do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia, contando com o apoio do Serviço de Reumatologia do Hospital de Clínicas da UNICAMP e auxílio da CAPES através da concessão de bolsa de Mestrado.

*Aos meus pais, Góia e Toni,
referenciais preciosos na minha
trajetória pessoal e acadêmica -
minha vida.*

*Ao meu marido Guto, por ter me
mostrado a beleza e a importância
da diversidade.*

AGRADECIMENTOS

-À Profa. Dra. Leonilda M. B. Santos, pela co-orientação e por todo o apoio;

-Ao Prof. Dr. Morton Scheinberg, pela definição do trabalho;

-Às voluntárias que participaram desse estudo, minha sincera homenagem;

-À Profa. Dra. Lilian Costallat, aos médicos Residentes e ao corpo de Enfermagem, em especial à enfermeira Dirce, pertencentes ao Serviço de Reumatologia do Hospital de Clínicas da UNICAMP, pela indispensável colaboração para a realização deste trabalho;

-Ao Dr. Ibsen Coimbra, pelo auxílio e orientação na seleção dos pacientes;

-Ao Dr. Manoel Bértolo, pela análise prévia e por todo o apoio durante o trabalho;

-Às Profas. Dra Wirla Tamashiro e Dra Júlia Sakurada, pela análise prévia desta dissertação;

-À Célia, Técnica do laboratório, e à D. Inês, pelo apoio durante a fase experimental;

-Às minhas queridas estagiárias Karina e Renata, que muito contribuíram para a realização deste estudo;

-Às colegas do laboratório, pelo companherismo e amizade;

-À Lourdes, Secretária da Pós-Graduação, pelo auxílio nas demandas administrativas;

-Ao meu irmão Rodrigo, pela dedicação na elaboração dos slides;

-À minha prima Elenice Kraemer, pela conversa proveitosa sobre sua experiência nesta área;

-À Divisão Cultural do Instituto Butantan, pelo apoio didático.

ÍNDICE

	Pág.
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. OBJETIVOS.....	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
4. RESULTADOS.....	32
5. DISCUSSÃO.....	94
6. CONCLUSÕES.....	113
7. RESUMO.....	114
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	116
ANEXO.....	125

1-INTRODUÇÃO

A quebra dos mecanismos responsáveis pela manutenção da auto-tolerância, alterando o curso normal das atividades das células B e dos linfócitos T, pode gerar respostas imunes direcionadas ao *self*. Este “desaprendizado” na distinção do próprio e do não próprio tem sido uma causa importante de muitas doenças, as quais cumprem o requisito de apresentar uma reação auto-imune de significância patogênica primária, atribuída como único elemento gerador da enfermidade. Dentre os fenômenos autoimunes está o lupus eritematoso sistêmico, caracterizado por criar concentrações elevadas de idiotipos patogênicos e de gerar situações patológicas de repercussão sistêmica.

Um antigo Sermão Medieval dizia : *“Doenças Reais resultam de hábitos alimentares Reais, como por exemplo o lupus e a gôta, os quais raramente aparecem naqueles que levam uma vida frugal e que trabalham arduamente.”* Tão antigo quanto o sermão, o lupus eritematoso tem sido estudado desde 400 a.C., com Hipócrates, primariamente descrito como doença de caráter cutâneo. E tão antigo quanto os romanos e ritualizados quanto os lobos, o termo *lupus* (lobo em Latim), por eles empregado, foi designado a esta enfermidade, até então restrito à cútis, segundo sugerem alguns, pela semelhança entre as lesões que provoca na pele e um lobo que acaba de roer e devastar sua presa (SMITH & CYR, 1988).

Em 1872, o lupus eritematoso ganhou descrição de natureza sistêmica por Moriz Kaposi (SMITH & CYR, 1988), percorreu o século e em 1948, com a descoberta da célula LE por HARGRAVES e colaboradores, gerada após a fagocitose do material nuclear, juntamente com a descrição de anticorpos antinucleares, em 1957 por FRIOU, adquiriu caráter de doença relacionada ao sistema imune.

O lupus eritematoso sistêmico (LES) é descrito como doença inflamatória crônica, com envolvimento multisistêmico, caracterizada pela produção de autoanticorpos de múltipla especificidade, especialmente anticorpos reativos com componentes nucleares, inclusive com o DNA nativo (SMITH & STEINBERG, 1983). Seu curso clínico pode ser agudo e fulminante ou progressivo, com períodos de exacerbações e de remissões (ROTHFIELD, 1977; SCHUR, 1989). Os diversos órgãos e sistemas que podem ser afetados pela doença incluem pele, articulações, rins, sistemas gastrointestinal, cardiopulmonar, hematológico, nervoso central e/ou outros órgãos do corpo. O diagnóstico do LES é feito baseando-se em 4 ou mais critérios estabelecidos pelo Colégio Americano de Reumatologia (ACR), revisados em 1982 por TAN et al., os quais se referem às manifestações clínicas apresentadas pelos indivíduos que possam estar em processo de desenvolvimento da doença.

Por causa da presença de múltiplos autoanticorpos e pela sua alta concentração, em muitos casos, muitos dos eventos fisiopatológicos e histopatológicos esperados no LES são resultantes de reações imunológicas *in vivo*. Danos teciduais podem surgir como resultado da ativação do

complemento e de outros mediadores inflamatórios pela reação antígeno-anticorpo e infiltração dos tecidos danificados por células mediadoras das reações imunes uma vez que complexos antígeno-anticorpos circulantes e níveis baixos do sistema complemento são observados (TAN, 1989).

Quanto à epidemiologia do LES, antes de nos apropriarmos de dados que estimam uma incidência de 4 a 250 casos da doença em cada 100 000 habitantes (SCHUR, 1989), é importante que consideremos a distribuição da doença no tempo e no espaço, associada aos fatores ambientais. FESSEL (1988), na sua revisão sobre a incidência do LES em grandes populações, principalmente nas populações chinesa e negra, as quais parecem ser representativas neste tipo de estudo, chama a atenção para as diferenças na prevalência da doença vistas em grupos étnicos e raciais residindo em diferentes partes do mundo. Por exemplo, é interessante observar que a incidência de LES em mulheres negras que moram em Nova York e São Francisco equivale a aproximadamente 4 vezes a sua representação nas suas comunidades locais. Embora o LES seja comum na Jamaica, a sua incidência em negros africanos é raramente observada. Portanto, a relativa contribuição de fatores genéticos, os quais se referem a indivíduos com o mesmo *background* étnico, e ambientais, isto é, aqueles fatores que possibilitam as diferenças na prevalência da doença nas diferentes partes do mundo, parecem ser extremamente relevantes.

Estudos com grandes grupos de indivíduos com LES, os quais examinam a incidência da doença na família, ou associações desta com

marcadores genéticos clássicos, têm sido importantes no sentido de sugerir a existência de envolvimento de fatores genéticos no LES. A observação de que 10% dos pacientes apresentam um ou mais parentes em primeiro ou segundo graus com a mesma doença, além de alguns estudos com gêmeos monozigóticos que desenvolvem LES mesmo após serem separados e levados a diferentes ambientes apontam para uma evidência clínica convincente que o componente genético possa ser o principal causador da doença (FESSEL, 1988). A múltipla segregação independente de genes que podem afetar a regulação do sistema imune, a resposta imune, os níveis dos componentes do sistema complemento e seus fatores relacionados, os níveis e as funções das imunoglobulinas, além do metabolismo de hormônios, têm sido implicado no LES (SCHUR, 1989). Aproximadamente 40% das pessoas com deficiência para o fator C2 do sistema complemento apresentam LES, e parece também existir uma associação entre LES e os componentes C3 e C4 do complemento (FESSEL, 1988). Quanto aos marcadores genéticos, estudos têm demonstrado um aumento nas frequências do HLA-B8, HLA-DR2 e do HLA-DR3 nos indivíduos portadores da doença (HOWARD, 1986). Algumas anormalidades imunológicas frequentemente encontradas no LES também podem ser influenciadas por fatores genéticos. Associações entre o anti-DNA e alguns genes HLA, como o HLA-DR2 (HOWARD, 1986) e o HLA-DR3 (GRIFFING, 1980) têm sido observadas nestes pacientes. No entanto, apesar das inúmeras evidências que aproximam estes marcadores genéticos da doença, ainda falta concordância entre eles, sugerindo que os genes HLA possam agir como modificadores da doença a serem considerados como genes primários no LES (SCHUR, 1989).

As implicações genéticas no LES também têm se manifestado através de estudos em modelos experimentais. Camundongos New Zealand Black (NZB) e os híbridos F1 resultantes do cruzamento do NZB com camundongos New Zealand White (NZW) [(NZB x NZW)F1] foram os primeiros modelos descritos que desenvolviam espontaneamente uma doença autoimune muito similar ao LES humano (HELYER & HOWIE, 1963). Duas outras linhagens, a MRL e a BXSB, que também desenvolvem espontaneamente uma síndrome LES típica (ANDREWS et al., 1978), têm contribuído como modelo experimental para a elucidação de mecanismos implicados no desenvolvimento da doença. Muito embora cada linhagem exiba um *background* genético diferente, e a espontaneidade da doença revela o caráter genético da síndrome, os *denominadores comuns* imunopatológicos da doença, observado entre as linhagens, têm sido as anormalidades, geneticamente determinadas, do tronco hematopoiético ou das células precursoras da linhagem linfóide (THEOFILOPOULOS and DIXON, 1985). A produção do autoanticorpo anti-DNA é muito comum nestes camundongos geneticamente predispostos ao LES, e a principal causa da morte é a glomerulonefrite mediada por imunocomplexos. Alguns estudos indicam que há envolvimento de dois ou mais genes na produção de anticorpos anti-ssDNA e anti-dsDNA em camundongos NZB. Na linhagem NZW, a quantidade de anticorpo produzida e convertida de IgM para IgG, também é controlada geneticamente (revisado em THEOPHILOPOULOS, 1985). Outras investigações sugerem que os genes para a produção dos anticorpos anti-ssDNA, anti-dsDNA e doença renal na linhagem NZ estejam ligados (revisado em THEOPHILOPOULOS, 1985).

Evidências a respeito do efeito dos fatores ambientais no LES também se pronunciam. DEAPEN et al. (1986) observaram que apenas 23% dos gêmeos monozigóticos e 9% dos pares dizigóticos eram concordantes para o LES, sugerindo que os elementos ambientais parecem ter uma função mais importante do que os fatores genéticos. A presença de autoanticorpos séricos em parentes não consanguíneos que moram juntos com indivíduos com LES (DE HORATIUS et al., 1975) ou em pessoal de laboratório que manipula soro de pacientes lúpicos (DE HORATIUS, 1972) são outros estudos que indicam a relevância do fator ambiental na doença, em indivíduos nos quais os fatores genéticos estejam ausentes (FESSEL, 1988).

Os fatores ambientais geralmente são referidos como sendo elementos de origem exógena. No LES, os fatores que apresentam relevância na sua patogênese podem ser químicos, alimentares ou infecciosos, muito embora este último seja muito pouco observado (FESSEL, 1988). O efeito de terremotos no agravamento de doenças reumáticas também tem sido investigado (WALLACE et al., 1994). Elementos de origem endógena, como os hormônios, também são relevantes na expressão dos caracteres biológicos. Estes fatores, somados aos fatores ambientais externos, constituem um *background* ambiental que deve ser considerado como um importante elemento na variabilidade das respostas.

Os hormônios esteróides sexuais têm sido apontados como fatores significativos no desenvolvimento do LES, visto a prevalência da doença em

mulheres (INMAN et al., 1978). A proporção mulher:homem na incidência do LES em adultos pode variar entre 8:1 a 13:1 (SCHUR, 1989). Uma série de investigações com camundongos NZB/NZW demonstraram claramente que hormônios andrógenos suprimem o LES enquanto que os estrógenos são capazes de acelerar a doença (ROUBINIAN et al., 1977; ROUBINIAN et al, 1978; ROUBINIAN et al, 1979). A administração de altas doses de estrógeno têm mostrado aumentar a mortalidade e a produção de autoanticorpos, assim como o agravamento da glomerulonefrite nestes animais (ROUBINIAN et al., 1978). A influência do hormônio masculino no prolongamento da doença foi observada em camundongos velhos com a doença já estabelecida (ROUBINIAN et al, 1979). CARLSTEN et al. (1989) demonstraram que altas doses de estrógeno estimulavam enquanto que a testosterona deprimia a produção de anticorpos contra a oxalasona em camundongos fêmeas (NZB/NZW)F1 ovariectomizadas. Em outras doenças autoimunes, os andrógenos se mostraram capazes de reduzir a incidência da anemia hemolítica em camundongos e ratos além de diminuir a severidade das lesões da síndrome de Sjörgren *like* experimental (revisado em DA SILVA, 1995). No LES humano, contraceptivos orais têm sido associados à exacerbação da doença (revisado em DA SILVA, 1995). Com base nestes aspectos, a administração de andrógenos naturais ou sintéticos tem sido apontada como tratamento que poderia beneficiar mulheres com LES se não fosse os efeitos colaterais masculinizantes. Diante desta abordagem, alguns estudos têm relevado o hormônio dehidroepiandrosterona (DHEA), por apresentar uma fraca atividade androgênica (PARKER, 1991), como uma alternativa de tratamento do LES. A melhora do quadro clínico dos pacientes com LES

moderado, após o tratamento com DHEA oral, observada por VOLLENHOVEN et al. (1994) provavelmente tenha como uma das implicações, a alteração do raio andrógeno/estrógeno. No LES murino, a DHEA tem sido relatada por melhorar nefrite em camundongos (NZB x NZW)F1 (LUCAS et al., 1985).

A dehidroepiandrosterona é hormônio esteróide secretado em abundância pelas adrenais, quantitativamente um dos principais hormônios de origem adrenocortical. A DHEA foi isolada pela primeira vez em 1934 por Butenandt e Dannebaum. Eles isolaram da urina um composto clorado, e não o hormônio propriamente dito, imediatamente reconhecido como um artefato produzido pela DHEA. No ano de 1944, descobriu-se que o mais provável precursor desta substância poderia ser o conjugado sulfato de dehidroepiandrosterona (DHEA-S), também isolado da urina por Munson, Gallagher e Koch neste mesmo ano. A completa extração da DHEA do plasma humano se deu em 1954, por Migeon e Plager e mais tarde, em 1959, Balieu mostrou que o DHEA-S era a forma mais abundante no plasma (LIEBERMAN, 1995).

A maior parte da DHEA circulante vem da conversão do sulfato de dehidroepiandrosterona (DHEA-S) nos tecidos periféricos, o mais abundante esteróide na circulação, também secretado pelas glândulas adrenais. NIESCHLAG et al. (1973) observaram secreção do DHEA, mas não de DHEA-S, pelas gônadas, tanto em homens quanto em mulheres, porém numa quantidade não significativa. Uma das funções biológicas já bem caracterizada da DHEA e do seu sulfato é a de servir como precursor dos esteróides sexuais.

Aproximadamente 50% do total de andrógenos sintetizados em homens adultos derivam destes esteróides precursores, enquanto que em mulheres, a formação de estrógeno corresponde a 75% antes da menopausa e próximo a 100% após a menopausa (LABRIE et al., 1995). A DHEA e seu sulfato são convertidos em androstenediona e depois, em potentes estrógenos e/ou andrógenos nos tecidos periféricos. A conversão do DHEA-S em androstenediona ou testosterona se dá através da intermediação da DHEA e a percentagem destas conversões são bem maiores que as conversões da DHEA em androstenediona e em testosterona (LONGCOPE, 1995). A forma sulfatada da DHEA na circulação pode servir como transporte para o esteróide que será convertido em estrógeno ou andrógeno (FALANY, 1995).

A DHEA, um esteróide da família C₁₉, assume uma extraordinária importância no processo de biosíntese do hormônio estrogênico. As células produtoras de estradiol, localizadas nos ovários e na placenta, são ditas incapazes de sintetizar o precursor esteróide C₁₉ intermediário, como a DHEA, a partir do esteróide C₂₁, apesar de conter todos os componentes necessários para completar o processo de transformação do precursor em estradiol. LIEBERMAN (1995) aponta uma questão interessante sobre esta dependência: *“... DHEA é uma curiosidade; é envolvida num processo extraordinário, no qual as células que a requerem como um bloco construtor para um processo essencial para a perpetuação das espécies são supostamente incapazes de sintetizá-la.”*

No nascimento, os níveis plasmáticos do DHEA-S são muito altos, provenientes de fontes maternas transplacentárias. Durante os 6 primeiros anos de vida, estes níveis permanecem muito baixos e começam a aumentar em crianças a partir dos 7 anos. Este aumento é progressivo e o valor máximo do DHEA-S circulante é alcançado entre 20 e 30 anos (LABRIE et al., 1995). Um estudo sobre as concentrações séricas do DHEA-S em homens e mulheres mostrou que o pico dos níveis séricos em homens se apresentou entre os 20 e 24 anos enquanto que nas mulheres, o pico hormonal revelou ser entre as idades de 15 a 19 anos; os valores hormonais decresceram mas se revelaram significativamente mais elevados em homens do que em mulheres nas idades de 20 a 69 anos, mostrando que há diferenças conforme o sexo no nível sérico do DHEA-S (ORENTREICH et al., 1984). Aos 70 anos de idade, o DHEA-S sérico representa apenas 20% de seu valor de pico e decresce até aproximadamente 95% nas idades entre 80 e 95 anos (LABRIE et al., 1995). A hipótese mais simples que tenta explicar o declínio da biosíntese do DHEA-S conforme o avanço da idade é baseada no decréscimo do número das células funcionais da zona reticular do córtex da glândula adrenal (HORNSBY, 1995).

O declínio progressivo e marcado da DHEA e do DHEA-S no soro com o avanço da idade os tornam muito distintos dos outros hormônios esteróides secretados pelas adrenais, como os glucocorticóides ou mineralocorticóides, os quais preservam os seus níveis séricos no decorrer do envelhecimento. Vários investigadores têm sugerido que algumas das mudanças degenerativas por causa do avanço da idade pode estar relacionada ao progressivo déficit da DHEA e de seu sulfato na circulação. Estas associações atribuem ao hormônio

várias funções fisiológicas. Numerosos estudos com animais têm demonstrado efeitos benéficos da administração de DHEA na prevenção da obesidade, da diabetes, do câncer e de doenças cardíacas (NESTLER, 1995). Muito embora estes estudos tenham sido conduzidos em roedores, os quais apresentam muito pouco, senão quase nada de DHEA circulante, e desta forma, a extrapolação para humanos não é tão óbvia, investigações com humanos parecem não ter provado o contrário. BARRETT-CONNOR & GOODMAN-GRUEN (1995), em estudo epidemiológico, observaram um efeito cardioprotetor do DHEA-S em homens. Na arteroesclerose coronariana, baixos níveis plasmáticos da DHEA podem facilitar enquanto que níveis elevados podem retardar o desenvolvimento da doença (HERRINGTON, 1995). A suplementação de DHEA em pacientes diabéticos melhorou o quadro por ter atenuado a resistência à insulina (BUFFINGTON et al., 1993).

Muitas das doenças associadas ao envelhecimento podem ter envolvimento imunológico. O ótimo funcionamento do sistema imune no indivíduo é altamente dependente da produção regulada de citocinas, dos fatores de crescimento e das células envolvidas, os quais fazem parte de uma rede muito bem balanceada. Suas atividades pleiotrópicas se estendem além das células envolvidas no sistema imune e incluem o controle de vários processos celulares e fisiológicos que ocorrem em muitos órgãos e tecidos do corpo (SPENCER et al., 1995). A quebra de mecanismos que controlam a produção de certas citocinas e que contribuem para favorecimento de algumas patologias como câncer mamário, anemia, osteoporose e linfoma tem sido associada ao processo do envelhecimento natural. Vários estudos com células

linfóides de animais velhos têm mostrado uma regulação alterada no controle da expressão de citocinas, principalmente a interleucina (IL) 6, a IL-10 e o IFN- γ . A administração de DHEA ou DHEA-S *in vivo* em camundongos velhos resultou em mudanças significativas na restauração dos níveis destas citocinas (SPENCER et al., 1995). A regulação da produção aumentada da IL-6 pôde ser observada após a suplementação de DHEA-S e DHEA, administradas intraperitonealmente em animais velhos, sugerindo uma possível ligação desta citocina ao declínio da DHEA e de sua forma sulfatada com o avanço da idade (DAYNES et al., 1993).

A influência destes hormônios esteróides adrenocorticais sobre a síntese da IL-2 tem sido mostrada por vários autores. Estudos com camundongos mostraram que a administração *in vivo* de DHEA e DHEA-S foram capazes de aumentar a produção da IL-2 pelas células linfóides ativadas em relação ao controle; no entanto, no tratamento *in vitro*, apenas a DHEA, mas não o DHEA-S, teve influência sobre a IL-2 (DAYNES, DUDLEY & ARANEO, 1990; DAYNES et al., 1990). As evidências sugerem que este hormônio possa representar um regulador natural da função da célula T *in vivo*, e que exerça estas atividades através de uma macromolécula ou proteína que tenha características de um receptor típico para hormônio esteróide (MEIKLE et al., 1992). Muito provavelmente o DHEA-S precisa ser convertido para DHEA antes da ligação com o receptor, sugerindo que este último seja a forma ativa hormonal (DAYNES et al., 1990).

Em humanos, ensaios *in vitro* com células T ativadas mostraram um aumento da produção da IL-2, em relação ao controle, quando as células foram expostas ao hormônio DHEA (SUZUKI et al., 1991). Recentemente, SUZUKI e colaboradores (1995) puderam observar tal fenômeno em células de pacientes com LES, os quais apresentam baixa produção de DHEA. A administração do hormônio *in vitro* foi capaz de restaurar os níveis irregulares da secreção da IL-2.

As citocinas, com sua característica pluripotente, juntamente com os compartimentos celulares específicos - como as células B e T - e inespecíficos - constituído por células envolvidas na imunidade natural - formam um circuito imunoregulatório equilibrado e quando "solicitados", podem gerar respostas imunológicas de várias naturezas. Tais respostas podem ser voltadas a antígenos proteicos, não proteicos ou à parasitas, além de estar envolvidas em processos alérgicos, inflamatórios e autoimunes. O *set* das linfocinas produzidas pelas células T, hoje bem caracterizadas como produto de secreção de duas subpopulações de células T-CD4⁺ - Th1 e Th2 - foi inicialmente evidenciado em linfócitos T auxiliares de murinos, padrão este que definia a existência de uma dicotomia funcional para estas células (MOSMANN et al., 1986). Sob algumas condições *in vitro* e provavelmente *in vivo*, a estimulação de células T humanas também pode resultar no desenvolvimento de padrões de citocinas típicas de Th1 e Th2 (ROMAGNANI, 1994). Esta dicotomia funcional atribui às células Th1 o envolvimento nas reações de hipersensibilidade tardia, na função helper na produção de anticorpos da classe IgG2a em murinos, no aumento de vários mecanismos citotóxicos e na

ativação macrofágica (MOSMANN & COFFMAN, 1989; ROMAGNANI, 1994) As citocinas secretadas por esta subpopulação incluem o interferon-gama ($\text{INF-}\gamma$), a IL-2 e linfotoxinas, os quais não são detectáveis em clones Th2; estes, por sua vez, sintetizam principalmente IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, e a ativação desta subpopulação provê uma ótima função auxiliar nas respostas humorais, que inclui switching para IgE, IgG1 (em murinos) ou IgG4 (no homem) e IgA (MOSMANN & COFFMAN, 1987; MOSMANN & COFFMAN, 1989; ROMAGNANI, 1994). Estas células também participam na resposta a alergias por promoverem a proliferação de mastócitos, na mucosa, e eosinófilos.

Muito embora os clones de célula T CD4+ apresentem definições quanto às suas funções, uma sobreposição parcial destas deve ocorrer em muitas respostas. Esta sobreposição de atividades entre os clones Th1 e Th2 se revela através de mecanismos sinérgicos, antagônicos ou “compensatórios” via citocinas. Ambos os tipos celulares têm o potencial de induzir moléculas MHC classe II em algumas células apresentadoras de antígenos: Th1, via $\text{INF-}\gamma$, estimularia a expressão da molécula em macrófagos enquanto que Th2, através da IL-4, poderia estimular a síntese em células B ou macrófagos. O antagonismo entre os clones pode ser reconhecido em algumas respostas inflamatórias, onde a produção de IgE pela célula Th2, via IL-4, e consequentemente a ativação de outras células envolvidas no processo alérgico, deva ser suprimida pela produção do $\text{INF-}\gamma$, evitando uma forte reação de hipersensibilidade imediata. O auxílio às células B para a produção de anticorpos pode ser realizada pelos dois tipos celulares, muito embora a

natureza do auxílio seja qualitativamente e quantitativamente diferente entre eles. Desta forma, se um antígeno não for efetivo na indução de resposta via ativação de um dos clones auxiliares, ainda pode haver produção de anticorpo se o outro clone celular responder.

Os produtos secretórios destas subpopulações celulares têm sido muito investigados no processo da autoimunidade. No LES, a produção irregular das IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e INF- γ têm sido detectada. Estudos *in vivo* ou *in vitro*, em animais e com humanos, têm mostrado a implicação destas citocinas no perfil imunológico clássico da doença, o qual inclui, principalmente, a hiperatividade das células B, a excessiva produção de autoanticorpos, funções irregulares da célula T, entre outros desequilíbrios. Vários autores encontraram uma supressão da atividade da IL-2 *in vitro* pelas células T auxiliares em pacientes com LES (LINKER-ISRAELI et al., 1983; MURAKAWA et al., 1985; SUZUKI et al., 1995). Em modelos murinos, esta produção defectiva também tem sido apontada (TALAL et al., 1982; THEOPHILOPOULOS & DIXON, 1985; KLINMAN & STEINBERG, 1995). A IL-2, originalmente detectada e identificada como um fator de crescimento para as células T (TCGF), permanece como principal fator mitogênico para estas células, além de promover a proliferação e aumentar a capacidade secretória das células B e das células natural killer (NK). Esta citocina ocupa uma posição central na fisiologia do sistema imune, exercendo efeitos múltiplos e pleiotrópicos via um receptor específico expressos nas células imunologicamente relevantes (KROEMER et al., 1991). Recentemente, HUANG & STOTT (1995) detectaram níveis elevados de fatores que regulam a resposta proliferativa da linhagem celular dependente

da IL-2 no soro de pacientes e camundongos com LES. Altas concentrações destes fatores estariam inibindo a resposta proliferativa destas células à IL-2, sugerindo uma implicação para a irregularidade das funções das células T.

As causas da baixa produção da IL-2 *in vitro*, observada no LES por muitos investigadores e em outras doenças autoimunes, podem ser atribuídas aos possíveis mecanismos celulares e moleculares envolvidos. Em ensaios *in vitro*, é sabido que a sua produção é a última etapa de uma cascata de eventos que envolve ativação de monócito/macrófago, secreção da IL-1 por monócitos, interações entre as células T e outras células acessórias, e ativação direta das células T dependentes de mitógeno; além do mais, fatores solúveis podem suprimir a produção da IL-2 e esta pode ser consumida pelas células que expressam o receptor para a IL-2 (IL-2R⁺) (KROEMER et al., 1991). Portanto, uma série de modulações pode intervir nos diferentes níveis desta cascata, contribuindo para a sua hipoprodução.

O envolvimento da IL-4 na patogenia do LES tem adquirido relevância uma vez que esta citocina tem mostrado apresentar importantes propriedades regulatórias nas respostas imunes humorais. O aumento da produção da IL-4, juntamente com outras citocinas secretadas pelas células Th2, tem sido relacionado com a hiperatividade da célula B em pacientes com LES (ALCOCER-VARELA et al., 1996). Ao contrário destas observações, no LES experimental induzido, os níveis de secreção da IL-4 mostrou-se reduzido em sobrenadante de cultura de esplenócitos estimulados com Con A, quando comparados ao controle sadio (SEGAL et al., 1995; DAYAN et al., 1997).

Primariamente descrita como um co-estimulador de células B não ativadas, a IL-4 tem demonstrado aumentar a expressão de moléculas Ia nas células B além de promover o switching isotípico de imunoglobulinas para IgE e IgG1. Em ensaios in vitro, a IL-4 tem um papel fundamental na diferenciação das células T CD-4+ em células Th2, além de promover a expansão do clone (MOSMANN & COFFMAN, 1989). Pelas suas propriedades estimulatórias relativas às células B, a IL-4 tem sido apontada como citocina que possa estar envolvida no desenvolvimento de doenças autoimunes mediadas por autoanticorpos, como por exemplo, o LES. Ao contrário do que se especula, um recente estudo, utilizando-se o transgene IL-4 em modelo murino para LES, mostrou que a IL-4 previne completamente o desenvolvimento de glomerulonefrite típica do lúpus nestes animais, regulando negativamente o aparecimento de anticorpos da subclasse IgG mediados pelas células Th1 (SANTIAGO et al., 1997). A neutralização da IL-4 endógena aumentou em 40% a produção espontânea da IgG pelas células mononucleares do sangue periférico de pacientes com LES (LINKER-ISRAELI et al., 1991).

Outras citocinas, como a IL-6 e a IL-10, também têm mostrado apresentar fortes implicações no LES. Níveis elevados de IL-6, predominantemente produzido por monócitos, mas também por linfócitos, foram encontrados no soro e no plasma de pacientes com LES (LINKER-ISRAELI et al., 1991; SPRONK et al., 1992). Na presença de anticorpos neutralizadores para a IL-6, a produção espontânea de IgG, pelas células mononucleares do sangue periférico de pacientes lúpicos, diminuiu de 20 a 65% (LINKER-ISRAELI et al., 1991). Nas patogenias que apresentam

anormalidades relativas às células B, como o LES e a artrite reumatóide, e em várias doenças proliferativas, as concentrações da IL-6 têm sido descritas como irregulares (LINKER-ISRAELI, 1991). A hiperatividade das células B e a consequente produção de autoanticorpos, fatores estes característicos do LES, também têm sido relacionados com a IL-10. Esta citocina, originariamente identificada como produto das células Th2, em camundongos, inibidora da síntese de citocinas produzidas pela subpopulação Th1 (predominantemente INF- γ) tem mostrado ser um potente fator de crescimento e de diferenciação de linfócitos B humanos ativados, além de induzir estas células a secretarem grandes quantidades de IgG, IgM e IgA (ROUSSET et al., 1992). Vários tipos celulares podem ser responsáveis pela produção da IL-10. Em humanos, além das células T CD-4+- preferencialmente Th2- a IL-10 pode ser secretada pelas células B e, em grandes quantidades, por monócitos ativados (MALEFYT et al., 1991). Estes últimos autores observaram um efeito autoregulatório da IL-10, por um mecanismo de feedback negativo, uma vez que esta citocina inibiu fortemente a sua síntese via RNAm pelos monócitos ativados com LPS. Este mecanismo de autoregulação diminui a expressão das moléculas de classe II do MHC nestas células, reduzindo a sua capacidade de apresentação de antígenos e, conseqüentemente, a proliferação das células T específicas (MALEFYT et al., 1991), via inibição da síntese da IL-2 ao nível do RNAm (MALEFYT et al., 1993).

A produção aumentada da IL-10, por células não T oriundas de pacientes com LES, tem sido observada. LLORENTE et al (1994) observaram uma síntese acentuadamente aumentada da IL-10 *in vivo* pelas células B e

pelos monócitos dos indivíduos com LES, em relação ao controle. Estes elevados níveis de citocina nestes pacientes provavelmente estejam contribuindo para a expansão dos linfócitos B com propriedades autoreativas (LLORENTE et al, 1995). Títulos séricos da IL-10 foram correlacionados positivamente com a atividade da doença e com títulos de autoanticorpos anti-DNA em indivíduos lúpicos (HOUSSIAU et al., 1995).

Como as citocinas têm um papel crítico nas respostas que envolvem as células T e B, a sua produção irregular pode estar implicada no desequilíbrio imunológico do LES. Investigadores têm demonstrado que a ativação preferencial de citocinas referentes a um subtipo celular que faz parte da rede imunoregulatória equilibrada, com propriedades estimulatórias e inibitórias, pode determinar o aparecimento de “desafios” imunológicos. Ao se pensar nas interações entre as subpopulações Th1 e Th2, certos autores sugerem que no LES, a proporção entre estas células, no que diz respeito à sua atividade, sofre um desequilíbrio no sentido Th2:Th1, o qual pode refletir num aumento das células Th2 ou numa diminuição da ação da subpopulação Th1, contribuindo para a hiperatividade das células B (KLINMAN & STEINBERG, 1995). Mudanças no processo da imunoregulação que levam ao aparecimento de autoanticorpos podem comprometer as outras células e citocinas envolvidas no circuito, pela sua interação com estes elementos. O LES humano, pela sua natureza multigênia, levanta a possibilidade de que múltiplos caminhos podem levar ao desequilíbrio das atividades das subpopulações Th1 e Th2 (KLINMAN & STEINBERG, 1995) e, conseqüentemente, de todo aparato imunológico. Enquanto doença sistêmica,

o desequilíbrio imunológico pode ser relevado sob a influência de outros elementos, como por exemplo, o sistema endócrino, o qual pode interagir com o sistema imune através de efeitos imunomodulatórios.

2 - OBJETIVOS

1. Quantificar os níveis das interleucinas 2 (IL-2), 4 (IL- 4) e interleucina 10 (IL-10), produzidas pelas subpopulações de células T, em mulheres portadoras de LES, submetidos ao tratamento com corticosteróide em dose que caracteriza um quadro de provável estabilidade da doença, assim como em mulheres sadias, pertencentes ao grupo controle.
2. Quantificar os níveis séricos dos hormônios DHEA e de seu sulfato, o DHEA-S, nestes indivíduos.
3. Verificar se existe associação entre os níveis séricos do hormônio DHEA e o padrão das citocinas produzidas pelas subpopulações de células T no grupo das portadoras de Lupus Eritematoso Sistêmico (LES).

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Casuística

Foram estudados 39 indivíduos portadores de Lupus Eritematoso Sistêmico (LES), do sexo feminino, com diagnóstico definitivo segundo os critérios estabelecidos pelo Colégio Americano de Reumatologia (ACR) (TAN et al., 1982), do ambulatório do Serviço de Reumatologia da Faculdade de Ciências Médicas e Hospital de Clínicas da UNICAMP. A seleção dos indivíduos foi feita mediante a dose de corticosteróide diária, estabelecendo-se as doses de 5 e 10 mg, inclusive indivíduos sem tratamento por apresentarem um quadro bem estabilizado. Este grupo foi formado então, por 22 mulheres em tratamento com 5 mg de Predinisona diários, 01 se tratando com 3 mg de Deflazacorte diários, 09 mulheres em tratamento com 10 mg/dia e 07 delas sem medicação. A idade das portadoras variou entre 18 e 65 anos ($34,7 \pm 9,09$) e o tempo de doença, de 2 a 23 anos ($8,7 \pm 6,14$).

O estudo das manifestações características da doença foi feita mediante análise dos prontuários das pacientes. Estas manifestações foram consideradas tanto no início quanto na evolução da doença.

Não foi feita análise de existência de atividade da doença - realizada através da Contagem de Critérios de Atividade Lúpica (CCAL) - principalmente

por se considerar que as doses de corticoesteróide estabelecidas indicariam uma provável falta de atividade lúpica.

Cada um dos 39 indivíduos forneceu aproximadamente 20 cc de sangue, sendo 15 cc colhidos em tubo estéril heparinizado para a produção das citocinas e o restante colhido sem heparina, para a obtenção do soro para as dosagens hormonais.

O grupo controle foi composto por 24 indivíduos voluntários sadios, todos do sexo feminino, com variação de idade entre 18 e 39 anos ($25,0 \pm 6,5$), e exame físico normal no dia da coleta. Cada um dos 24 indivíduos forneceu sangue conforme descrição anterior.

3.2 - Obtenção de células mononucleares do sangue periférico dos indivíduos lúpicos e do grupo controle.

O sangue heparinizado foi centrifugado a 1500 rpm para uma separação prévia das células mononucleares, as quais foram retiradas e diluídas, volume a volume, com salina 0,15 M. A suspensão celular foi delicadamente passada em gradiente de Ficoll-Hypaque (Sigma Chem., MO, USA) na densidade de 1,077 g/ml e centrifugada por 30 minutos a 1500 rpm.

3.3 - Produção das citocinas

Às células isoladas, segundo o item anterior, adicionou-se 5 ml de solução de Hanks (Sigma Chem., Boston, USA). A suspensão foi centrifugada a 1500 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. Esta operação foi realizada por mais duas vezes. A concentração celular foi ajustada para 2×10^6 células/ml em meio de cultura RPMI 1640 (Sigma Chem., MO, USA) especialmente enriquecido com 10% soro humano e gentamicina a $50 \mu\text{g/ml}$. As células receberam estímulos de fitohemaglutinina A (PHA) (Sigma Chem., MO, USA) a $5 \mu\text{g/ml}$ e PHA, nesta mesma concentração, juntamente com o hormônio dehidroepiandrosterona (DHEA) (SP Farma Químicos) a $1,7 \times 10^{-9}$ M, concentração esta muito próxima à encontrada no sangue de adultos normais (NEISCHLAG et al., 1973; SUZUKI et al., 1991; SUZUKI et al., 1995). As suspensões celulares destinadas ao controle não receberam nenhum estímulo. Desta forma, para cada indivíduo, o ensaio foi realizado em triplicata.

Para a obtenção da IL-2, os linfócitos foram estimulados por 18 horas em estufa de CO_2 . Para a obtenção de IL- 4 e IL-10, as células foram estimuladas por 40 horas, aproximadamente. Após o tempo de produção da citocina desejada, cada cultura de célula teve seu sobrenadante retirado e estocado em freezer a -20°C .

3.4 - Quantificação das citocinas.

As interleucinas 2 (IL-2), 4 (IL- 4) e 10 (IL-10), obtidas de acordo com o item anterior, foram quantificadas pelo método de ELISA “sanduíche” utilizando-se o “kit” comercial específico para cada citocina (Immunotech, France).

3.4.1 - Quantificação da IL-2.

Cem microlitros do IL-2 recombinante humano foram colocados nos poços da microplaca contendo o anticorpo monoclonal anti-IL-2 humano previamente aderido, nas concentrações variáveis entre 0 e 1000 pg/ml (0.0, 15.6, 62.5, 250, 1000 pg/ml), todos em triplicata. As amostras também foram colocadas, 100µl em cada poço. Em seguida, adicionou-se 100µl do conjugado (anticorpo monoclonal anti-IL-2 conjugado com acetilcolinesterase). A placa foi coberta e levada à geladeira a 4°C por aproximadamente 24 horas, para a interação da amostra com o anticorpo de captura específico. Após este período, os poços foram lavados 3 vezes com solução para lavagem, utilizando-se o pipetador multicanal. Foram adicionados 200 µl do substrato, o qual consiste de acetilcolina e ditionitrobenzoato de sódio, a todos os poços. A placa foi coberta com papel alumínio, permanecendo o material no escuro por 30 minutos à temperatura ambiente, sob constante agitação. Após o período de incubação, a reação foi interrompida adicionando-se 50 µl de tacrina (inibidor da atividade da

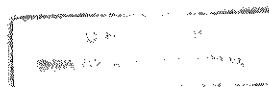
acetilcolinesterase) a todos os poços. A leitura da placa foi feita em leitor de ELISA (Labsystem) num comprimento de onda de 409 nm.

3.4.2 - Quantificação da IL-10.

Aos poços da microplaca de 96 poços contendo o anticorpo monoclonal anti-IL-10 previamente aderido, foram colocados 50 µl do IL-10 recombinante humano, nas concentrações variáveis entre 0 e 2000 pg/ml (0.0, 16, 80, 400 e 2000 pg/ml), todos em triplicata. As amostras também foram colocadas, 50 µl em cada poço. A placa foi coberta por 2 horas à temperatura ambiente, sob constante agitação, para a interação da amostra com o anticorpo de captura específico. Após este período, os poços foram lavados 3 vezes com solução de lavagem, utilizando-se o pipetador multicanal. Aos poços foram adicionados 50 µl do anticorpo monoclonal anti-IL-10 biotinilado, e em seguida, 100 µl do conjugado marcado com estreptavidina - peroxidase. A placa foi coberta durante 30 minutos, sob constante agitação à temperatura ambiente. Os poços foram lavados 3 vezes novamente, e 100 µl do substrato cromogênico da peroxidase foram adicionados aos poços e incubados no escuro durante 30 minutos, sob agitação constante, à temperatura ambiente. Após este período a reação foi interrompida adicionando-se 50 µl de ácido sulfúrico 2N a todos os poços. A leitura foi feita em leitor de ELISA num comprimento de onda de 450 nm.

3.4.3 - Quantificação da IL- 4

Aos poços da microplaca de 96 poços, contendo o anticorpo monoclonal anti-IL- 4 humano previamente aderido, foram colocados 100 µl do IL- 4 recombinante humano, nas concentrações variáveis entre 0 e 1000 pg/ml (0.0, 15.6, 62.5, 250, 1000 pg/ml), todos em triplicata. Em seguida, colocou-se 50 µl das amostras em cada poço. A placa foi coberta por 2 horas, à temperatura ambiente, sob constante agitação, para a interação da amostra com o anticorpo de captura específico. Após este período, os poços foram lavados 3 vezes com solução para lavagem, com o auxílio do pipetador multicanal. Foram adicionados aos poços, 50 µl do anticorpo monoclonal anti-IL- 4 biotinilado, e em seguida, 100 µl do conjugado marcado com estreptavidina - peroxidase. A placa foi coberta novamente durante 30 minutos, à temperatura ambiente, sob constante agitação. Os poços foram lavados por mais 3 vezes, e 100 µl do substrato cromogênico da peroxidase foram adicionados aos poços e incubados no escuro durante 20 minutos à temperatura ambiente, sob agitação constante (350 rpm). A reação foi interrompida, após este período, adicionando-se 50 µl de ácido sulfúrico 2N a todos os poços. A leitura foi realizada em leitor de ELISA, a um comprimento de onda de 450 nm.



3.5 - Determinação sérica hormonal

Os níveis séricos do hormônio DHEA e do sulfato de DHEA foram determinados utilizando-se o “kit” comercial para radioimunoensaio (RIA) de competição (Immunotech, France), específico para cada ensaio.

3.5.1 - Determinação do sulfato de DHEA

Vinte e cinco microlitros do padrão, nas concentrações variáveis entre 0 e 1000 $\mu\text{g}/100\text{ml}$, assim como 25 μl das amostras de soro de cada um dos indivíduos foram colocados em tubos contendo o anticorpo monoclonal anti-DHEA sulfato já aderido, juntamente com 500 μl do traçador (sulfato de DHEA marcado com ^{125}I). Os tubos foram delicadamente agitados e cobertos com filme transparente de PVC durante 30 minutos em banho-maria a 37°C, para a incubação do material pelo anticorpo específico. Para a obtenção da contagem total em cpm, 500 μl do traçador foram colocados em dois tubos adicionais, sem a presença do soro. O conteúdo dos tubos foi aspirado exceto daqueles utilizados para a contagem total. O material foi levado ao contador gama para a realização da contagem durante 1 minuto.

3.5.2 - Determinação do hormônio DHEA

Trezentos microlitros da amostra de soro de cada um dos indivíduos foram colocados em tubos de vidro. À cada tubo foram adicionados 3 ml de éter etílico, os quais foram vigorosamente homogeneizados por aproximadamente 1 minuto, utilizando-se o vortex. Os tubos foram levados ao freezer, na temperatura de -20°C, até a solidificação da fase aquosa. Após este período, a fase orgânica de cada amostra foi delicadamente transferida para outro tubo de vidro, os quais foram levados ao banho-maria a 37°C, para a evaporação do conteúdo. Os extratos resultantes deste processo foram levados à geladeira, à temperatura de 4°C, por aproximadamente 24 horas. Após a fase da extração, o material foi dissolvido em 300 µl da solução tampão para a realização da dosagem hormonal.

Aos tubos contendo o anticorpo monoclonal anti-DHEA aderido, foram colocados 100 µl do padrão, nas concentrações variáveis entre 0 e 30 ng/ml (0.5, 1.0, 3.0, 10.0 e 30 ng/ml), e 100 µl das amostras de soro, todos em duplicata, juntamente com 500 µl do traçador (DHEA marcado com ^{125}I). Os tubos foram delicadamente agitados e cobertos com filme transparente de PVC durante 1 hora em banho-maria a 37°C, para a incubação do material pelo anticorpo específico. Para a obtenção da contagem total em cpm, 500 µl do traçador foram colocados em 2 tubos adicionais, sem a presença do soro. Após o período de incubação, o conteúdo dos tubos foi aspirado cuidadosamente, exceto daqueles utilizados para

a contagem total. O material foi levado ao contador gama para a realização da contagem durante 1 minuto.

3.6 - Análise do padrão de síntese das citocinas em relação ao hormônio DHEA.

A verificação da alteração da síntese das citocinas após a administração do hormônio, em relação às culturas de células mononucleares estimuladas somente com a PHA, foi feita mediante o estabelecimento de um valor de *borderline*, arbitrariamente atribuído. Portanto, os valores resultantes da diferença entre as concentrações das citocinas com e sem a adição do hormônio DHEA, maiores ou iguais a 9,5 pg/ml, serão considerados relevantes como valores de alteração positiva. Por outro lado, valores menores que 9,5 pg/ml serão designados dados de variação negativa.

3.7 - Método estatístico

De acordo com os dados, foram utilizados testes paramétrico e não paramétrico. Este último foi aplicado quando os resultados não se enquadravam no teste de normalidade. O teste *t* de Student foi utilizado para a análise da determinação hormonal entre os grupos. Com o intuito de se averiguar a significância em termos de produção das citocinas em estudo (IL-2, IL-4 e IL-10)

entre os grupos das portadoras de LES e o controle, utilizou-se o teste estatístico de Kruskal-Wallis.

Para todos os testes, foi estabelecido um nível de significância de 5%, rejeitando-se a hipótese da nulidade quando $p < 0,05$.

As frequências dos histogramas de frequências relativas para as interleucinas e para os títulos do FAN foram abordadas em percentagem. As classes das distribuições das frequências foram representadas por dados contínuos. Os títulos recém mencionados foram expressos como $\log_2$ da diluição do soro.

4 - RESULTADOS

4.1 - Análise das manifestações características da doença

Os 39 indivíduos lúpicos estudados, relacionados no quadro I quanto à idade e dose do medicamento, apresentaram diversas alterações manifestadas no início ou durante a evolução da doença, que os caracterizaram como tais. Analisando-se estas manifestações em termos de frequência, no grupo em geral, observou-se que 38 indivíduos (98%) apresentaram lesões cutâneas, alopecia ou úlcera oral; 34 (87%) apresentaram artrite, artralgia ou necrose asséptica da cabeça do fêmur; 15 (38%) apresentaram distúrbio renal; 15 (38%) desenvolveram serosites (pleurite ou pericardite); 14 (36%) tiveram manifestações neuropsiquiátricas, caracterizadas por convulsão ou psicose; 14 (36%) desenvolveram alterações hematológicas, caracterizadas por anemia hemolítica, leucopenia < 4000 ou plaquetopenia; 20 (51%) revelaram positividade para célula LE e 39 (100%), para o Fator anti-nuclear em títulos que variaram entre 1/20 e 1/10000. Em relação aos auto-anticorpos, o anticorpo anti-DNA estava presente em 10 indivíduos (26%) enquanto que os demais auto-anticorpos (anti-Ro, anti-La, anti-Sm ou anti-RNP), se revelaram em 12 dos 39 indivíduos (31%). Estes dados estão apresentados na tabela 1.

Quadro I - Relação dos indivíduos portadores de LES em estudo.

Nome	Idade	Dose Medicamento
S.L.T.	32 anos	3 mg Deflazacorte
N.S.P.	39 anos	5 mg Predinisona
M.M.G.	39 anos	-
C.S.F.	31 anos	10 mg Predinisona
V.R.F.	24 anos	5 mg Predinisona
M.A.N.	22 anos	5 mg Predinisona
C.F.C.F.	24 anos	10 mg Predinisona
M.V.O.	40 anos	5 mg Predinisona
M.I.A.	39 anos	5 mg Predinisona
M.L.S.M.	46 anos	-
A.C.	46 anos	5 mg Predinisona
M.C.C.	42 anos	5 mg Predinisona
N.F.L.S.	26 anos	5 mg Predinisona
V.O.S.	18 anos	5 mg Predinisona
G.C.C.	45 anos	5 mg Predinisona
A.T.S.	30 anos	5 mg Predinisona
M.A.F.R.	28 anos	5 mg Predinisona
E.R.G.	34 anos	10 mg Predinisona
M.C.M.	35 anos	5 mg Predinisona
N.M.S.R.	35 anos	5 mg Predinisona
D.T.P.	47 anos	-
E.M.F.M.	37 anos	5 mg Predinisona
M.A.O.	43 anos	-
E.A.B.F.M.	43 anos	5 mg Predinisona
M.J.F.	28 anos	5 mg Predinisona
N.C.S.A.	38 anos	5 mg Predinisona
L.F.S.	23 anos	5 mg Predinisona
I.A.S.	24 anos	-
C.D.S.	32 anos	10 mg Predinisona
R.C.S.C.S.	38 anos	5 mg Predinisona
M.L.B.	39 anos	10 mg Predinisona
F.R.A.	23 anos	-
S.A.E.	40 anos	10 mg Predinisona
V.L.C.A.	36 anos	10 mg Predinisona
S.M.S.	27 anos	5 mg Predinisona
D.A.A.O.L.	30 anos	5 mg Predinisona
G.C.C.	65 anos	10 mg Predinisona
E.A.R.	40 anos	-
A.P.S.S.	27 anos	10 mg Predinisona

Tabela 1 - Frequência das manifestações características da doença nos 39 indivíduos portadores de LES.

Caracteres	n	%
1. Lesões cutâneas, alopecia ou úlcera oral	38	97
2. Artrite, artralgia ou necrose asséptica	34	87
3. Distúrbio renal	15	38
4. Serosites *	15	38
5. Manifestações neuropsiquiátricas **	14	35
6. Alterações hematológicas ***	14	35
7. Célula LE	20	51
8. Fator anti-nuclear (FAN)	39	100
9. Anticorpo anti-DNA	10	26
10. Outros auto-anticorpos ****	12	31

*pleurite ou pericardite

**convulsão ou psicose.

***anemia hemolítica; leucopenia < 4000 ou plaquetopenia.

****anti-Sm; anti-Ro; anti-La; anti-RNP.

4.1.1 - Manifestações cutâneas

Um estudo mais detalhado sobre a manifestação de caracteres cutâneos foi realizado nos indivíduos portadores da doença. As variáveis foram: lesão malar (LM), lesão discóide (LD), fotossensibilidade (FS), alopecia (ALP) e úlcera oral (UO). A expressão de dois ou mais de dois caracteres no mesmo indivíduo não ocorreram necessariamente ao mesmo tempo, podendo ser observados tanto no início quanto na evolução da doença.

Segundo os dados, 27 (69%) do total dos 39 indivíduos apresentaram lesão malar; 3 (8%) apresentaram lesão discóide; 27 (69%) desenvolveram fotossensibilidade; 29 (74%) sofreram de alopecia e 14 indivíduos (36%) desenvolveram úlcera oral.

A tabela 2 apresenta estes resultados.

Tabela 2 - Frequência dos caracteres cutâneos em 39 portadoras de LES.

Manifestações		
cutâneas	n	%
Lesão malar	27	69,0
Lesão discóide	3	8,0
Fotossensibilidade	27	69,0
Alopecia	29	74,0
Úlcera oral	14	36,0

4.1.2 - Manifestações articulares

A manifestação de caracteres articulares como artrite (AR), artralgia (AL) e necrose asséptica da cabeça do fêmur (NA), foram observados nas 39 portadoras. De acordo com os dados, 25 mulheres (64%) desenvolveram

artrite; 29 (74%) apresentaram artralgia e 6 (15%) desenvolveram necrose asséptica. Os dados estão presentes na tabela 3.

Tabela 3 - Frequência dos caracteres articulares nas 39 portadoras de LES

Manifestações articulares	Total	
	n	%
1. Artrite	25	64,1
2. Artralgia	29	74,3
3. Necrose asséptica	6	15,4

4.1.3 - Serosas

A frequência da manifestação da serosite, que se caracteriza por pleurite (PL) ou pericardite (PR), foi observada nas 39 portadoras (tabela 4). Segundo as observações, a pleurite se desenvolveu em 11 indivíduos (28%) e a pericardite se manifestou em 12 portadoras (31%). A ocorrência de ambos os caracteres, tanto pleurite quanto a pericardite, se deu em 8 mulheres (20%).

Tabela 4 - Frequência da manifestação da pleurite e pericardite nas 39 portadoras de LES.

Serosites	Total	
	n	%
Pleurite	11	28,0
Pericardite	12	31,0
PL e PR	8	20,0

4.1.4 - Análise da frequência do fator anti-nuclear (FAN) quanto ao título e ao padrão nos indivíduos portadores de LES

Foi realizado estudo da frequência do fator anti-nuclear em indivíduos portadores da doença quanto ao título de fluorescência nuclear. Do total dos 37 indivíduos, as seguintes observações foram feitas: 1 indivíduo (3%) apresentou título 1/20; 1 (3%), título 1/40; 4 (11%) apresentaram título 1/80; 8 (22%) revelaram título 1/160; 1 (3%) apresentou título 1/200; 5 (14%) revelaram título 1/320; 1 deles (3%) apresentou título 1/640 contra 5 (13%), nos quais o título foi 1/1280. Os demais valores como 1/2000, 1/2560, 1/5120 e 1/10000 foram observados em, respectivamente, 1 (3%), 6 (16%), 3 (8%) e finalmente em 1 indivíduo (3%).

Esta distribuição está ilustrada no histograma de frequências relativas (figura 1). Segundo o histograma, as classes onde ocorrem os maiores

números de observações são as que abrangem os títulos $1/160$ e $1/2520$ (7,3 e 11,3 respectivamente), onde as frequências são de 24 e 19%. As classes extremas, isto é, onde os títulos são $1/20$ e $1/10000$ (4,3 e 13,3) revelam os menores números de observações, onde as frequências são de 2,5%. Diante da distribuição de frequência desta amostra, podemos observar uma tendência para uma distribuição bimodal.

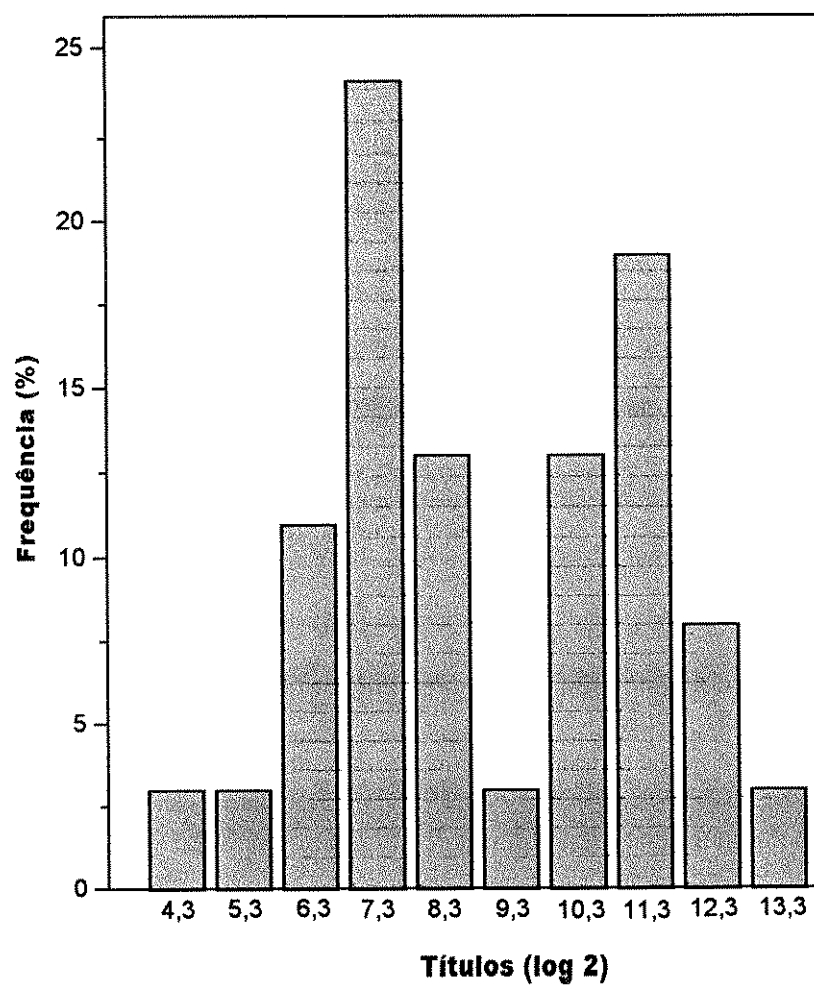


Figura 1 - Frequência dos títulos do FAN em 37 portadoras de LES.

4.2 - Determinação sérica do sulfato de DHEA

Amostras de soro de 20 indivíduos portadores de LES assim como 15 amostras sorológicas dos indivíduos do grupo controle foram utilizadas para a dosagem hormonal. Segundo os dados, o sulfato de DHEA (DHEA-S) mostrou-se detectável ($\geq$ a 6 $\mu\text{g/dl}$) em todos os indivíduos lúpicos, porém significativamente diminuído, segundo o teste *t* de Student, quando os níveis de secreção deste hormônio foram comparados aos do grupo controle ($p < 0,001$). Os valores do DHEA-S mostraram uma variação de 10 a 193,12 $\mu\text{g/dl}$ ($50,3 \pm 44,9 \mu\text{g/dl}$) nos indivíduos lúpicos enquanto que as amostras do grupo controle variaram de 153,89 a 400,23 $\mu\text{g/dl}$ ($253 \pm 79,9 \mu\text{g/dl}$). A figura 2 mostra esta distribuição.

4.3 - Determinação sérica do hormônio DHEA

A dosagem do hormônio DHEA foi realizada em 20 amostras de soro de indivíduos lúpicos assim como no soro dos 15 indivíduos do grupo controle. Conforme os dados da tabela 5, o hormônio mostrou-se detectável ($\geq 0,5 \text{ ng/ml}$) em apenas 11 dos 20 indivíduos portadores da doença (55%) e não detectável ($< 0,5 \text{ ng/ml}$) em 45% do grupo. Todos os representantes do grupo controle apresentaram níveis hormonais detectáveis. A variação deste hormônio foi de 0,56 a 2,51 ng/ml ($1,0 \pm 0,7 \text{ ng/ml}$) e 2,4 a 11,2 ng/ml ($5,0 \pm$

2,6 ng/ml) nos indivíduos lúpicos e controle, respectivamente. A figura 3 mostra os resultados individuais de ambos os grupos no qual os valores obtidos pertencentes ao grupo de indivíduos portadores de LES mostram-se significativamente diminuídos em relação ao controle ($p < 0,0001$).

Tabela 5 - Determinação do hormônio DHEA em lúpicas e no grupo controle.

		Lúpicas		Controle	
DHEA		n	(%)	n	(%)
Detectável	($\geq 0,5$ ng/ml)	11	55	15	100
Não detectável	(< 0,5 ng/ml)	09	45	0	0
Total		20		15	

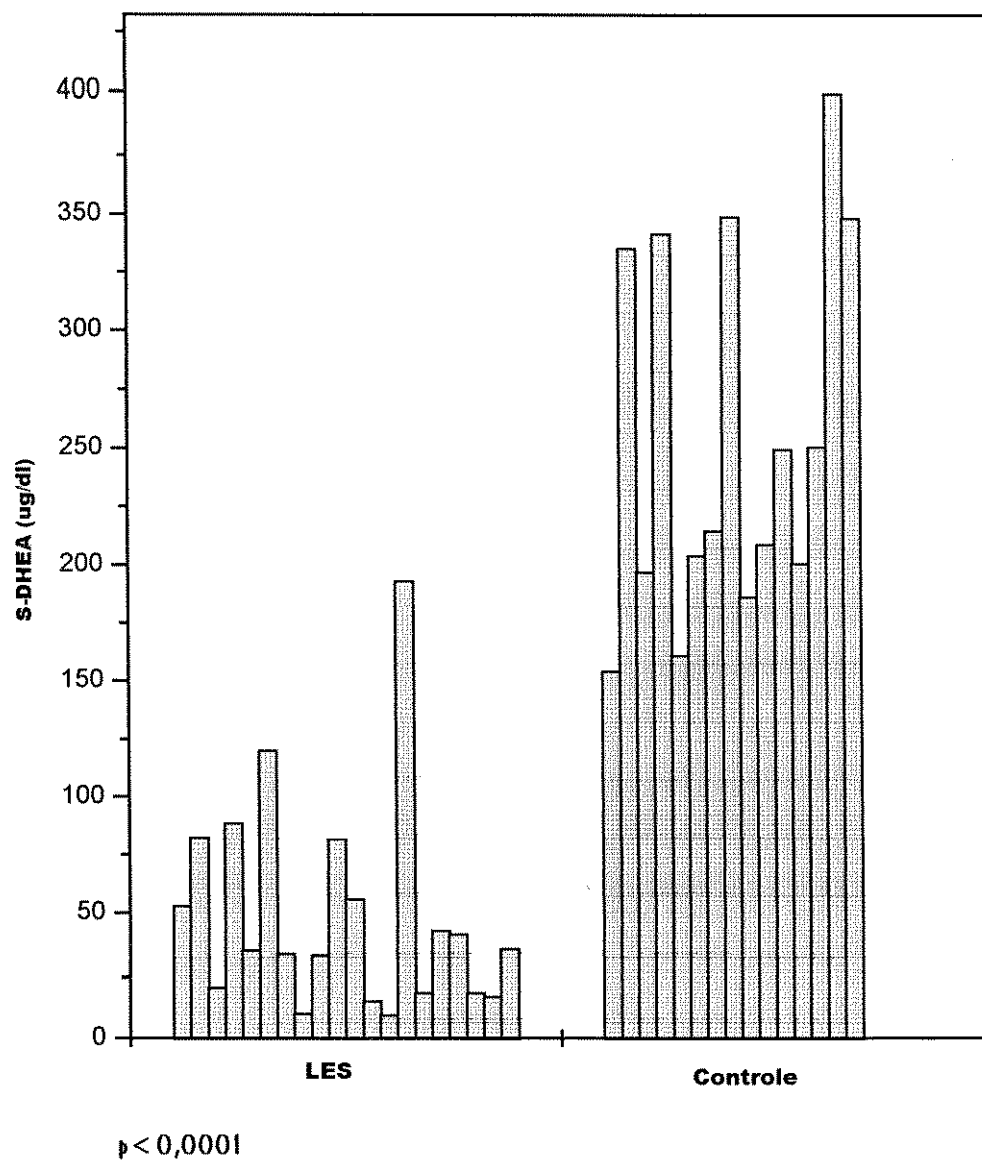
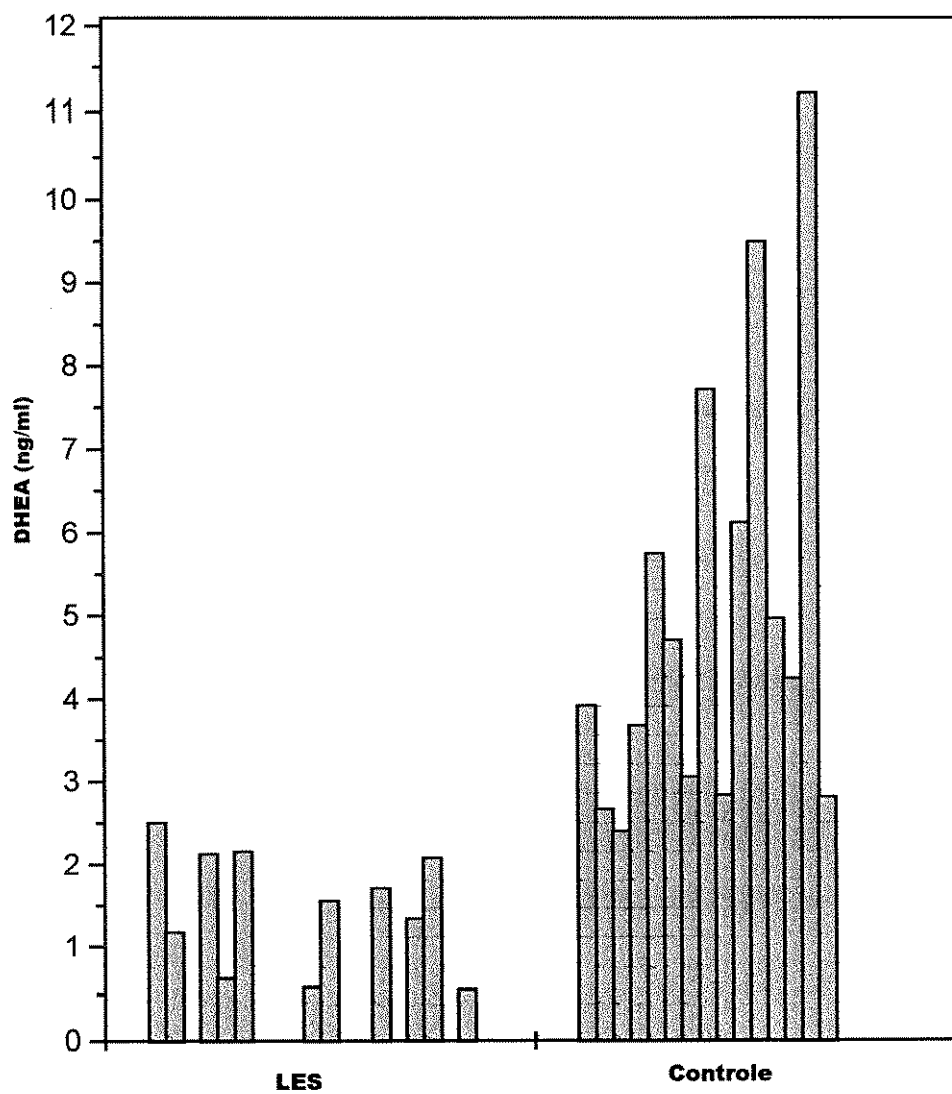


Figura 4 - Níveis séricos de S-DHEA (ug/dl) em indivíduos portadores de LES e no grupo controle.



$p < 0,0001$

Figura 3 - Níveis séricos de DHEA (ng/ml) em indivíduos portadores de LES e no grupo controle.

4.4 - Quantificação da IL-2

4.4.1 - Quantificação da IL-2 em sobrenadante de cultura de células mononucleares sob estímulo da PHA

A quantificação dos níveis de IL-2 foi realizada em 12 amostras de sobrenadante de cultura de células do grupo de lúpicos, estimulados com PHA, assim como em 12 amostras do grupo de indivíduos controle, também sob o mesmo estímulo. De acordo com os dados apresentados na tabela 6, a IL-2 mostrou-se detectável ($\geq$ ou $=$ a 0,5 pg/ml) em 9 indivíduos lúpicos (75%) e não detectável ($<$ 0,5 pg/ml) em apenas 25% deste grupo, isto é, em 3 indivíduos. Todos os representantes do grupo controle apresentaram níveis detectáveis desta citocina. Os valores obtidos variaram de 6,36 a 1500,8 pg/ml ($368,42 \pm 549,9$ pg/ml) nos indivíduos lúpicos enquanto que a variação dos níveis da IL-2 nos indivíduos controle foi de 18,68 a 1945,22 pg/ml ($506,14 \pm 653,8$ pg/ml). Estes resultados estão presentes na figura 4. A análise estatística, realizada através do teste não paramétrico, não mostrou diferenças significativas entre os grupos.

Tabela 6 - Determinação da IL- 2 em lúpicos e no grupo controle.

IL-2	Lúpicos		Controle	
	n	(%)	n	(%)
Detectável ($\geq$ 0,5 pg/ml)	9	75	12	100
Não detectável ($<$ 0,5 pg/ml)	3	25	0	0
Total	12		12	

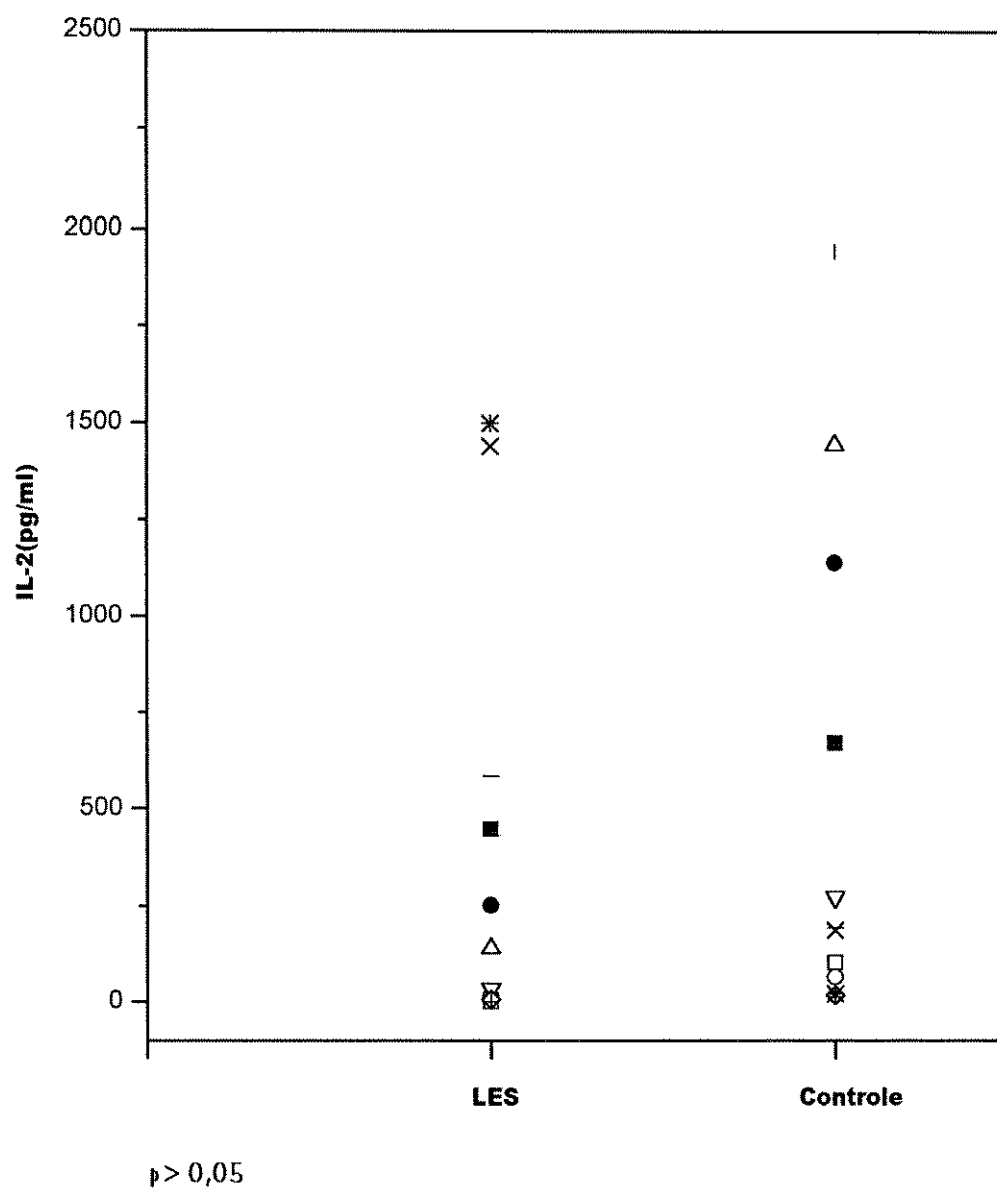


Figura 4 - Níveis de IL-2 (pg/ml), sob estímulo da PHA, em indivíduos portadores de LES e no grupo controle

Os resultados relativos à produção da IL-2 em sobrenadante de cultura sob estímulo da PHA tanto em lúpicas quanto nos indivíduos do grupo controle também foram analisados através da distribuição de frequências. A figura 5 mostra os histogramas de frequências relativas destes dois grupos. Segundo os dados, em ambos os casos, a classe que apresentou o maior número de observações foi a que abrangeu valores no intervalo entre 1 e 300 pg/ml, onde as frequências atingiram valores de 42% (média = 109,4 pg/ml) e 67% (média = 89,4 pg/ml) nos grupos dos indivíduos lúpicos e controle, respectivamente. Em relação à classe representando as amostras não detectáveis (ND) para a citocina, esta abrangeu 25% do total das 12 observações no grupo das lúpicas, enquanto que no grupo controle, todas as amostras apresentaram valores detectáveis (já representado na tabela anterior). Como a grande maioria dos valores está compreendida nestes dois intervalos, as demais classes tornam-se pouco representativas. Ambos os grupos revelaram valores entre 1 e 1500 pg/ml, reforçando a não relevância em termos de significância entre os grupos.

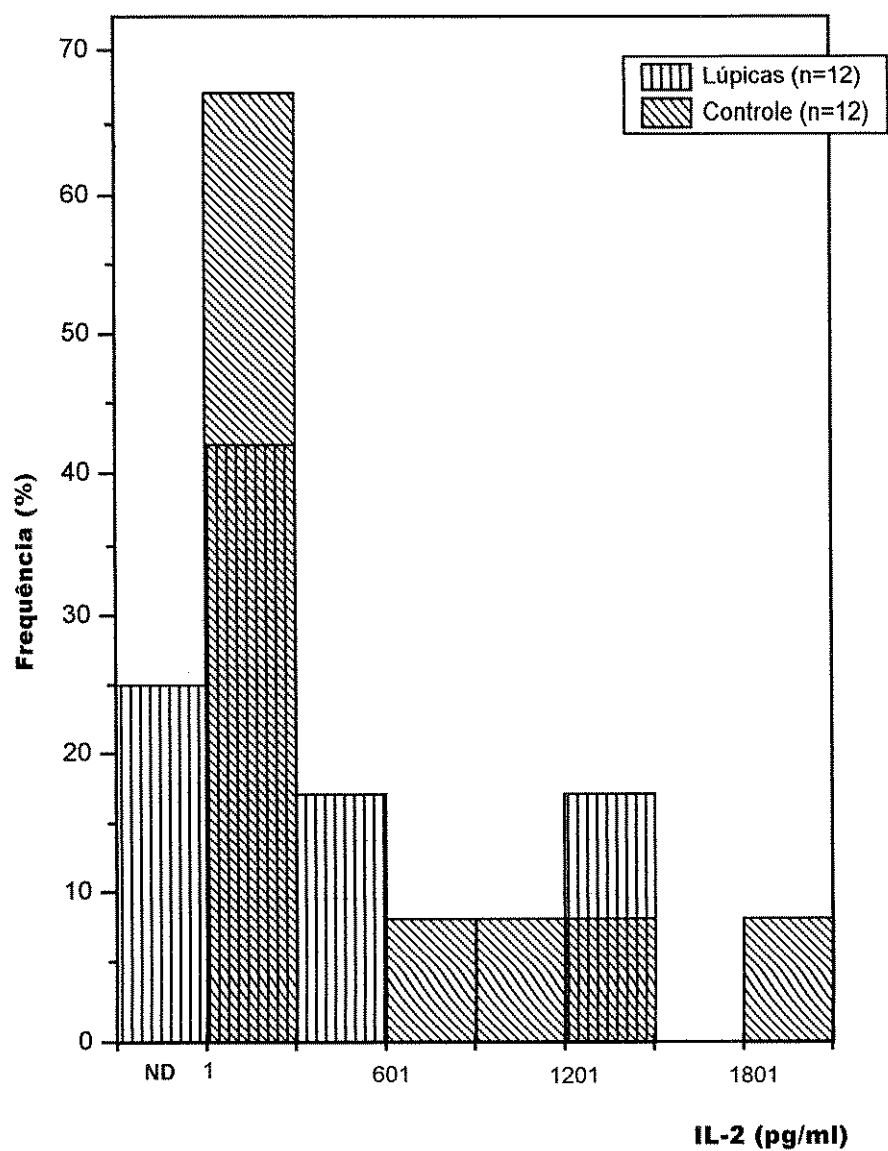


Figura 5 - Distribuições de frequências para os níveis de IL-2 (pg/ml) sob estímulo da PHA em lúpicas e no grupo controle.

4.4.2 - Análise do padrão de produção de IL-2 em sobrenadante de cultura de células mononucleares sob estímulo da PHA combinada a DHEA em indivíduos portadores de LES

Com o intuito de se estudar a influência do hormônio DHEA na produção de IL-2 em portadoras de LES, as doze amostras de sobrenadante de cultura de células mononucleares que receberam estímulo da PHA foram comparadas às 12 amostras de sobrenadante estimulados com o mitógeno combinado ao hormônio, para um mesmo indivíduo. Segundo os dados, 25% do grupo, isto é, 3 indivíduos, não apresentaram variação no nível de produção da IL-2, permanecendo a citocina indetectável mesmo quando o hormônio DHEA era administrado. Trinta e três por cento das lúpicas, representadas por 4 indivíduos, apresentaram um aumento na produção da citocina, muito embora em 3 deles, esta variação tenha sido muito discreta (+9,86; +9,86; +22,8 pg/ml). Quanto a alteração em termos de diminuição do nível da IL-2 diante a administração da DHEA, esta foi percebida em 42% da população, isto é, em 5 indivíduos, onde apenas um deles apresentou uma acentuada diminuição na produção da citocina (-1316 pg/ml). As tabelas 7 e 8 e a figura 6 mostram estes resultados. A análise estatística, realizada por teste não paramétrico não mostra significância entre os grupos.

Tabela 7 - Variação do padrão de produção de IL-2 (pg/ml) em sobrenadante de cultura de células mononucleares sob estímulo de PHA e PHA+DHEA no grupo de indivíduos portadores de LES

PHA	PHA+DHEA	VARIAÇÃO ¹
n.d.	n.d.	-
14,37	24,23	+ 9,86
139,48	n.d.	-139,48
34,09	n.d.	-34,09
6,36	16,22	+9,86
n.d.	n.d.	-
1441,09	124,07	-1316,02
1500,7	1425,7	-75,0
585,7	833,43	+247,73
n.d.	n.d.	-
446,4	469,2	+22,8
252,88	210,97	-41,91

1- o cálculo da variação se deu pela diferença entre o grupo tratado com dhea e o não tratado; + aumento; - diminuição.

n.d. = não detectável

Obs.: no ensaio linfoproliferativo sem estímulo, todos os valores foram indetectáveis.

Tabela 8 - Comportamento do padrão da IL-2 em sobrenadante de cultura de células mononucleares estimulados com a PHA associada a DHEA em relação ao estímulo com o mitógeno.

IL-2 perante administração da DHEA	Lúpicas	
	n	%
Aumento	4	33,0
Diminuição	5	42,0
Estável	3	25,0
Total	12	100,0

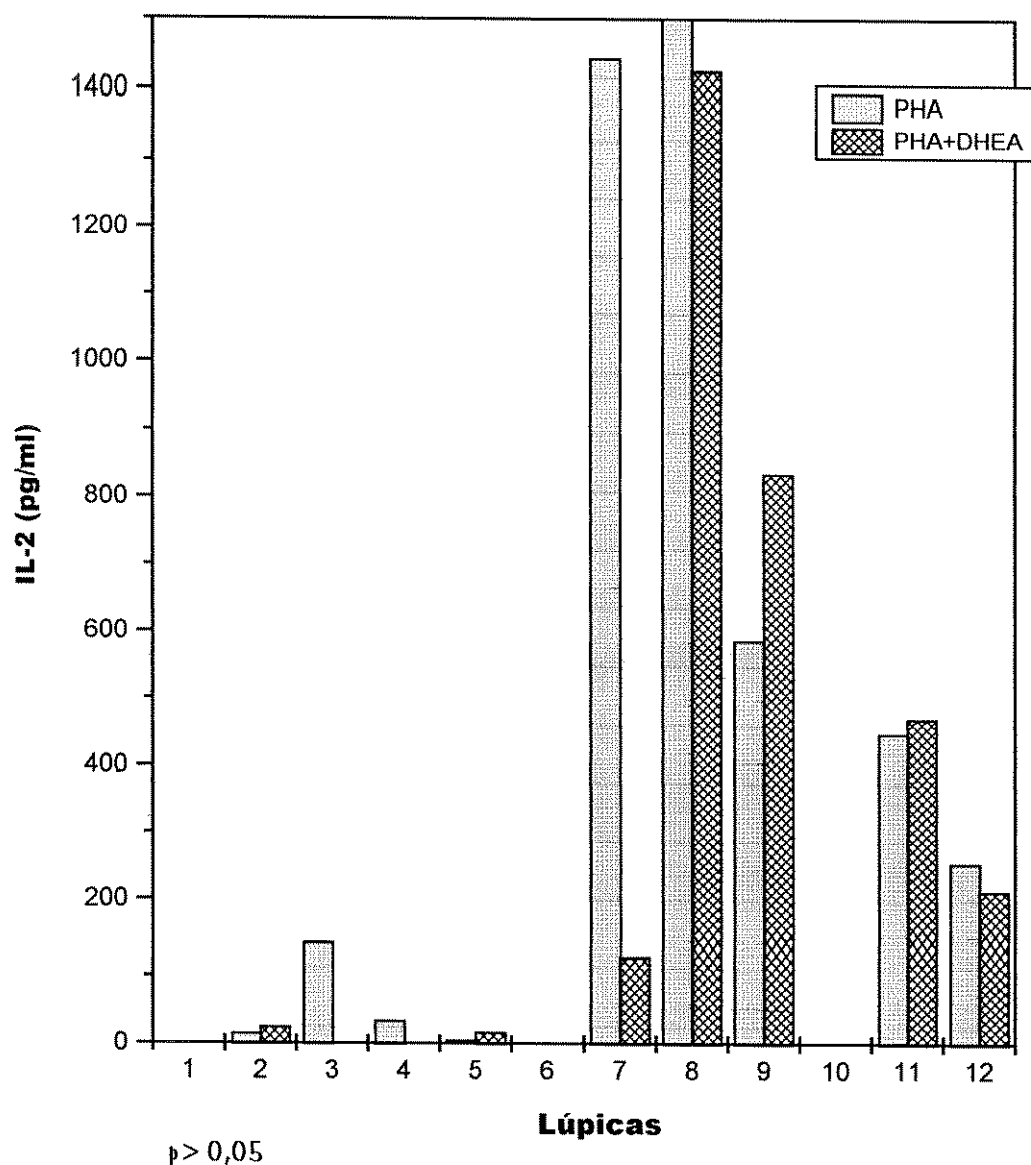


Figura 6 - Níveis de IL-2 (pg/ml) sob o estímulo da PHA e PHA+DHEA no mesmo indivíduo do grupo das portadoras de LES.

As distribuições de frequências para a IL-2 resultante de sobrenadante de cultura de células mononucleares sob estímulo da PHA e PHA combinada a DHEA no grupo das lúpicas estão representadas por histogramas e apresentadas na figura 7. Segundo a análise dos histogramas, a frequência foi maior no grupo tratado com PHA combinada ao hormônio (42%) em relação ao não tratado (25%), na classe que compreende as amostras não detectáveis (ND) para a IL-2. Em relação ao intervalo que abrange os valores entre 1 e 300 pg/ml, o grupo tratado revelou uma frequência menor (33%) em relação ao grupo que não recebeu estímulo hormonal (42%). As médias destes dois grupos tratado e não tratado foram 93,8 e 89,4 pg/ml, respectivamente. Como a grande maioria das observações está compreendida nestes dois intervalos, as demais classes tornam-se pouco representativas. Os histogramas se sobrepõem entre os valores “zero” (ND) e 1500 pg/ml, reforçando a irrelevância em termos de significância entre os grupos.

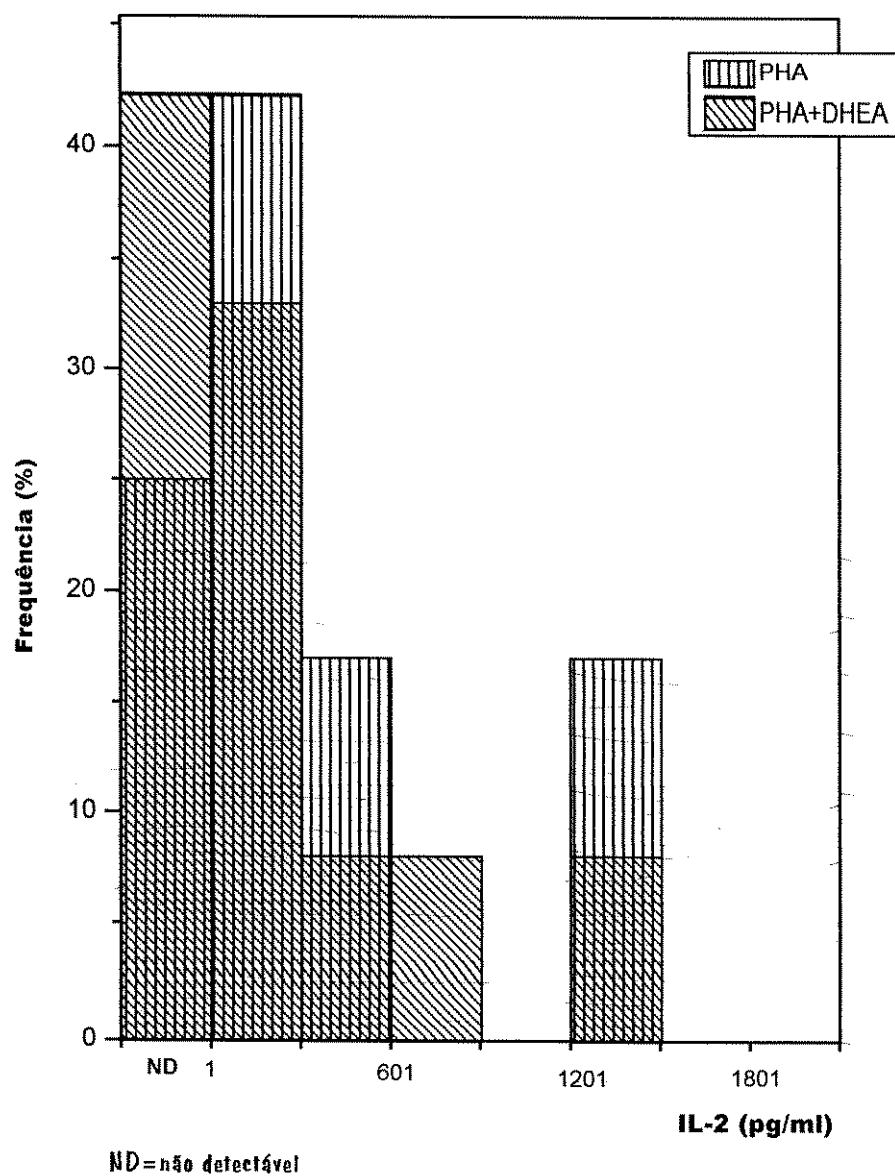


Figura 7- Distribuições das frequências para os níveis de IL-2 (pg/ml) sob estímulo da PHA e PHA combinada a DHEA em lúpicas.

4.4.3 - Análise do padrão de produção de IL-2 em sobrenadante de cultura de células mononucleares sob estímulo da PHA combinada a DHEA em indivíduos do grupo controle

Objetivando-se avaliar a influência do hormônio DHEA na produção da IL-2 em indivíduos do grupo controle, foram analisadas 24 amostras de sobrenadante de cultura de células mononucleares, resultantes de 12 indivíduos, conforme descrição anterior. Segundo os dados, observou-se que 58% do grupo, representada por 7 indivíduos, apresentaram um aumento na produção da IL-2, sendo que a variação em 2 deles foi muito discreta (+9,86; +13,56 pg/ml). O padrão de síntese da IL-2 sofreu alteração em termos de diminuição em 33% da população, isto é, em 4 indivíduos do grupo. Não houve alteração na produção da citocina em apenas um indivíduo. Os dados compõem as tabelas 9 e 10. O teste não paramétrico aplicado aos grupos também não releva os resultados em termos de significância. A figura 8 mostra esta distribuição.

Tabela 9 - Variação do padrão de produção de IL-2 (pg/ml) em sobrenadante de cultura de células mononucleares sob estímulo de PHA e PHA+DHEA em indivíduos do grupo controle.

PHA	PHA+DHEA	VARIAÇÃO ¹
102,50	568,42	+465,92
65,52	21,77	-43,75
1442,9	1830,59	+387,69
271,98	144,41	-127,57
18,68	28,54	+9,86
12,52	26,08	+13,56
188,17	59,36	-118,81
21,77	83,40	+61,63
193,90	188,17	-5,73 ²
1945,22	1860,17	-85,05
670,11	1343,10	+672,99
1139	1725,82	+586,82

1 - o cálculo da variação se deu pela diferença entre o grupo tratado com dhea e o grupo não tratado; + aumento; - diminuição.

2 -a variação foi desconsiderada (< 9,5 pg/ml)

Obs.:no ensaio linfoproliferativo sem estímulo, todos os valores foram indetectáveis.

Tabela 10 - Comportamento do padrão da IL-2 em sobrenadante de cultura de células mononucleares estimuladas com a PHA associada a DHEA em relação ao estímulo com o mitógeno.

IL-2 perante administração da DHEA	Controle	
	n	%
Aumento	7	58,0
Diminuição	4	33,0
Estável	1	8,0
Total	12	99,00

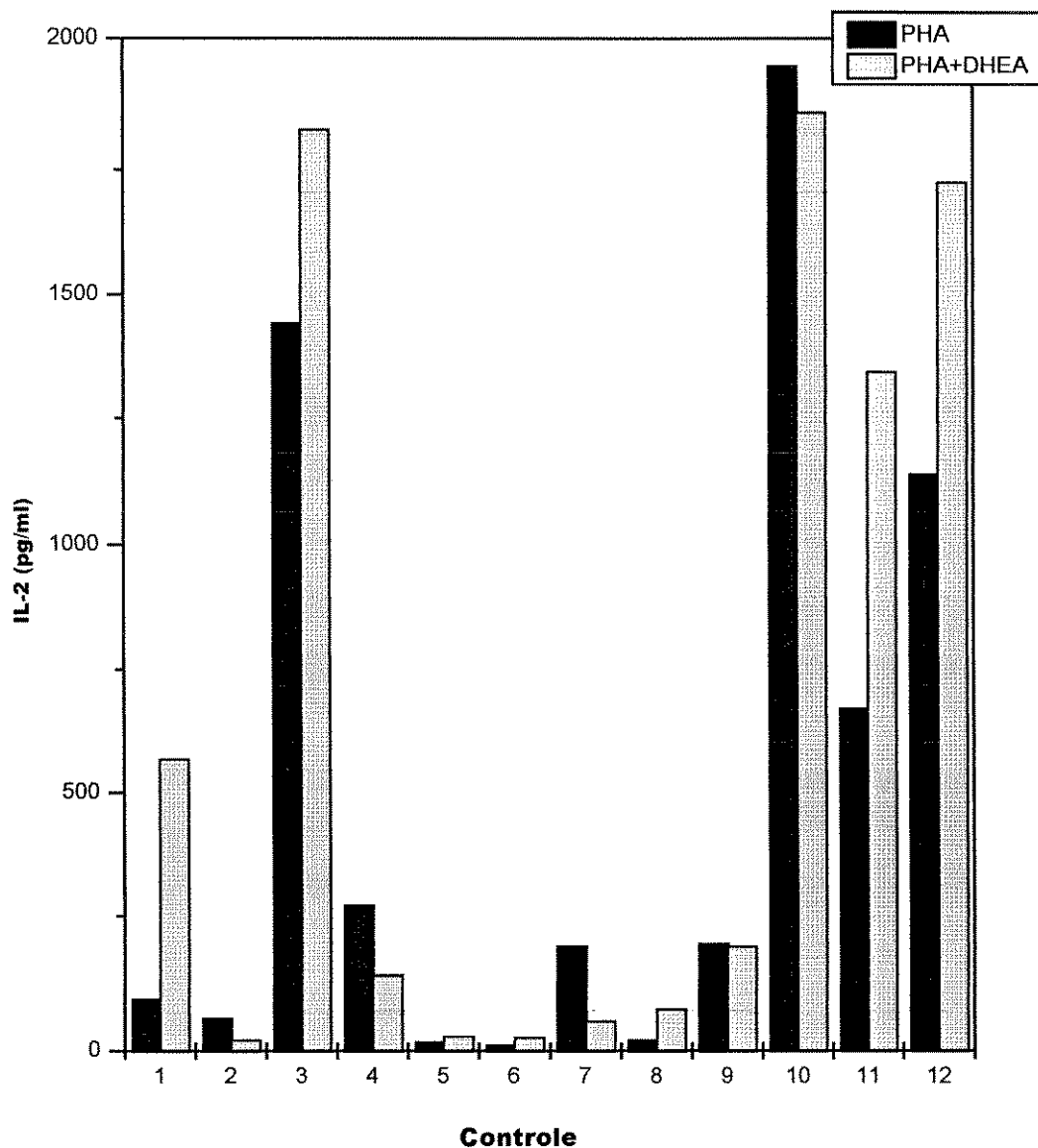


Figura 8 - Níveis de IL-2 (pg/ml) sob o estímulo de PHA e PHA combinada a DHEA no mesmo indivíduo do grupo controle.

Os histogramas das frequências relativas, representativos das distribuições de frequências para a IL-2 oriunda de sobrenadante de cultura de linfócitos sob estímulo da PHA e da PHA combinada ao hormônio DHEA, em indivíduos do grupo controle, estão apresentados na figura 9. A análise destes dois grupos - tratado com DHEA e não tratado - mostra que a grande maioria dos dados compõem a classe que abrange os valores entre 1 e 300 pg/ml, onde a frequência observada foi de 58% (média = 78,8 pg/ml) e 67% (109,4 pg/ml), nos grupos tratado e não tratado, respectivamente. Todas as amostras foram detectadas pelo ensaio. Como a grande maioria das observações pertencem à classe que compreende valores entre 1 e 300 pg/ml, as demais tornam-se pouco representativas. Os histogramas se sobrepõem num mesmo intervalo, isto é, entre 1 e 2101 pg/ml, reforçando a não relevância em termos de significância entre os grupos.

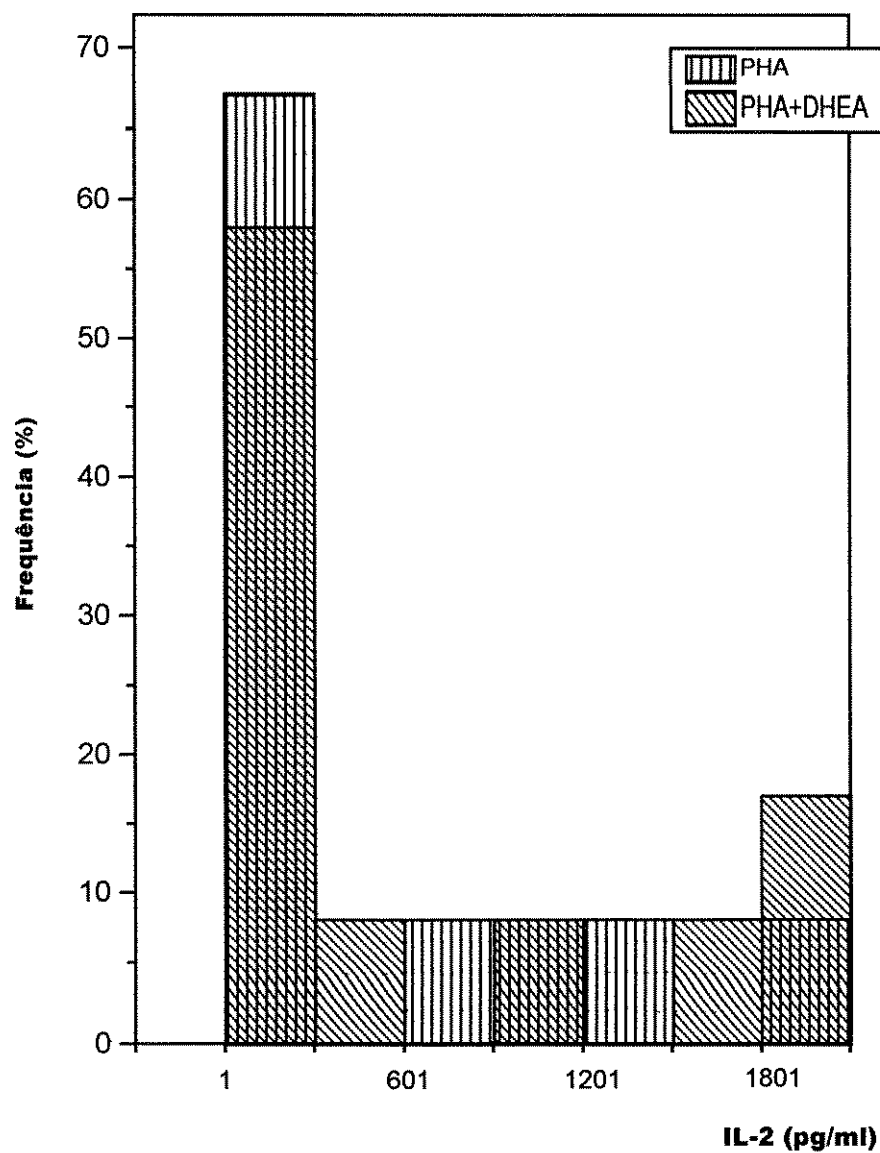


Figura 9 - Distribuições de frequências para os níveis de IL-2 (pg/ml) sob estímulo da PHA e PHA combinada a DHEA em indivíduos do grupo controle.

4.5 - Quantificação da IL- 4

4.5.1 - Quantificação da IL- 4 em sobrenadante de cultura de células mononucleares estimulados com PHA

A quantificação dos níveis de IL- 4 se deu através da análise de 15 amostras de sobrenadante de cultura de células mononucleares provenientes de indivíduos lúpicos, assim como em 11 amostras dos indivíduos pertencentes ao grupo controle, todas elas sob o estímulo de PHA. De acordo com os dados presentes na tabela 11, a IL- 4 se mostrou detectável ($\geq 0,5$ pg/ml) em 53% do grupo lúpico, equivalente a 8 do total de 15 indivíduos (53%), e não detectável ($< 0,5$ pg/ml) em 7 indivíduos, o que representa 47% desta subpopulação. Quanto aos indivíduos do grupo controle, 7 deles (67%) apresentaram níveis detectáveis da citocina contra os 5 dos 11 indivíduos (33%) do mesmo grupo, nos quais a IL- 4 não foi detectada. Os valores obtidos variaram de 6,05 a 408,50 pg/ml ($72,12 \pm 115,08$ pg/ml) no grupo das lúpicas, enquanto que a variação nos indivíduos do grupo controle foi de 0,74 a 331,76 pg/ml ($85,92 \pm 141,76$ pg/ml). Estes resultados estão apresentados na figura 10. Segundo a análise estatística, realizada através do teste não paramétrico, não há diferenças significativas entre os grupos quanto a produção da IL- 4.

Tabela 11 - Determinação da IL- 4 em lúpicas e no grupo controle

IL- 4	Lúpicas		Controle	
	n	%	n	%
Detectável (> 0,5 pg/ml)	8	53,0	7	64,0
Não detectável (< 0,5 pg/ml)	7	47,0	4	36,0
Total	15	100,0	11	100,0

Com a finalidade de se visualizar melhor o padrão da produção da IL-4, resultante de sobrenadante de cultura de células mononucleares sob o estímulo da PHA, nos grupos lúpico e controle, os valores foram organizados em classes de distribuição de frequências, representadas pelos histogramas das frequências relativas (figura 11). Os histogramas mostram que, a grande maioria das observações, tanto no grupo portador (94%) como no grupo controle (81%), pertencem às classes abrangem amostras não detectáveis (ND) para a IL-10 e entre 1 e 300 pg/ml. Os valores, em ambos os casos, apresentam a mesma amplitude de dispersão, e as frequências relativas às classes são muito próximas quando comparadas entre os grupos. Desta forma, não há como relevar os grupos em termos de significância.

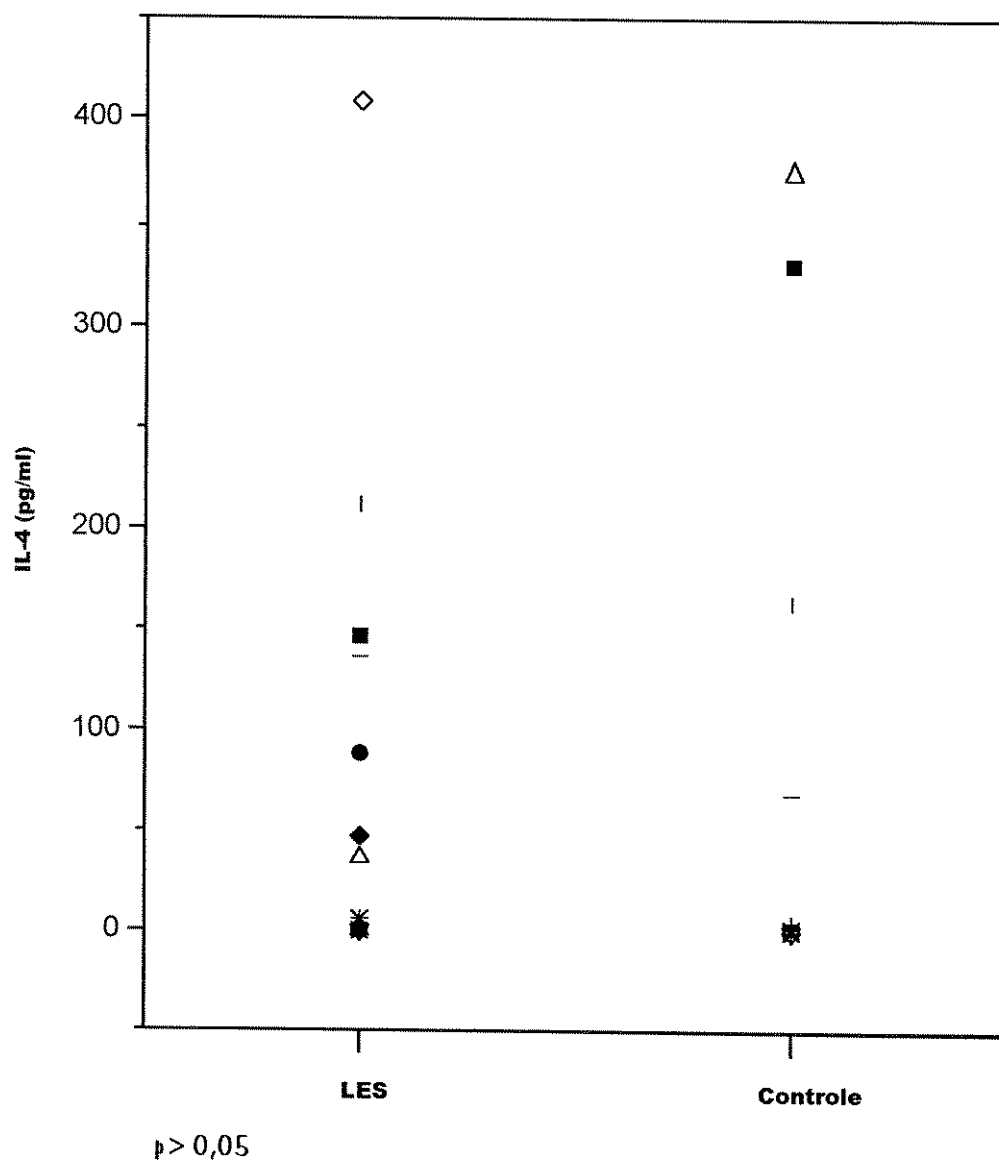


Figura 10 - Níveis da IL-4 (pg/ml) sob estímulo da PHA em lúpicas e no grupo controle.

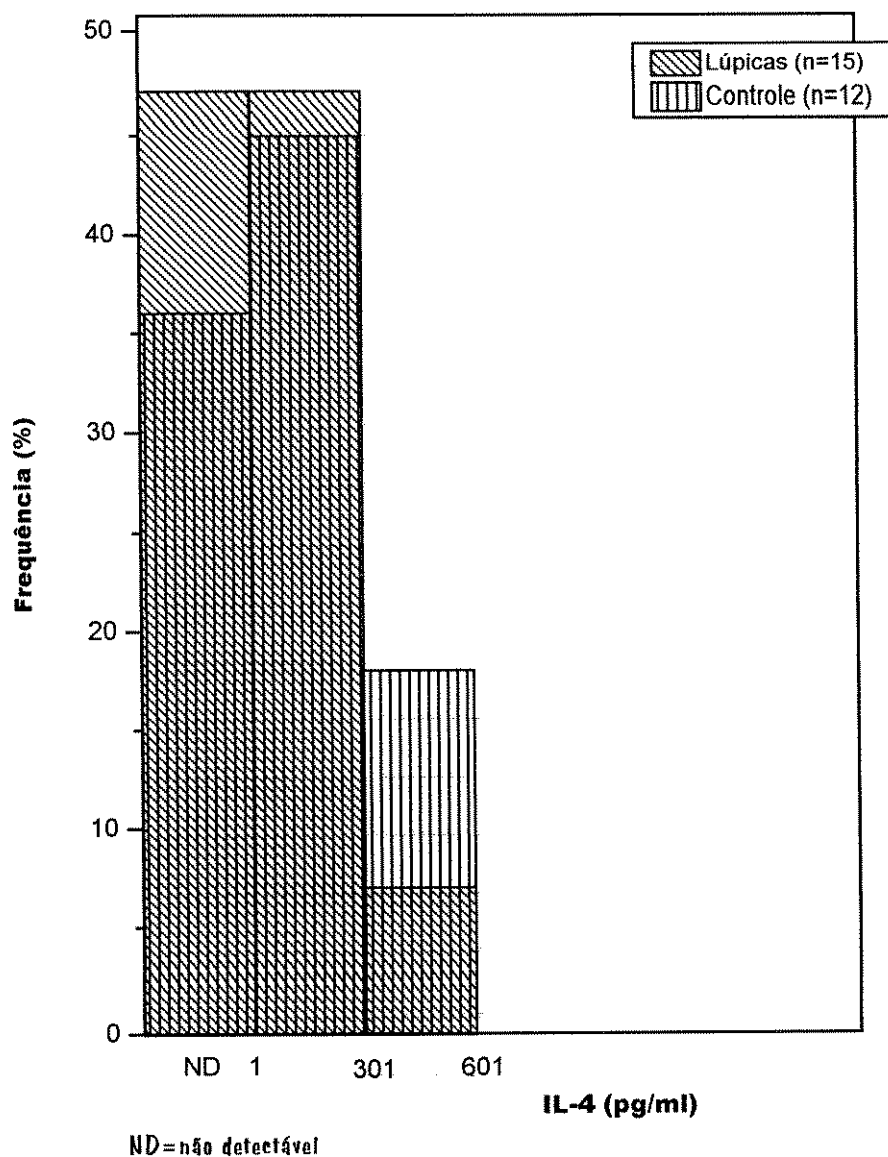


Figura 11 - Distribuições de frequências para os níveis de IL-4 (pg/ml) sob estímulo da PHA em lúpicas e no grupo controle.

4.5.2 - Análise do padrão de produção da IL- 4 em sobrenadante de cultura de células mononucleares sob estímulo da PHA combinada a DHEA em indivíduos portadores de LES

Com o objetivo de se averiguar a influência do hormônio DHEA na produção da IL- 4 em portadores de LES, as 15 amostras de sobrenadante de cultura de células mononucleares que receberam estímulo da PHA combinada ao hormônio, foram comparadas às 15 amostras de sobrenadante resultante de ensaio linfoproliferativo estimulado apenas com o mitógeno, todos para um mesmo indivíduo. Analisando-se os resultados, foi verificado que 27% do grupo, representados por 4 indivíduos, apresentaram um aumento na produção da IL- 4 contra 13% (2 indivíduos), os quais revelaram uma diminuição no nível da citocina. Não houve alteração na produção da IL- 4 em 60% do grupo das lúpicas, isto é, em 9 indivíduos. Estes dados estão presentes nas tabelas 12 e 13 e também na figura 12. A análise estatística não releva estas alterações em termos de significância.

Tabela 12 - Variação do padrão de produção da IL- 4 (pg/ml) em sobrenadante de células mononucleares sob o estímulo da PHA e PHA+DHEA no grupo de indivíduos portadores de LES.

PHA	PHA+DHEA	Variação *
n.d.	n.d.	-
n.d.	4,01	+4,01
n.d.	n.d.	-
408,50	204,82	-203,68
n.d.	n.d.	-
n.d.	n.d.	-
6,05	1,56	-4,49
136,66	207,27	+70,61
212,17	228,09	+15,92
146,46	166,05	+19,59
88,50	70,54	-17,96
n.d.	n.d.	-
n.d.	12,17	+12,17
n.d.	n.d.	-
47,27	50,97	+3,7

* o cálculo da variação se deu pela diferença entre o grupo tratado com dhea e o grupo não tratado; +aumento; -diminuição.

Obs. no ensaio linfoproliferativo sem estímulo, todos os valores foram indetectáveis.

Tabela 13 - Comportamento do padrão da IL- 4 em sobrenadante de cultura de células mononucleares estimulados com a PHA associada a DHEA em relação ao estímulo com o mitógeno.

IL- 4 perante administração da DHEA	Lúpicas	
	n	%
Aumento	4	27,0
Diminuição	2	13,0
Estável	9	60,0
Total	15	100,0

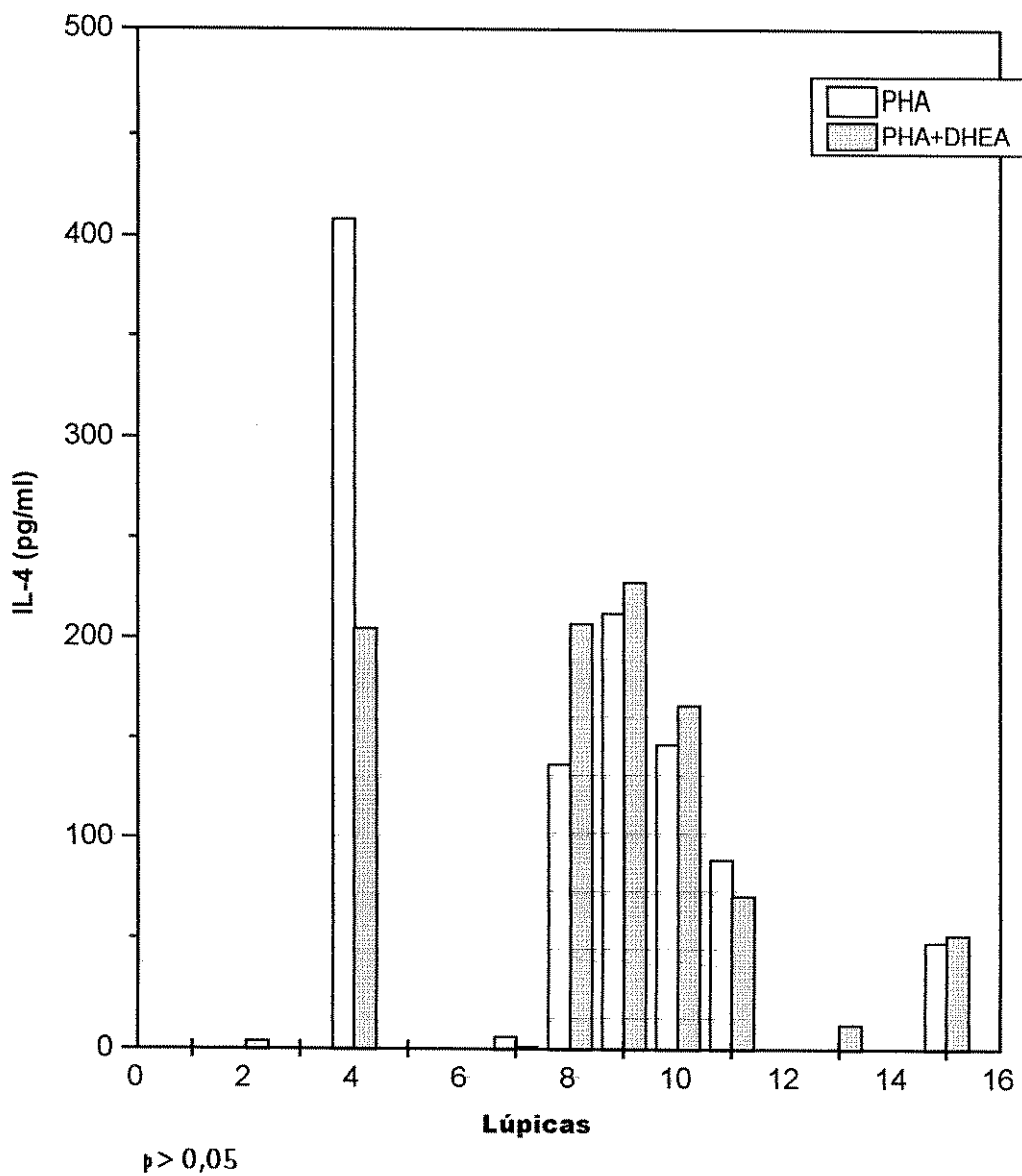


Figura 12 - Níveis da IL-4 (pg/ml) sob estímulo da PHA e PHA combinada a DHEA no mesmo indivíduo no grupo das portadoras de LES.

Quanto às distribuições de frequências para IL-4, resultante de sobrenadante de cultura de células mononucleares estimulados com PHA e PHA combinada ao hormônio DHEA, no grupo das portadoras da doença, os histogramas relativos aos grupos (figura 13) mostram que, no grupo tratado com o hormônio, a frequência das observações aumentou de 47% para 67%, no intervalo entre 1 e 300 pg/ml (média = 99,8 pg/ml), quando comparado ao grupo não tratado (média = 96,2 pg/ml). Por outro lado, em relação à classe que compreende as amostras não detectáveis, a frequência do grupo tratado diminuiu de 47% para 33% quando o hormônio foi administrado às culturas de células mononucleares. Considerando-se a terceira classe da distribuição (intervalo entre 301 e 601 pg/ml), muito pouco representativa, os valores mostram-se, em ambos os grupos, dispersos num mesmo intervalo, reforçando a não relevância das observações em termos de significância entre eles.

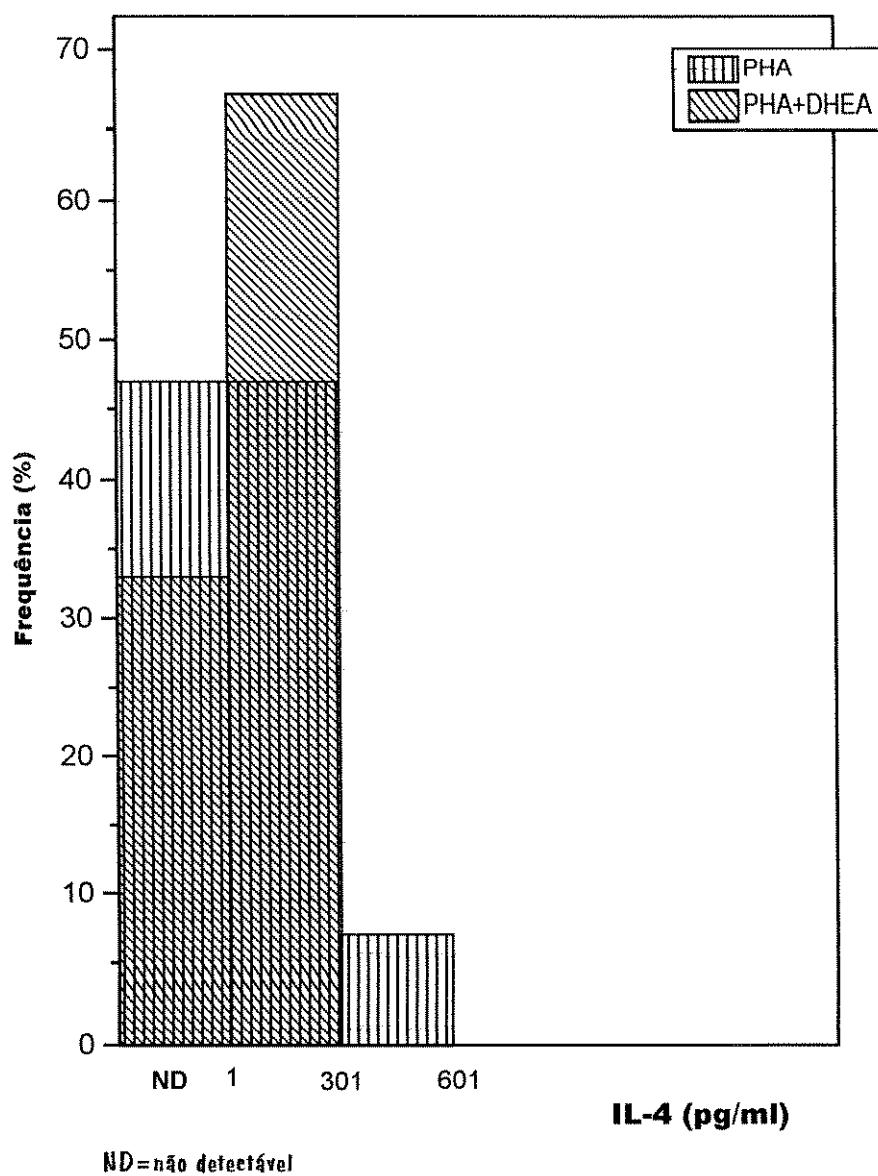


Figura 13 - Distribuições de frequências para os níveis de IL-4 (pg/ml) sob estímulo da PHA e PHA +DHEA em lúpicas.

4.5.3 - Análise do padrão de produção da IL- 4 em sobrenadante de cultura de células mononucleares sob estímulo da PHA combinada a DHEA em indivíduos do grupo controle

A fim de se averiguar a influência do hormônio DHEA na produção da IL- 4 em indivíduos do grupo controle, onze amostras de sobrenadante de cultura de células mononucleares estimulados com a PHA associada ao hormônio foram comparadas às 11 amostras de sobrenadante, resultante de ensaio linfoproliferativo apenas sob o estímulo do mitógeno, conforme descrição anterior. Diante da administração hormonal, os resultados revelam que apenas 3 indivíduos (27%) apresentaram um aumento na produção da IL- 4 e somente 1 deles apresentou uma diminuição na síntese desta citocina após a adição da DHEA. Os demais (64%) apresentaram uma estabilidade na produção da IL- 4. As tabelas 14 e 15 e a figura 14 mostram estes resultados. A análise estatística por teste não paramétrico não releva estas alterações em termos de significância.

Tabela 14 - Variação do padrão de produção da IL- 4 (pg/ml) em sobrenadante de cultura de células mononucleares sob estímulo da PHA e PHA+DHEA no grupo de indivíduos controle.

PHA	PHA+DHEA	Variação *
0,74	n.d.	-0,74
n.d.	n.d.	-
375,03	208,50	-166,53
n.d.	n.d.	-
n.d.	n.d.	-
4,01	n.d.	-4,01
1,56	7,68	-6,12
n.d.	n.d.	-
68,50	159,52	+91,02
163,60	241,97	+78,37
331,76	476,25	+144,49

* o cálculo da variação se deu pela diferença entre o grupo tratado com dhea e o grupo não tratado; +aumento; -diminuição.

Obs. no ensaio linfoproliferativo sem estímulo, todos os valores foram indetectáveis.

Tabela 15 - Comportamento do padrão da IL- 4 (pg/ml) em sobrenadante de cultura de células mononucleares estimulados com PHA associada a DHEA em relação ao estímulo com o mitógeno.

IL- 4 perante administração da DHEA	Controle	
	n	%
Aumento	3	27,0
Diminuição	1	9,0
Estável	7	64,0
Total	11	100,0

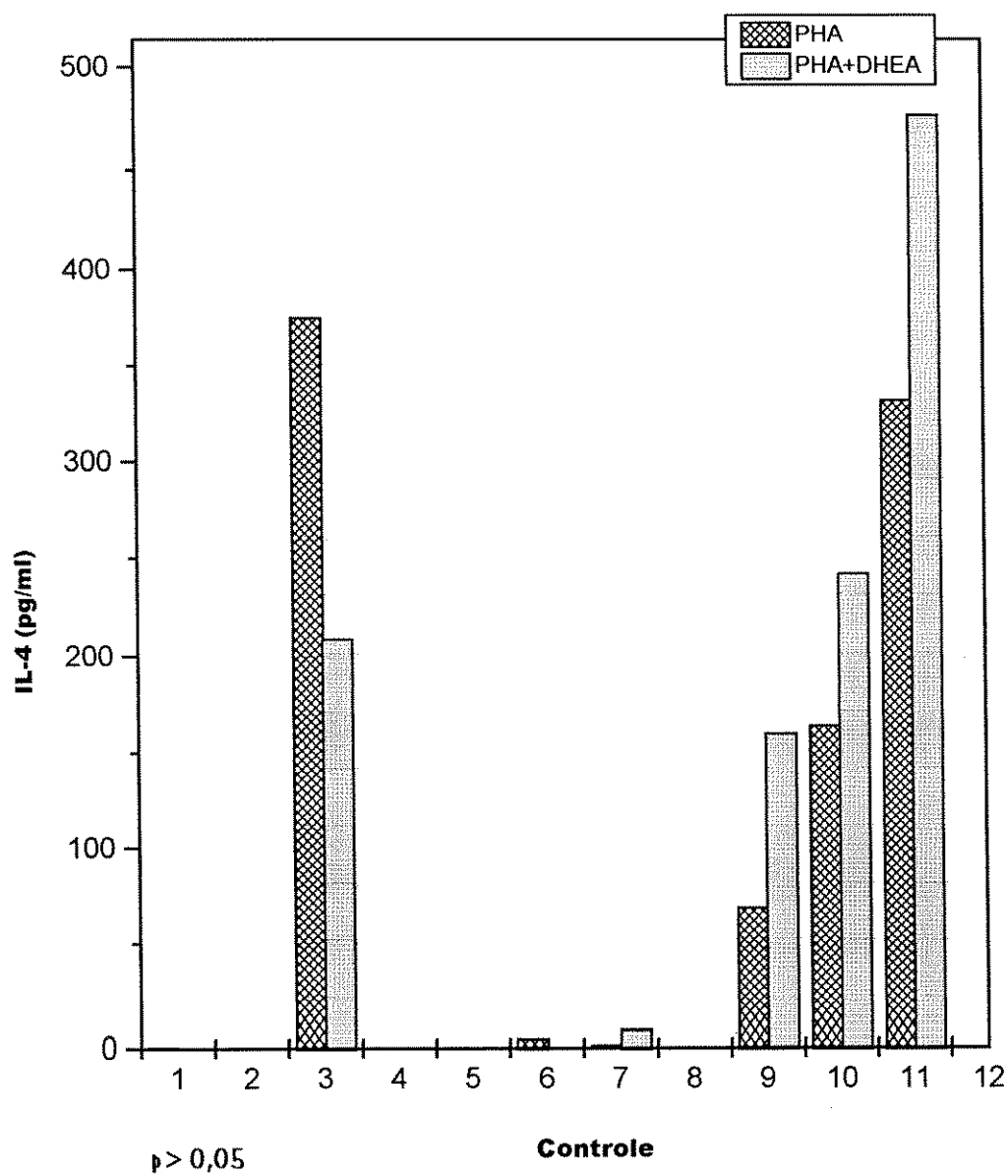
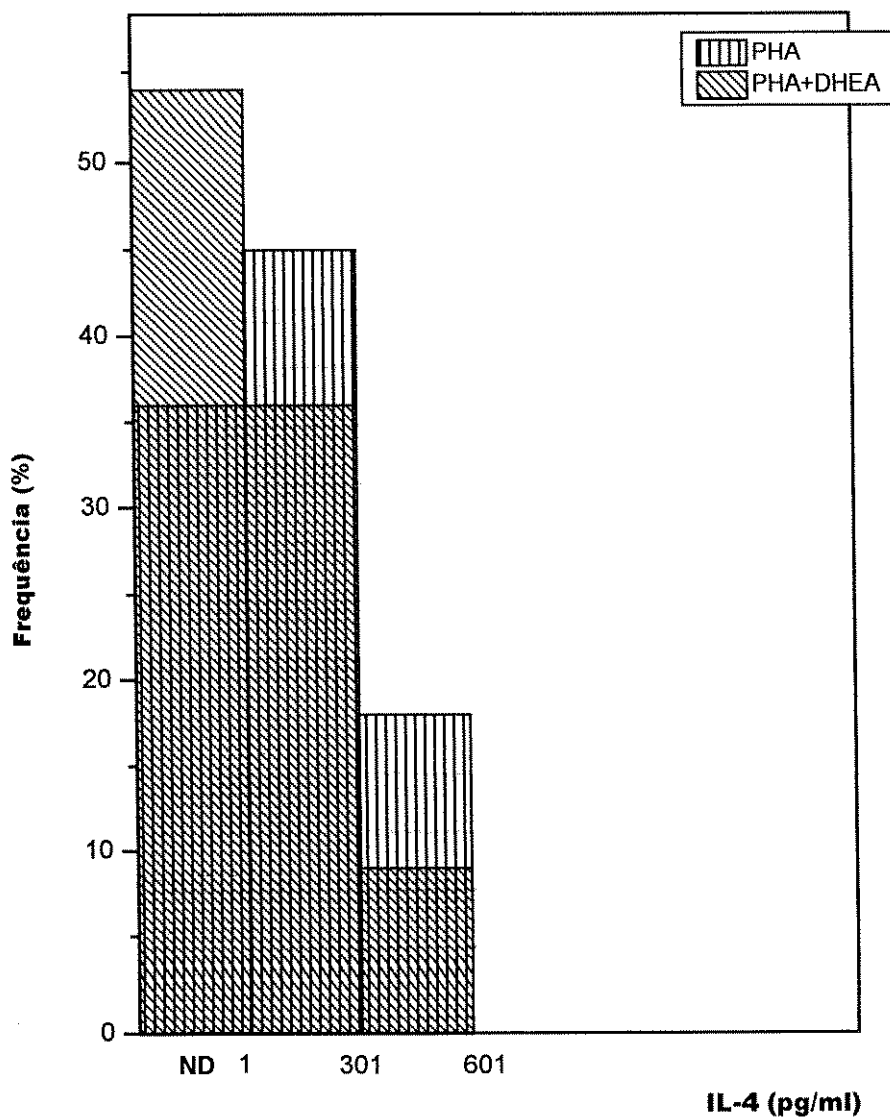


Figura 14 - Níveis da IL-4 (pg/ml) sob estímulo da PHA e PHA+DHEA no mesmo indivíduo no grupo controle.

Os histogramas representativos das distribuições de frequências para a IL-4, resultante de sobrenadante de cultura de células mononucleares sob estímulo da PHA e da PHA combinado ao hormônio, estão apresentados na figura 15. Em relação ao grupo tratado com o hormônio, observa-se um aumento da frequência, de 36% para 54%, na classe que abrange as amostras não detectáveis pelo ensaio, quando comparado ao grupo não tratado. Por outro lado, a frequência das observações pertencentes ao intervalo entre 1 e 300 pg/ml diminuiu de 45% (média = 48,3 pg/ml) para 36% neste mesmo grupo (média = 154,4 pg/ml). Muito embora a terceira classe da distribuição que abranja os valores entre 301 e 601 pg/ml mostra-se pouco relevante, é também observado uma diminuição da frequência das amostras após o tratamento com o hormônio (de 18% para 9%). A dispersão dos valores, em ambos os grupos, ocorreu num mesmo intervalo. Desta forma, quando comparados entre si, os grupos não apresentam relevância em termos de significância.



ND=não detectável

Figura 15 - Distribuições de frequências para os níveis de IL-4 (pg/ml) sob estímulo da PHA e PHA +DHEA no grupo controle.

4.6 - Quantificação da IL-10

4.6.1 - Quantificação da IL-10 em sobrenadante de cultura de células mononucleares sob estímulo da PHA

A quantificação dos níveis de IL-10 se deu através da análise de 13 amostras de sobrenadante de cultura de células mononucleares de indivíduos portadores de LES, assim como em 10 amostras dos indivíduos pertencentes ao grupo controle, todas elas sob o estímulo da PHA. De acordo com os resultados, a IL-10 mostrou-se detectável ($\geq$ a 0,5 pg/ml) em todos os indivíduos lúpicos e em todos aqueles pertencentes ao grupo controle. Os valores obtidos variaram de 2049,63 a 3156,0 pg/ml ($2331,5 \pm 492,97$ pg/ml) no grupo das lúpicas enquanto que a variação nos indivíduos controle foi de 1321,71 a 2775,80 pg/ml ($2362,81 \pm 539,6$ pg/ml). O teste estatístico não paramétrico não relevou os resultados em termos de significância. Estes dados estão presentes na figura 16.

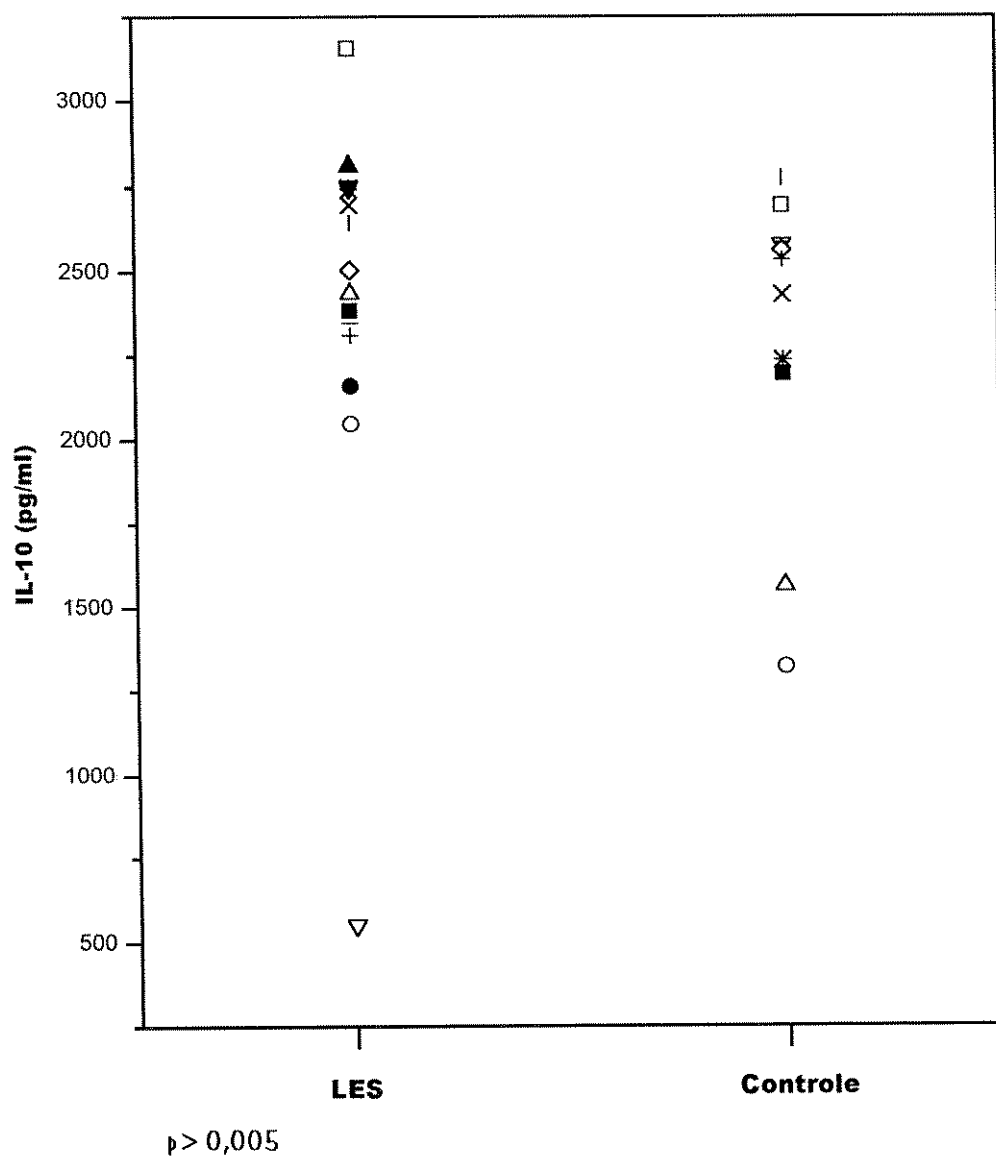


Figura 16 - Níveis de IL-10 (pg/ml) sob estímulo da PHA em indivíduos portadores de LES e no grupo controle

A produção da IL-10 em sobrenadante de cultura de células mononucleares sob estímulo da PHA, em ambos os grupos lúpico e controle, foi analisada em termos de distribuição de frequências, através de histogramas de frequências relativas (figura 17). Diante da análise, observa-se que, no grupo lúpico, a maioria das observações está compreendida entre 2101 e 3000 pg/ml, onde as frequências não se apresentaram muito variáveis (30%, 30% e 23%). A distribuição das frequências neste grupo se aproxima à uma distribuição normal. Já no grupo controle, a classe mais representativa foi a que compreendeu valores entre 2401 e 2700 pg/ml (média = 2586,6 pg/ml), sendo que a frequência das observações atingiu um valor de 60%. As demais observações estão dispersas entre 1201 e 3000 pg/ml, muito embora as classes sejam muito pouco representativas. Em ambos os grupos, a grande maioria das observações está compreendida entre 2101 e 3000 pg/ml. Esta sobreposição mostra a ausência de diferenças significativas entre eles.

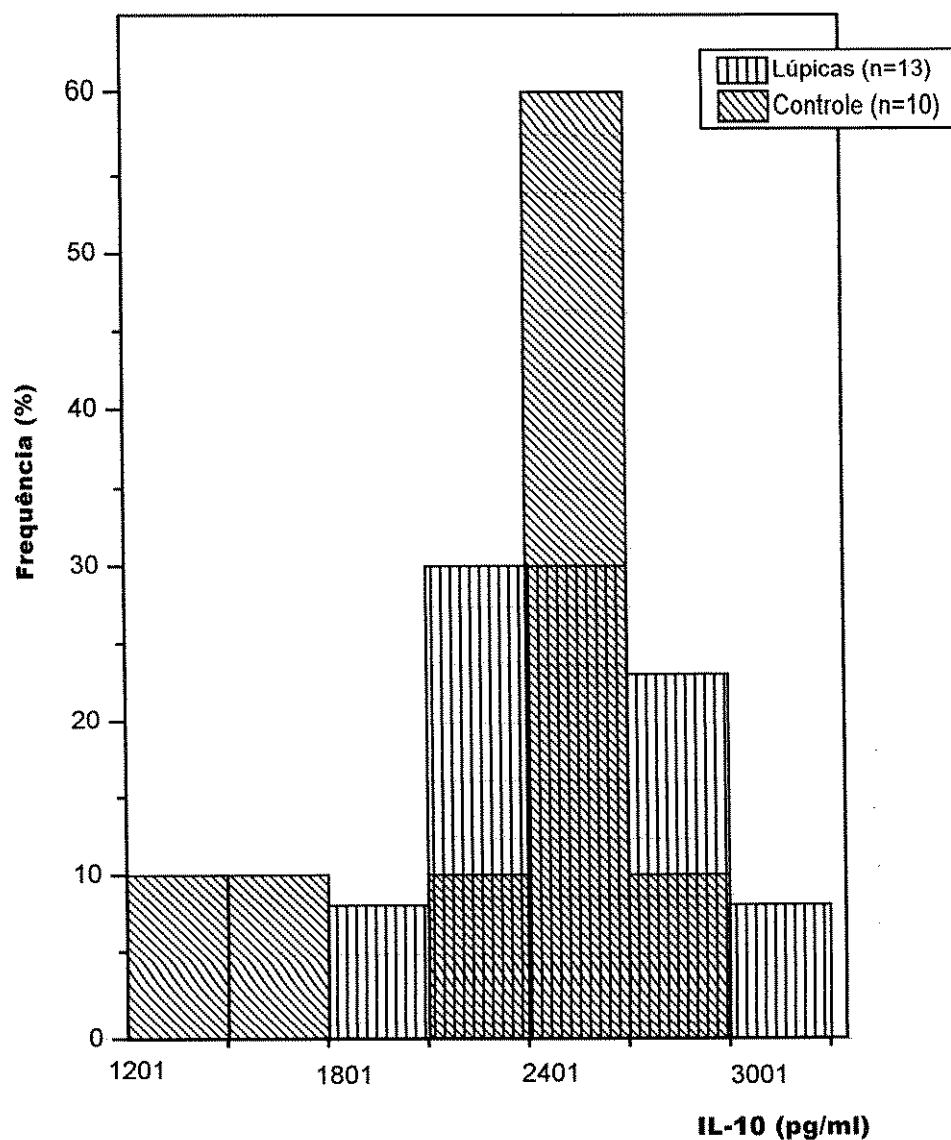


Figura 17 - Distribuições de frequências para os níveis de IL-10 (pg/ml) sob estímulo da PHA em lúpicas e no grupo controle.

4.6.2 - Análise do padrão de produção da IL-10 em sobrenadante de cultura de células mononucleares sob estímulo da PHA combinada a DHEA em indivíduos portadores de LES

A fim de se averiguar a influência do hormônio DHEA na produção da IL-10 em portadores de LES, as 13 amostras de sobrenadante de cultura de células mononucleares que receberam estímulo da PHA combinada ao hormônio, foram comparadas às 13 amostras de sobrenadante resultante de ensaio linfoproliferativo estimulados apenas com o mitógeno, todos para um mesmo indivíduo. Os resultados revelam que 6 indivíduos (46%) apresentaram um aumento na produção da IL-10, e 6 deles produziram citocina em menor nível quando o hormônio foi administrado. Não houve alteração no nível da IL-10 em apenas 1 indivíduo, permanecendo o valor absolutamente intacto após a administração da DHEA (tabelas 16 e 17). A análise estatística realizada através do teste não paramétrico não permite relevar os resultados em termos de significância. A figura 18 apresenta estes resultados.

Tabela 16 - Variação do padrão de produção de IL-10 (pg/ml) em sobrenadante de cultura de células mononucleares sob estímulo de PHA e PHA+DHEA no grupo de indivíduos portadores de LES

PHA	PHA+DHEA	Variação *
3156	2789,82	-388,18
2049,63	2430,67	+381,04
2435,05	1931,3	-503,75
256,88	2360,59	-146,29
2312,42	2397,38	+84,96
2700,47	2746,02	+45,55
2746,02	2746,02	-
2348,33	2469,21	+120,88
2647,91	2783,68	+135,77
2384,25	1552,9	-831,35
2160,87	2331,69	+171,22
2808,21	2513,89	-284,32
2749,5	2698,72	-50,78

* o cálculo da variação se deu pela diferença entre o grupo tratado com dhea e o grupo não tratado; + aumento; - diminuição.

Tabela 17 - Comportamento do padrão da IL-10 em sobrenadante de células mononucleares estimulados com a PHA associada a DHEA em relação ao estímulo com o mitógeno.

IL-10 perante administração da DHEA	Lúpicas	
	n	%
Aumento	6	46,0
Diminuição	6	46,0
Estável	1	8,0
Total	13	100,0

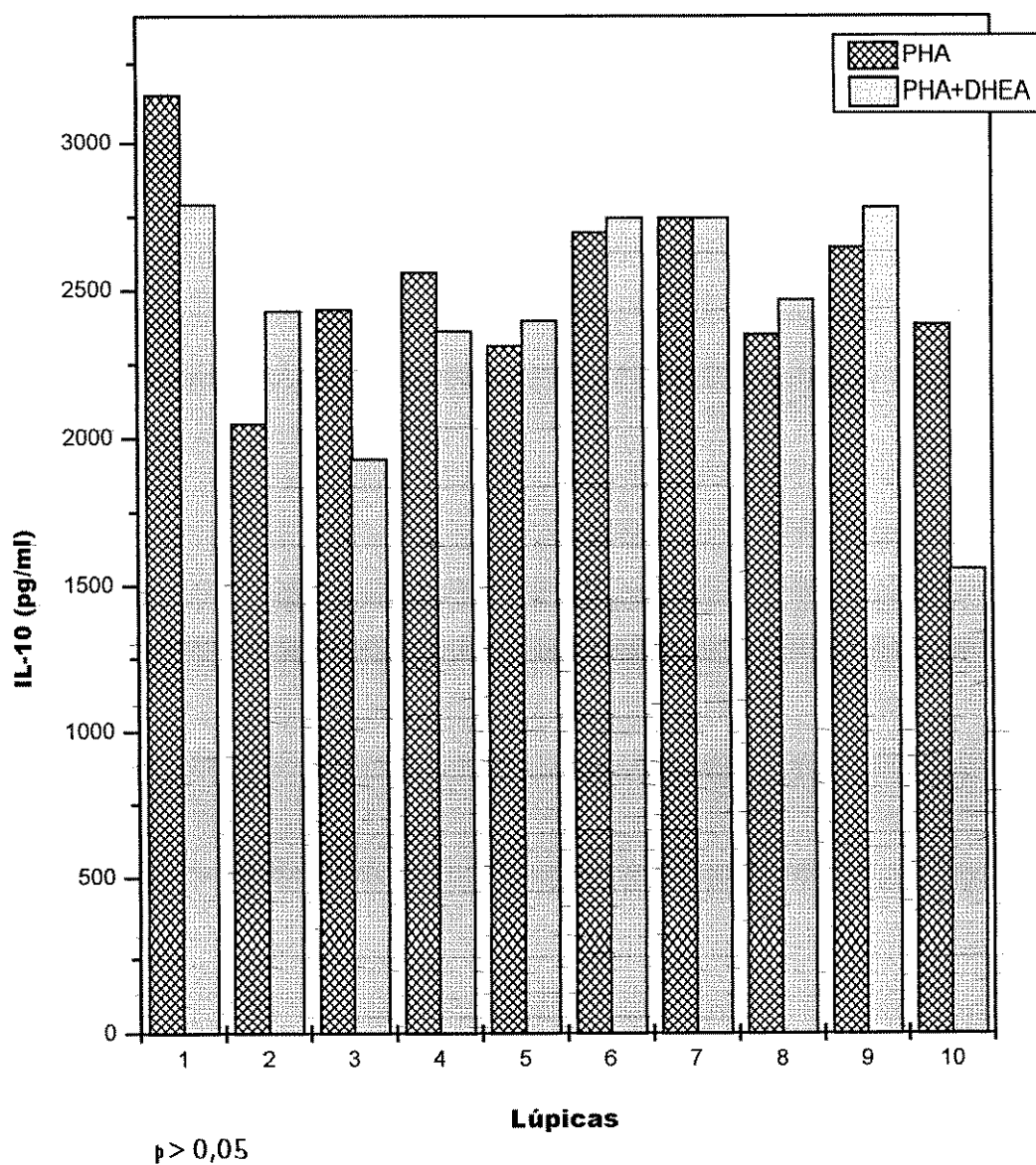


Figura 18 - Níveis de IL-10 (pg/ml) sob o estímulo da PHA e PHA+DHEA no mesmo indivíduo no grupo das lúpicas.

As distribuições de frequências para a IL-10, resultante de sobrenadante de cultura de células mononucleares estimulados com PHA e PHA combinada ao hormônio no grupo das lúpicas, foram representadas por histogramas das frequências relativas, os quais estão apresentados na figura 19. Estes histogramas mostram que, em ambos os grupos - tratado e não tratado com DHEA - a grande maioria das observações está compreendida entre os valores 2101 e 3000 pg/ml. Neste intervalo, as 3 classes de observações revelam frequências com muito pouca variação: 23%, 30% e 30%, no grupo tratado e 30%, 30% e 23% no grupo não tratado. As demais classes, dentro do intervalo de dispersão dos dados (1501 a 3001 pg/ml), tornaram-se pouco representativas. Em ambos os casos, a dispersão dos dados está compreendida entre 1801 e 3000 pg/ml, e desta forma, não há como constatar diferenças significativas entre os grupos.

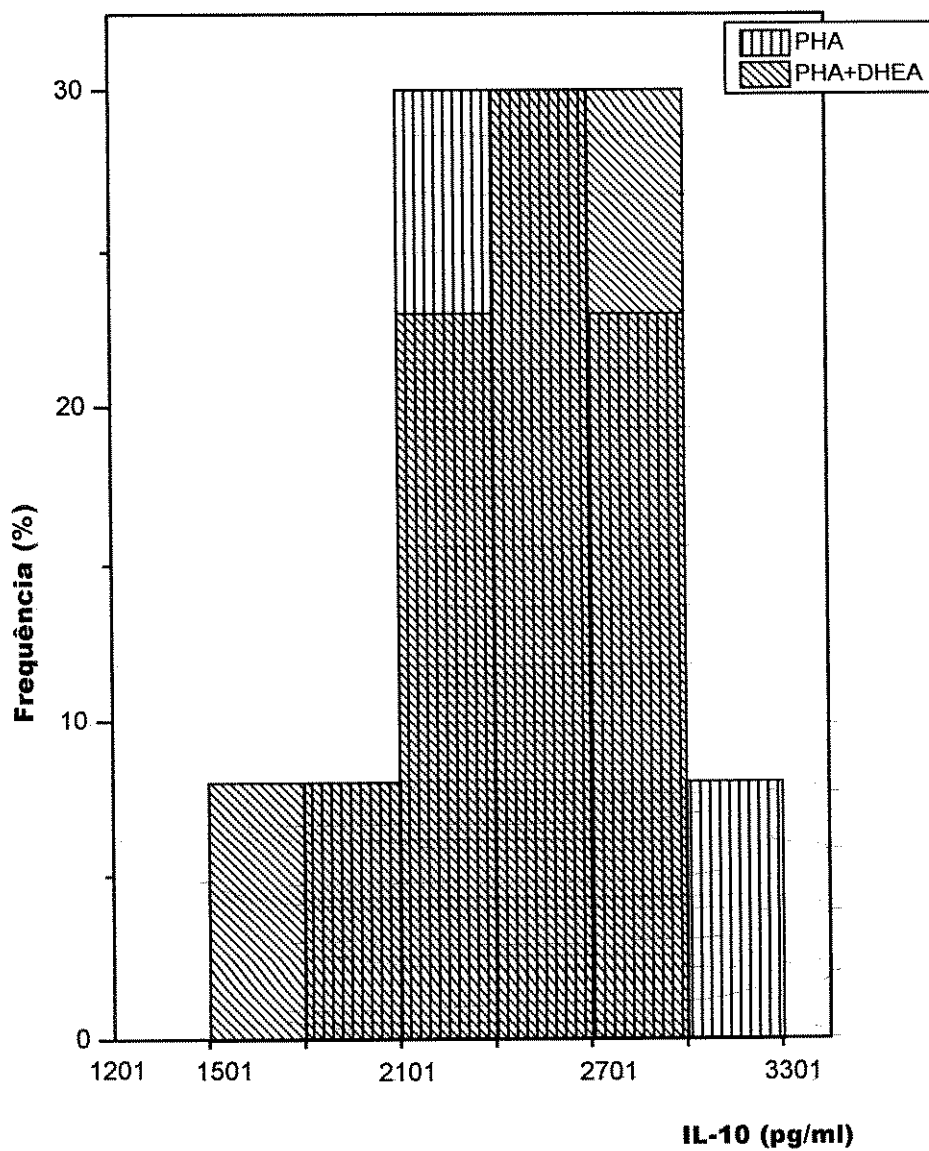


Figura 19 - Distribuições de frequências para os níveis de IL-10 (pg/ml) sob estímulo da PHA e PHA+DHEA em lúpicas.

4.6.3 - Análise do padrão de produção da IL-10 em sobrenadante de cultura de células mononucleares sob estímulo da PHA combinada a DHEA em indivíduos do grupo controle

Dez amostras de sobrenadante de cultura de células mononucleares estimulados com a PHA associada ao hormônio DHEA foram comparadas às 10 amostras de sobrenadante, resultante de ensaio linfoproliferativo, apenas sob o estímulo do mitógeno, conforme descrição anterior. Os resultados mostram que 50% do grupo, equivalente à 5 indivíduos, apresentaram aumento do nível da IL-10, quando as culturas foram tratadas com o hormônio. Em relação às amostras que apresentaram diminuição do nível da citocina diante a administração da DHEA, estes compõem 50% do grupo (5 indivíduos). Os dados estão presentes nas tabelas 18 e 19 e na figura 20. A análise estatística não releva estas alterações em termos de significância.

Tabela 18 - Variação do padrão de produção de IL-10 (pg/ml) em sobrenadante de cultura de linfócitos sob estímulo da PHA e PHA+DHEA no grupo de indivíduos controle.

PHA	DHEA	Variação *
2698,72	2485,86	+212,46
1321,70	1247,24	-74,46
1565,2	2341,32	+776,12
2584,84	2452,57	-132,27
2568,20	2537,54	-30,66
2537,50	2637,40	+100,10
2434,18	2240,59	-139,59
2239,70	2794,20	+559,50
2589,22	2530,53	-58,39
2775,80	2834,49	+58,69

* o cálculo da variação se deu pela diferença entre o grupo tratado com dhea e o grupo não tratado; + aumento; - diminuição.

Tabela 19 - Comportamento do padrão da IL-10 em sobrenadante de cultura de células mononucleares estimulados com PHA associada a DHEA em relação ao estímulo com o mitógeno.

IL-10 perante a administração da DHEA	Controle	
	n	%
Aumento	5	50,0
Diminuição	5	50,0
Total	10	100,00

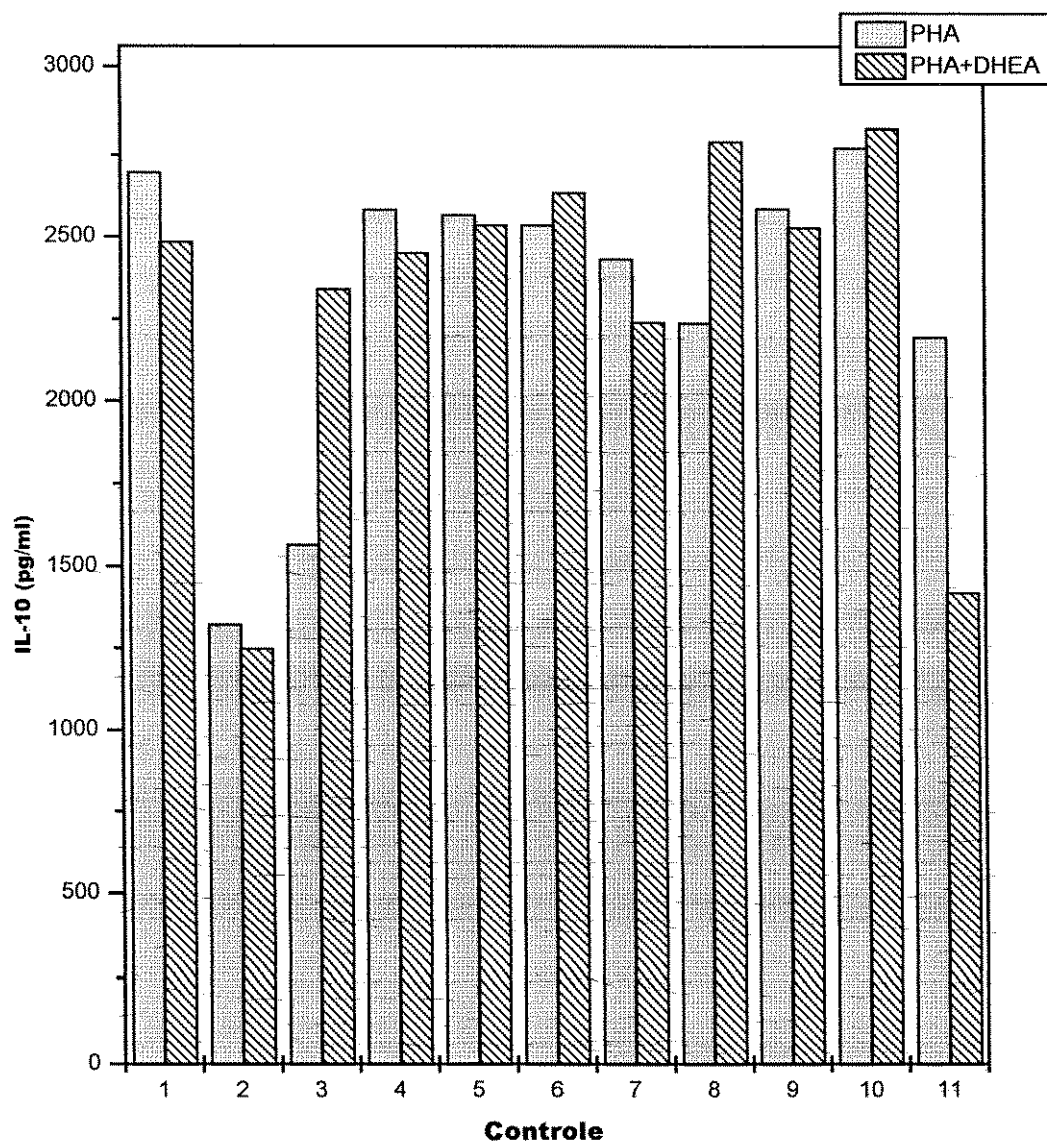


Figura 20 - Níveis de IL-10 (pg/ml) sob estímulo da PHA e PHA combinada a DHEA no mesmo indivíduo no grupo controle.

Em termos das distribuições de frequências, os histogramas das frequências relativas para a IL-10, oriunda de sobrenadante de cultura de células mononucleares sob estímulo da PHA e da PHA combinada ao hormônio no grupo controle (figura 21) mostram que a grande maioria das observações faz parte do intervalo entre 2101 e 3001 pg/ml, tanto no grupo tratado como no grupo não tratado com o hormônio. Este último apresenta um grande número de observações, onde a frequência foi de 60%, na classe que compreende os valores entre 2401 e 2700 pg/ml (média = 2528,7 pg/ml). Esta classe também foi expressiva no grupo tratado com DHEA (média = 2460,8 pg/ml), onde a frequência dos dados neste intervalo, foi de 50%, a maior delas. Diante da distribuição dos dados, as demais classes tornam-se muito pouco representativas. A dispersão dos valores, em ambos os casos, é a mesma, isto é, compreende valores no intervalo entre 1201 e 3001 pg/ml. Desta forma, os grupos não devem expressar diferenças significativas entre si.

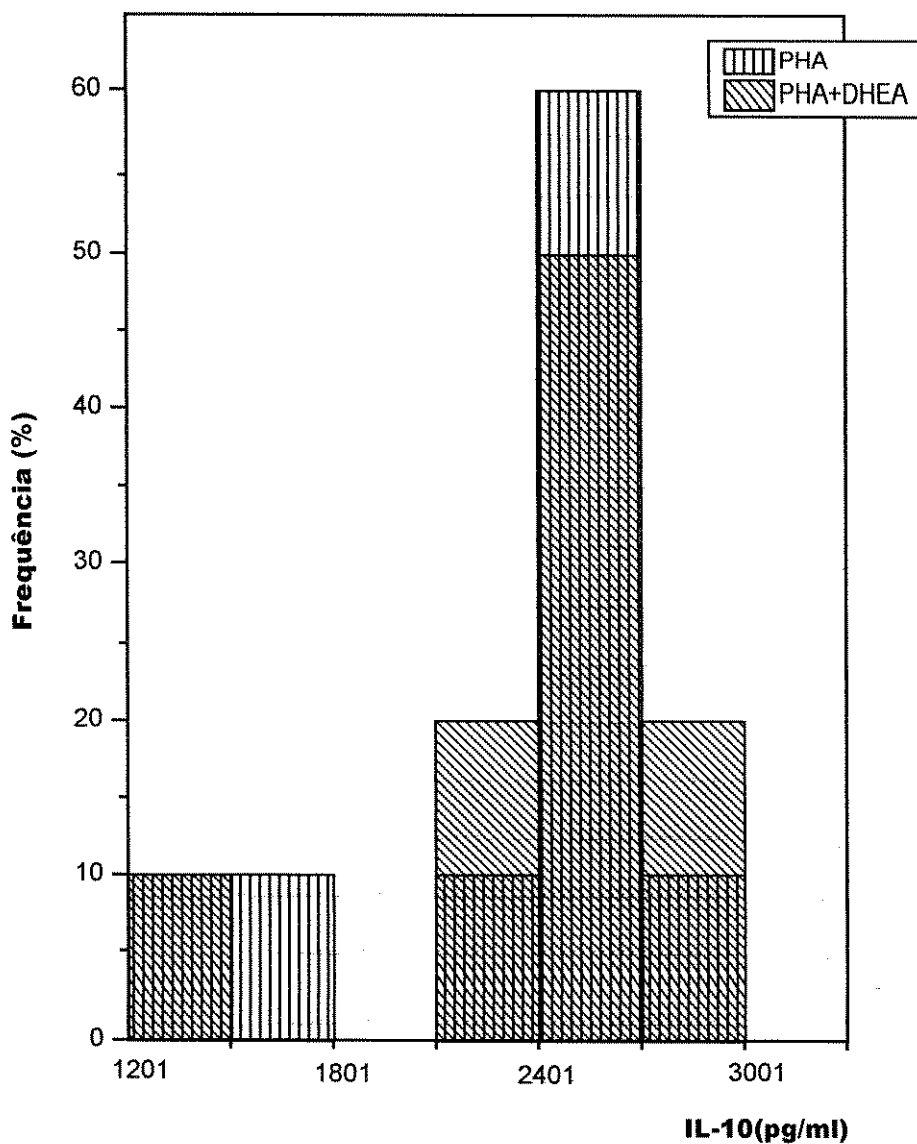


Figura 21 - Distribuições de frequências para os níveis de IL-10 (pg/ml) sob estímulo da PHA e PHA+DHEA no grupo controle.

4.6.4 - Quantificação da IL-10 em sobrenadante de cultura de células mononucleares na ausência de estímulo

As 13 amostras de sobrenadante de cultura de células mononucleares dos indivíduos portadores de LES, juntamente com as 11 amostras dos indivíduos do grupo controle, todas elas ausentes de estímulo, foram analisadas para a produção de IL-10. Segundo os resultados, a IL-10 mostrou-se detectável (≥ 10 pg/ml) em todos os 13 indivíduos lúpicos (100%) e em todos os indivíduos do grupo controle (100%). Os valores apresentaram uma variação de 235,51 a 3156 pg/ml ($2015,06 \pm 837,1$) no grupo das lúpicas enquanto que a variação nos indivíduos controle foi de 312,59 a 2252,85 pg/ml ($1694,0 \pm 926,0$ pg/ml). O teste estatístico não paramétrico releva os resultados em termos de significância, sendo que os valores obtidos para o grupo controle mostram-se diminuídos em relação ao grupo de indivíduos lúpicos ($p = 0,026$). Os dados estão apresentados na figura 22.

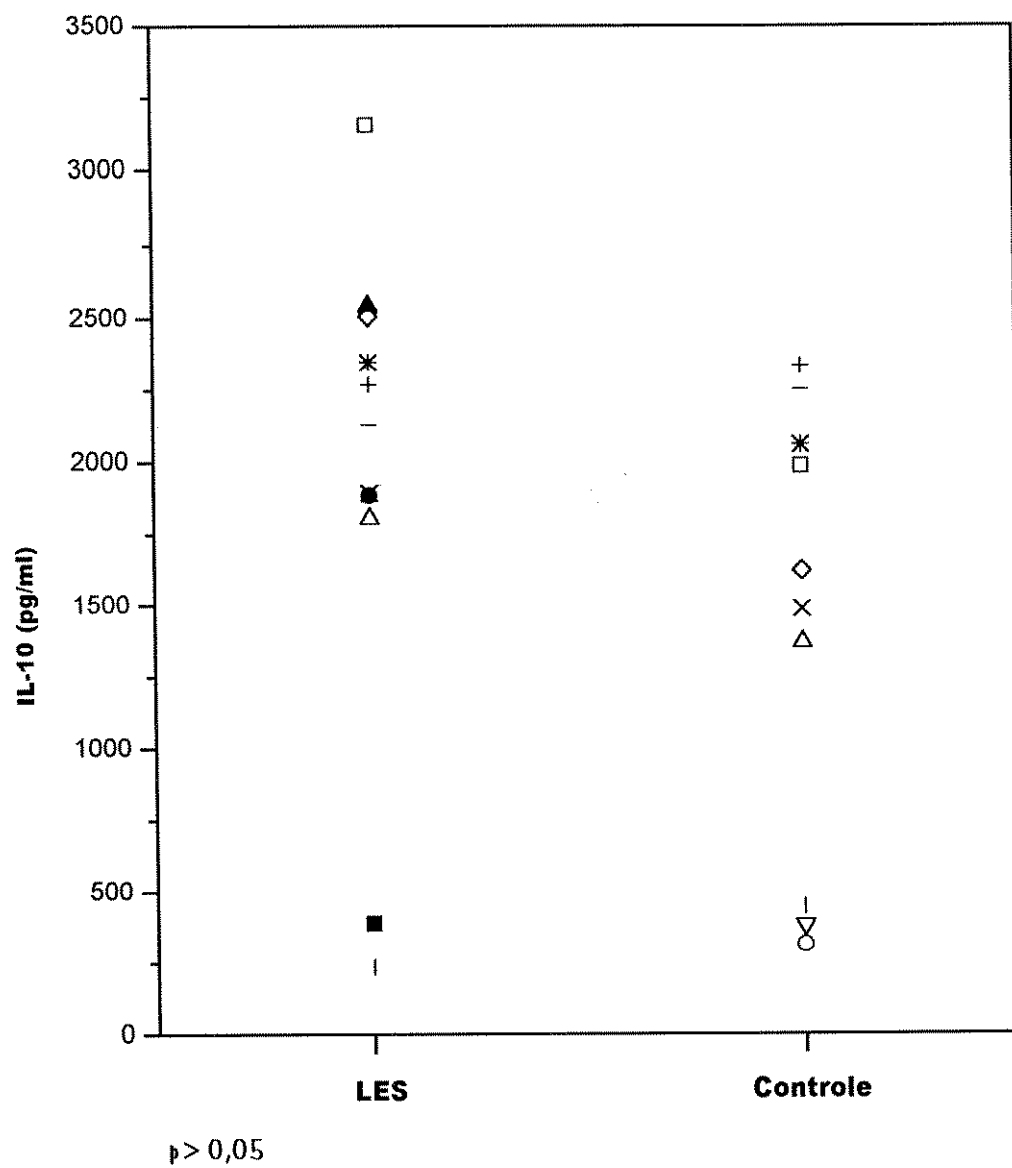


Figura 22 - Níveis da IL-10 (pg/ml) na ausência de estímulo em lúpicas e no grupo controle.

Quanto às distribuições de frequências para a IL-10, resultante de sobrenadante de cultura de células mononucleares na ausência de estímulo, dos grupos lúpico e controle, representadas por histogramas (figura 23), estas mostram que, no grupo controle, a maioria dos valores (70%) está dentro do intervalo entre 1201 e 2400 pg/ml, muito embora a classe que represente 30% das observações, compreenda os valores entre 301 e 600 pg/ml. Em relação ao grupo das portadoras da doença, grande parte das observações (82%) está no intervalo que abrange os valores entre 1801 e 2700 pg/ml. Em ambos os casos, o intervalo entre 601 e 1200 pg/ml revela uma ausência de observações. A análise comparativa dos histogramas mostra um deslocamento das classes de distribuição das frequências entre os grupos, reforçando a relevância do grupo das portadoras de LES em relação ao grupo controle, na produção aumentada da citocina em estudo.

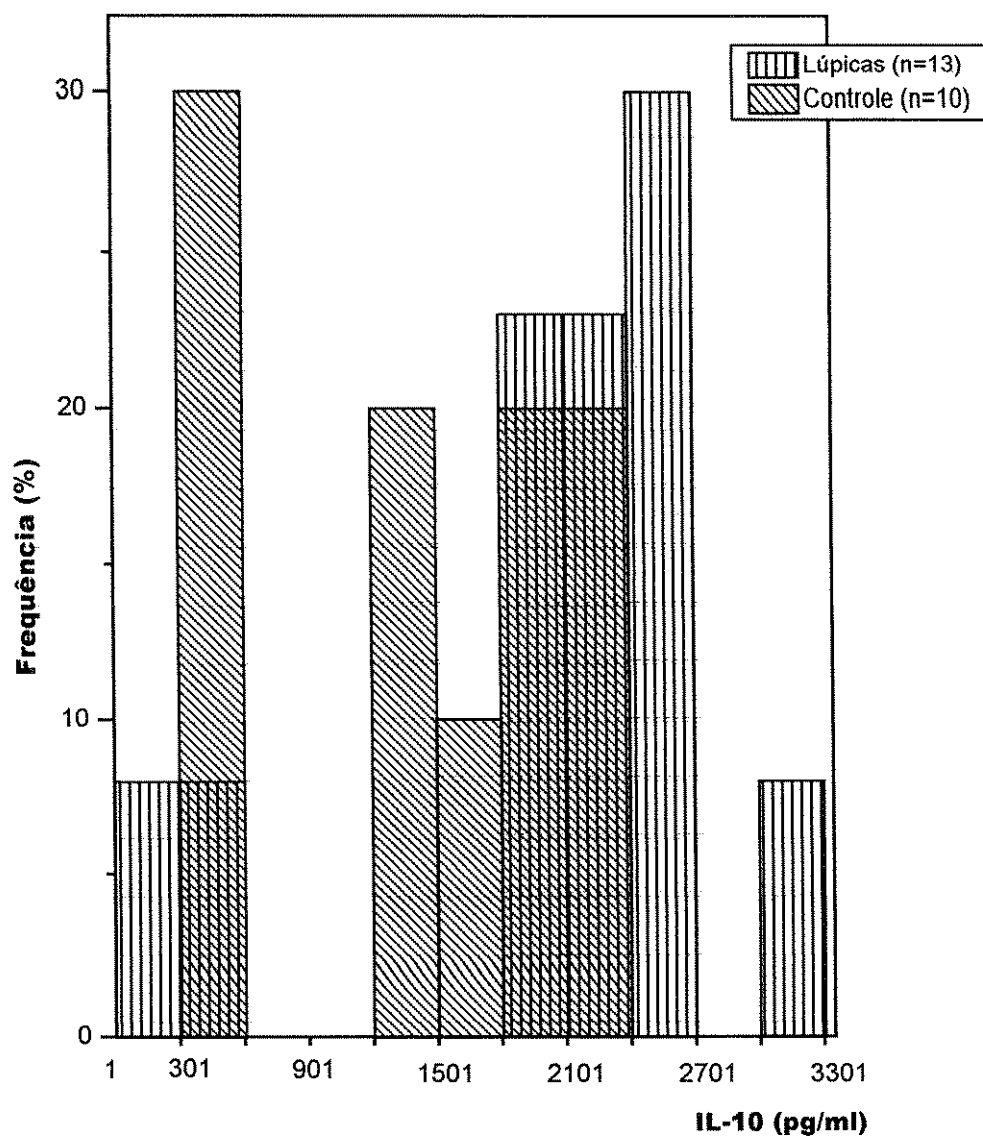


Figura 23 - Distribuições de frequências para os níveis de IL-10 (pg/ml) na ausência de estímulo em lúpicas e no grupo controle.

4.7 - Análise comparativa das distribuições das frequências para IL- 2, IL- 4 e IL-10 em sobrenadante de cultura de células mononucleares sob estímulo da PHA

4.7.1 - Análise comparativa das distribuições das frequências em portadoras de LES

A figura 24 mostra, através dos histogramas de frequências relativas, os perfis das 3 interleucinas (IL-2, IL-4 e IL-10), estudadas e analisadas neste trabalho, do grupo das 39 portadoras de LES. O que se pode observar é a existência de um perfil contínuo em relação à produção da IL-10, fenômeno este não observado nas demais citocinas. Além do mais, há um deslocamento dos níveis de produção da IL-10 para a direita quando comparados com os das interleucinas 2 e 4. Estas últimas se sobrepõem nas 3 primeiras classes, ou seja, a grande maioria dos valores relativos à IL-2 e toda a produção da IL-4 se encontra dispersa num mesmo intervalo.

4.7.2 - Análise comparativa das distribuições das frequências no grupo controle

Os perfis das interleucinas 2, 4 e 10, relativas ao grupo controle, estão apresentados na figura 25 através de histogramas. Observa-se uma ausência de continuidade nos perfis das citocinas em estudo, ocorrendo uma predominância na produção da IL-2 e IL-10, onde as frequências das

observações são 67% e 60%, respectivamente. A IL-4 parece ser a única citocina que mantém o seu padrão de produção quando comparada ao grupo das portadoras de LES. As demais revelam alteração do seu perfil de produção assim como na dispersão dos valores, principalmente a IL-10, a qual não se mostra mais deslocada em relação às outras citocinas, como ocorre no grupo lúpico, se sobrepondo à IL-2 no intervalo entre 1201 e 1800 pg/ml, muito embora estas classes sejam pouco representativas devido à baixa frequência das observações.

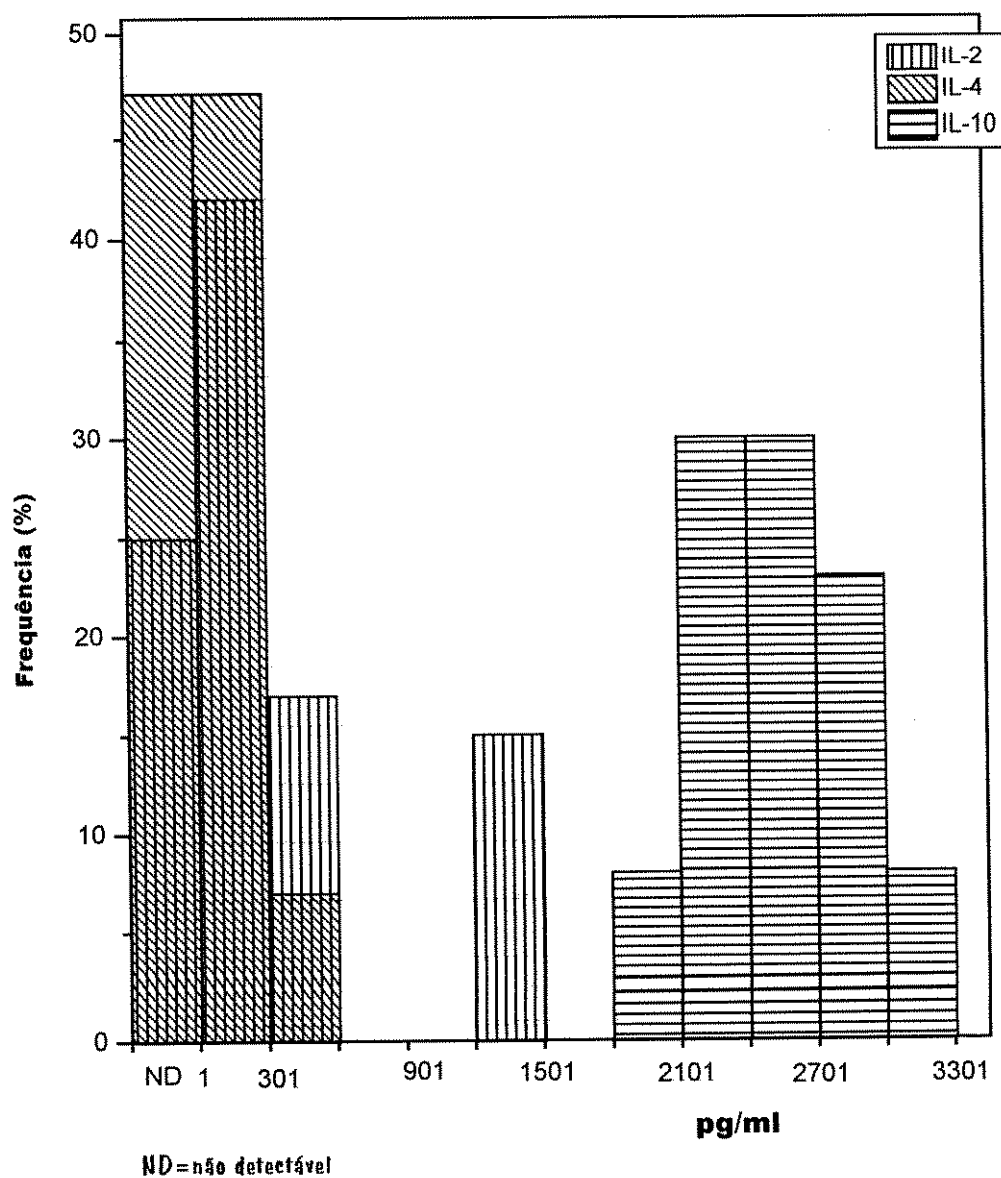


Figura 24 - Distribuições de frequência para os níveis de IL-2, 4 e 10 (pg/ml) sob estímulo da PHA em lúpicos.

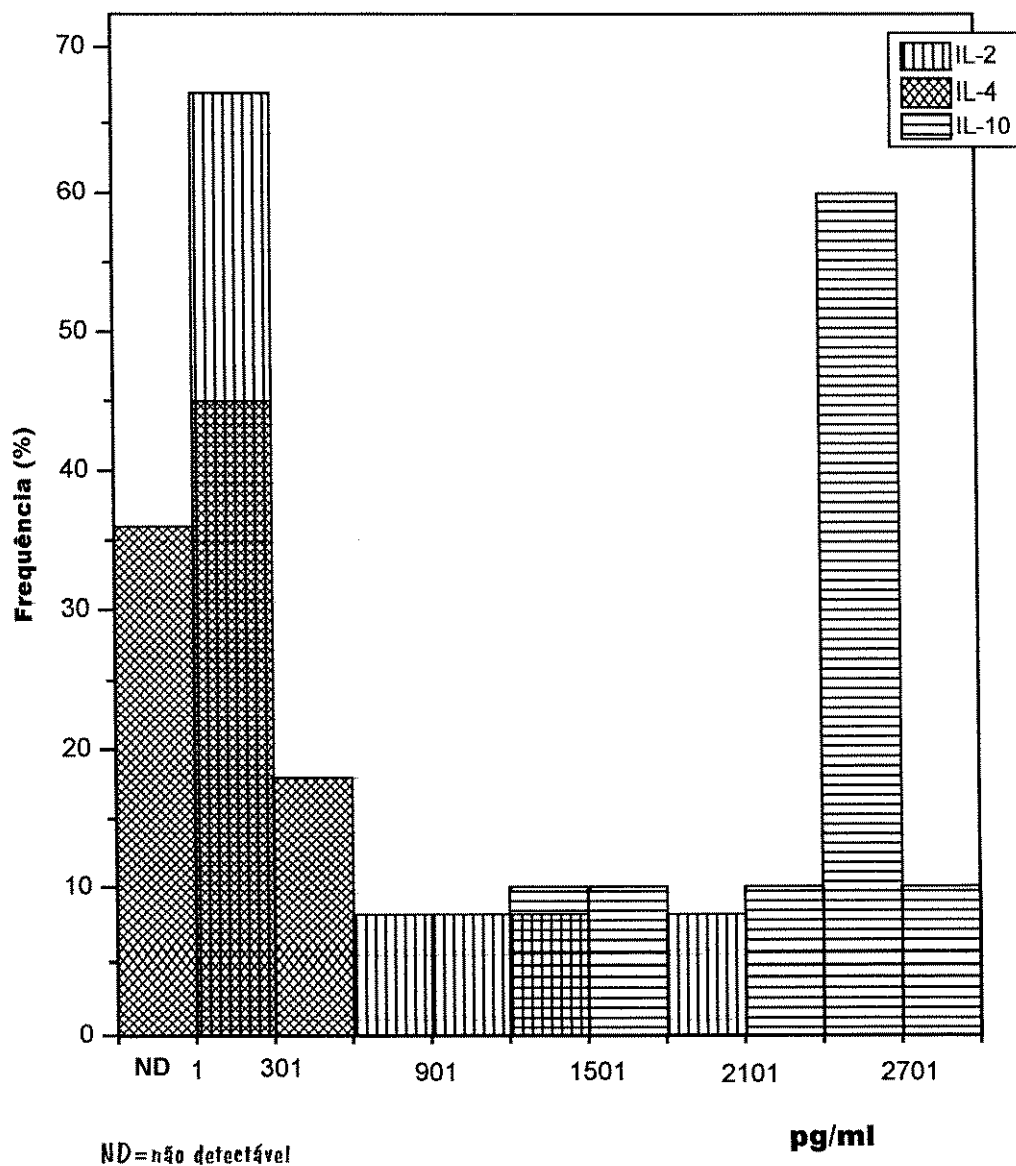


Figura 25 - Distribuições de frequências para os níveis de IL-2, 4 e 10 (pg/ml) sob estímulo da PHA no grupo controle.

5 - DISCUSSÃO

Dentro da abordagem de desorganização imunológica, a autoimunidade tem gerado inúmeras questões e investigações na tentativa de se compreender os mecanismos, muitas vezes de forma reducionista, responsáveis pelo seu desencadeamento. *A busca do equilíbrio* vira lei de sobrevivência e a *agressividade contra o estranho* não mais preserva, mas agride: o *próprio* não reconhece mais o *próprio*.

Diante do desequilíbrio imunobiológico desencadeado pelo LES, a estratégia terapêutica primária é alcançar e manter a supressão adequada da doença sem a ocorrência de efeitos colaterais proporcionados pela droga (KIMBERLY, 1988). As mulheres portadoras de LES que participaram do nosso estudo (quadro I), a maioria delas em tratamento com doses consideradas baixas de corticosteróides, parecem ter suprimido a doença, recuperando o equilíbrio imunobiológico agora no convívio com ela, uma vez que o exame clínico de todas elas se revelou normal no dia da coleta, além de seus depoimentos, que apontavam para uma vida estável e relativamente saudável. Tal era a segurança de um quadro clínico estabilizado, que uma delas, durante a entrevista que precedia a coleta de sangue nos informou, quando lhe foi perguntado sobre a dose do medicamento: “...eles falaram pra eu tomar 5 mg de Meticorten por dia mas eu mesma resolvi parar de tomar o remédio e estou ótima.”

Apesar de estabelecermos determinados critérios em relação ao sexo e dose do medicamento, que mesmo assim fica difícil em termos de confiabilidade, vide depoimento anterior, não podemos deixar de relevar a heterogeneidade do grupo. A nossa casuística é composta por mulheres de diferentes idades, diferentes períodos de estabelecimento da doença e tratamento da mesma, e outros inúmeros fatores ambientais. A heterogeneidade clínica no LES é tida como um fenômeno marcante dentre os indivíduos portadores da doença, e se expressa até mesmo nos indivíduos que apresentam padrões idênticos de autoanticorpos (HARLEY & KIMBERLEY). Esta diversidade parece intrigar os pesquisadores uma vez que dados na literatura mostram associações entre anticorpos e uma manifestação clínica em particular, sugerindo a importância dos autoanticorpos na expressão clínica da doença. Em relação às nossas observações, muito embora os dados não tenham sido apresentados, do total das 10 mulheres (26%) que apresentaram anticorpos anti-DNA, 7 delas (18%) desenvolveram distúrbio renal. Este tipo de correlação tem sido abordado na literatura por investigação em modelo murino, como em camundongos NZB/NZW que desenvolvem espontaneamente uma acelerada doença autoimune com glomerulonefrite severa e uma excessiva produção de anticorpos anti-DNA (HELYER & HOWIE, 1963; THEOPHILOPOULOS & DIXON, 1985). Em humanos, a ligação entre anticorpos anti-dsDNA, altamente específico para LES, e glomerulonefrite tem sido examinado de perto, uma vez que estes anticorpos apresentam a capacidade de se depositarem nos rins e promoverem a fixação de complemento (ROTHFIELD & STOLLAR, 1967).

Anticorpos anti-Sm, na ausência de outros autoanticorpos, têm sido relacionados com doença isolada do sistema nervoso central em LES (WINFIELD, et al., 1978). Pacientes que apresentam anticorpos anti-nRNP desenvolvem doença com baixa prevalência de nefrite e prognóstico aparentemente favorável (REICHLIN & MATTIOLI, 1972), enquanto que anti-Ro tem sido associado com doença renal (WASICEK & REICHLIN, 1982). No nosso trabalho, das 4 mulheres que desenvolveram anticorpo anti-Sm, 3 delas apresentaram um tipo de manifestação neuropsiquiátrica (convulsão, psicose ou neuropatia periférica). Por outro lado, das 10 portadoras que apresentaram anticorpo anti-Ro/SSA, somente 3 delas tiveram distúrbio renal. Em relação às observações feitas com o intuito de se associar manifestações neuropsiquiátricas com a presença do anticorpo anti-Sm, estas provavelmente não podem ser sustentadas, em primeiro lugar, em virtude da pequena amostra e, em segundo lugar, pelo fato de que em apenas 1 indivíduo o anticorpo se apresentou na ausência de todos os outros. Quanto ao autoanticorpo anti-Ro/SSA, a expressão de manifestações de natureza renal ou pulmonar no grupo das mulheres com LES não oferecem suporte para tais associações. Na nossa casuística, 7 do total das 12 mulheres desenvolveram mais de um autoanticorpo, e uma delas apresentou todos eles. É interessante observar que, quanto às manifestações clínicas, esta última apresentou apenas comprometimento a nível cutâneo e articular. Em contraposição, outra lúpica que não revelou nenhum destes autoanticorpos, apresentou, além das lesões cutâneas e comprometimento articular, doença renal, pleurite, pericardite, anemia hemolítica e leucopenia < 4000. Portanto, associação entre determinada manifestação clínica e a presença de autoanticorpos, em nosso

estudo, não se mostrou tão clara. O que não podemos deixar de considerar é que esta diversidade clínica que se opõem a determinadas associações ou correlações, se sustenta pelo efeito do background genético e principalmente, pelo efeito da pressão ambiental à qual o indivíduo está submetido.

Quanto aos outros caracteres, observamos uma predominância das manifestações cutâneas e articulares, apresentadas respectivamente por 97% e 87% do grupo, seguida pela presença de célula LE, observada em 51% das mulheres portadoras (tabela 1). Manifestações características como comprometimento renal, serosites e alterações hematológicas foram apresentadas por aproximadamente 38% do grupo. Na literatura, manifestações com comprometimento cutâneo foram observadas em mais de 80% dos indivíduos nas descrições feitas por SCHUR (1989) e ROTHFIELD (1977), os quais relatam a presença de alopecia em aproximadamente 70% dos pacientes. Fotosensibilidade, lesão malar e úlcera oral foram outros caracteres manifestados por, respectivamente, 58%, 50% e 27 a 41% dos indivíduos, segundo SCHUR (1989) enquanto que TAN et al. (1982), observaram-nos em 43%, 57% e 27% dos pacientes, respectivamente. Estas frequências descritas se assemelham às frequências observadas em nosso trabalho (tabela 2). Um dos caracteres referente ao comprometimento cutâneo que se expressou com baixa frequência foi a lesão discóide, observada em apenas 8% das mulheres. Dados publicados também apontam este caracter como o de menor frequência dentre as manifestações de origem cutânea: 18% (TAN et. al, 1982) e 25% (SCHUR, 1989). Manifestações articulares como artrite e artralgia também são muito frequentes em LES. SCHUR (1989) e

ROTHFIELD (1977) descreveram-nas em aproximadamente 95% dos indivíduos e TAN et. al. (1982) observaram estas manifestações em 86% dos pacientes. Segundo ROTHFIELD (1977), a maioria dos pacientes apresentam artrite, muito embora a artralgia, sem evidência objetiva sobre o comprometimento articular, também seja comum. Nas nossas observações, a artralgia, manifestada por 74% dos indivíduos se revelou com frequência um pouco superior à artrite, que acometeu 64% das portadoras (tabela 3). A presença da célula LE é outra característica importante, encontrada em 91% dos indivíduos com LES, segundo a descrição de ROTHFIELD (1977) e em 73% de acordo com as observações de TAN et al. (1982). Embora a presença da célula LE tenha sido a terceira característica com o maior número de observações, ela se apresentou com frequência inferior às frequências descritas na literatura. Em relação ao desenvolvimento de serosites, a pleurite foi observada em aproximadamente 50% dos pacientes, (SCHUR, 1989; TAN et al., 1982), enquanto que a pericardite foi relatada em 8 a 48% dos indivíduos por SCHUR (1989), em 21% por ROTHFIELD (1977) e em 18% dos pacientes nas observações feitas por TAN et al., (1982). Segundo as nossas observações, constatamos o desenvolvimento destas serosites, tanto pleurite como a pericardite, em aproximadamente 30% do grupo, sendo que 20% dos indivíduos apresentaram pleurite e também pericardite (tabela 4). Quanto ao comprometimento renal, SCHUR (1989) relata o acometimento deste distúrbio em aproximadamente 50% enquanto que TAN et al. (1982) descreveram-no em 60% dos pacientes. Alterações hematológicas como o desenvolvimento de leucopenia ($<4000/\text{mm}^3$), anemia hemolítica e trombocitopenia se expressaram em 46%, 18% e 21% dos indivíduos, respectivamente, segundo TAN et al.

(1982), enquanto que ROTHFIELD (1977) descreve a presença de leucopenia ($<4000/\text{mm}^3$) em apenas 5% dos lúpicos e anemia hemolítica em 17% dos indivíduos. No nosso trabalho, 20% dos indivíduos apresentaram leucopenia ($<4000/\text{mm}^3$) e plaquetopenia e 13% desenvolveram anemia hemolítica. Nenhuma delas apresentou trombocitopenia (dados não mostrados). De uma maneira geral, as frequências de algumas das manifestações clínico-laboratoriais observadas no nosso trabalho se assemelham às já descritas, principalmente em relação às manifestações de caráter cutâneo e articular, muito embora a literatura aborde tais caracteres em indivíduos de ambos os sexos.

Uma das manifestações características do LES, descrita e considerada como único caracter a ser quase que universalmente positivo (TAN et al., 1982), presente em todos os pacientes com LES (ROTHFIELD, 1977) é o fator antinuclear, o qual, em nosso trabalho, se revelou positivo em todas as mulheres lúpicas do grupo. A distribuição de frequências para os títulos deste fator, numa amostra de 37 indivíduos, apresentou um perfil contínuo, com um aspecto de curva bimodal (figura 1). São extremamente comuns as características biológicas expressas por variáveis contínuas que mostram grande ajustamento à distribuição normal (BEIGUELMAN, 1991). Portanto, este aspecto da distribuição dos títulos do FAN reforça a idéia da continuidade e da aproximação das respostas biológicas à curva normal. Muito provavelmente outros parâmetros biológicos mensuráveis expressos neste mesmo grupo de indivíduos como, títulos de autoanticorpos, níveis dos componentes do sistema complemento, etc, também mostrariam um perfil de continuidade.

Talvez possamos dizer que o lupus eritematoso sistêmico esteja muito bem caracterizado enquanto doença, frente aos inúmeros critérios abordados que o caracterizam como tal e diante das extensivas investigações em torno de parâmetros clínicos e laboratoriais. No entanto, os eventos precoces responsáveis pelas anormalidades imunoregulatórias ainda são pouco compreendidos. Tais irregularidades têm sido muito estudadas sob a óptica da produção defectiva de citocinas regulatórias, dentre elas, a IL-1, a IL-2 e a IL-10. Diversos autores apontam para uma deficiência na produção da IL-2 em LES, tanto em humanos como em modelos murinos. ISRAELI-LINKER et al. (1983) observaram baixa atividade de IL-2 em pacientes recém diagnosticados ou tratados com drogas não esteóides e em pacientes em tratamento com prednisona em doses que variaram de 2 a 60 mg. MURAKAWA et al. (1985) verificaram que indivíduos com doença inativa, tratados com corticoesteróides ou drogas imunossupressoras ou ainda, sem este tipo de medicação e pacientes tratados com baixas doses de corticoestróides (<10mg/dia) revelaram uma baixa produção de IL-2. Em determinadas linhagens de camundongos, a deficiência na atividade da IL-2 tem sido correlacionada ao desenvolvimento de uma síndrome *LES típica*, sugerindo uma relação entre baixa produtividade desta citocina e um gene recessivo autossomal que é responsável pelo lupus murino (TALAL et al., 1982). Estes últimos autores também sugerem uma relação entre o efeito benéfico de hormônios masculinos e a produção da IL-2, uma vez que o andrógeno é capaz de manter a atividade desta citocina em camundongos NZB/NZW. É interessante observar que praticamente todos estes autores acreditam que a deficiência na produção desta citocina possa ser extremamente relevante para as

anormalidades imunoregulatórias no LES, contribuindo significativamente para esta patogenia.

Ao contrário da literatura, não pudemos observar deficiência na produção da IL-2 no grupo de lúpicos por nós estudado. Muito embora 25% do grupo não apresentaram níveis detectáveis desta citocina (tabela 6), a dispersão dos valores, tanto no grupo portador como no grupo controle, foi praticamente a mesma (figuras 4 e 5). Um dos elementos que devemos considerar ao discutirmos este processo é o efeito da corticoterapia na regulação da produção da IL-2. Os trabalhos experimentais de DAYNES & ARANEO (1989) e DAYNES et al. (1990) mostram que há um efeito depressor da síntese de IL-2 por linfócitos T murinos quando tratados com baixas doses de glucocorticóides *in vivo* e *in vitro*. Os trabalhos relativos à baixa produção desta linfocina em grupos de indivíduos portadores de LES se referem, na maioria, aos indivíduos tratados com corticosteróides, muito embora LINKER-ISRAELI et al. (1983) tenham observado síntese defectiva de IL-2 em lúpicos recém diagnosticados ou tratados com drogas não esteróides assim como MUROKAWA et al (1985) que observou tal fenômeno também em pacientes com este tipo de medicação. Portanto, diante destas últimas referências e diante dos nossos dados, parece-nos plausível considerar que, muito provavelmente em LES, a baixa produção da IL-2 não esteja diretamente relacionada à corticoterapia, assim como longos períodos de tratamento com esteróides imunossupressores não implicam na baixa síntese desta citocina, conforme apontam os nossos resultados. Entendemos que a não significativa produção da IL-2 em LES, observada em nosso trabalho, reflita uma possível

recuperação do estado de equilíbrio juntamente com a doença neste grupo de mulheres, e que os fatores ambientais exerçam pressões a um nível individual, não nos permitindo classificá-las como lúpicas que produzem baixos níveis de IL-2. Não parece estar esclarecido se a baixa produção de IL-2 afeta todos os indivíduos portadores de doenças autoimunes, uma vez que seus níveis são altamente variáveis em ensaios *in vitro*, inclusive em grupos controle (KROEMER et al., 1991). ALCOCER-VARELA et al. (1996), em sua descrição sobre a desregulação imunológica no LES, menciona seu estudo anterior que mostrou uma recuperação da resposta proliferativa à IL-2 por células T de pacientes portadores após 6 meses de tratamento, assim como a normalização da produção da IL-2, 2 anos após o tratamento.

A provável correlação existente entre a atividade da IL-2 e deficientes níveis séricos do hormônio dehidroepiandrosterona (DHEA), o qual parece estar diretamente envolvido na regulação desta citocina, tem sido bastante elucidado (DAYNES et al., 1990; SUZUKI et al., 1991; MEIKLE et al., 1992; SUZUKI et al., 1995). Segundo as observações de SUZUKI et al. (1995), esta pode ser uma das causas da deficiente produção da IL-2 no LES. A administração de DHEA oral em mulheres com lupus agudo a moderado resultou no melhoramento de alguns aspectos clínicos da maioria dos pacientes além de ter diminuído a dose requerida de corticosteróides (VAN VOLLENHOVEN et al., 1994). Em nosso trabalho, as concentrações séricas do hormônio DHEA e do sulfato de DHEA (DHEA-S) no grupo lúpico estavam significativamente diminuídos em relação ao controle (figuras 2 e 3). Estes resultados estão condizentes com as descrições de HEDMAN et al. (1989) e

SUZUKI et al. (1995), os quais observaram declínio na concentração sérica destes hormônios em indivíduos portadores de LES. Uma importante questão a ser relevada referente ao nível de DHEA em indivíduos portadores de LES, submetidos ao tratamento com corticoesteróide há um longo tempo, é: será que a deficiência do nível sérico deste hormônio possa estar fortemente relacionada à supressão da função do córtex da glândula adrenal? As observações de SUZUKI et al. (1995) atestam para o fato de que esta correlação pode não ser verdadeira uma vez que lúpicos não tratados com corticoesteróides também apresentam baixas concentrações de DHEA. Na nossa casuística, do total das 20 mulheres portadoras de LES que tiveram seu soro pesquisado para a determinação hormonal, 3 delas, que há mais de 6 meses não faziam uso de drogas imunossupressoras, também apresentaram baixos níveis hormonais. Esta questão referente à modulação hormonal envolvendo DHEA e cortisol deve ser melhor examinada. HORNSBY (1995), na sua revisão sobre a biosíntese do DHEA-S, tem algumas considerações a este respeito. Muito embora exista uma co-secreção destes dois hormônios, o raio da síntese do sulfato de DHEA e do cortisol nem sempre é concordante. A grande maioria do DHEA-S sintetizado é secretado pela zona reticularis do córtex da adrenal do adulto, enquanto que a zona fasciculata, também região do córtex da adrenal, é responsável essencialmente pela secreção de glucocorticóides. Alguns modelos propõem que a função da *zona reticularis* deva ser regulada separadamente, dependente do número de células *reticularis*, ao contrário dos modelos geralmente aceitos onde o nível de esteroidogênese estaria sob precisa regulação pelo mecanismo de *feedback*. Se assim for, é muito provável que a síntese de DHEA-S não seja regulada por

tal mecanismo. Além do mais, a dissociação entre a síntese de DHEA-S e de cortisol foi observada em diferentes fases da vida humana e sob diferentes condições fisiopatológicas. Mudanças no número de células da *zona reticularis* com baixa atividade enzimática é provavelmente uma das explicações, senão a principal, para a ocorrência desta dissociação. A depressão do nível do sulfato de DHEA tem sido observado em outras diversas ocasiões em que há comprometimento do bem-estar físico e mental. Baixas concentrações de DHEA-S em indivíduos com artrite reumatóide (HEDMAN et al. 1992), em casos de anorexia nervosa, na Síndrome de Cushing e em pacientes HIV positivos sugerem que geralmente a má saúde possa estar associada à baixa secreção de DHEA-S (HORNSBY, 1995).

Em relação aos nossos resultados, o padrão de produção da IL-2 após a administração da DHEA *in vitro* nas lúpicas não revelou alteração significativa (figuras 6 e 7). Este fato é compreensivo uma vez que a produção da IL-2, resultante de cultura de linfócitos sob o estímulo da PHA somente, não tenha revelado padrão específico, tampouco a variação da síntese da IL-2 após a administração da DHEA *in vitro* foi em um único sentido. Em outras palavras, isto quer dizer que em algumas amostras a produção desta citocina, após a adição do hormônio, mostrou-se aumentada enquanto que em outras, a síntese foi reduzida. Além do mais, os sobrenadantes que não apresentaram IL-2 detectáveis, no primeiro momento, revelaram uma situação estável mesmo após a adição do hormônio. A dispersão dos valores relativos aos níveis da IL-2, em ambos os casos, é praticamente a mesma, permitindo-nos observar melhor que realmente não houve discrepâncias entre os grupos.

Ao analisarmos esta mesma situação em relação ao grupo controle, observamos que os níveis da IL-2, após a adição do hormônio *in vitro*, também mostraram-se aumentados em algumas amostras e diminuídos em outras, sem diferenças significativas entre os grupos, à nível de síntese (figuras 8 e 9). Desta forma, gostaríamos de chamar a atenção para o aspecto da variabilidade em termos do comportamento da IL-2 frente ao hormônio DHEA, que se expressa tanto no grupo das lúpicas quanto no grupo controle a um nível individual. O padrão de produção da IL-2 neste grupo, após a adição do hormônio, reforça ainda mais a nossa leitura em relação ao grupo da mulheres portadoras de LES, de que elas se encontram num estado de equilíbrio apesar da doença.

Ao se pensar no LES como doença que tenha como uma das fortes características a hiperatividade de células B e consequente formação de anticorpos contra antígenos nucleares, consideramos importante verificar a expressão da IL-4, uma vez que esta citocina tem mostrado propriedades regulatórias importantes na resposta imune humoral, dentre elas, atuar como fator de crescimento para as células B (BCGF) e induzir a produção dos anticorpos IgG1. Tendo isso como premissa, o envolvimento desta citocina no desenvolvimento de doenças autoimunes mediadas por anticorpos, como o LES por exemplo, seria totalmente aceitável. Na literatura, alguns autores têm associado os efeitos benéficos resultantes de determinados tratamentos em LES experimental com modulações das citocinas, dentre elas, a IL-4. SEGAL et al. (1995) observaram uma melhora das manifestações clínicas do LES induzido em camundongos BALB/c juntamente com o aumento da secreção de

diversas citocinas, inclusive da IL-4, após o tratamento *in vivo* com Methotrexato. Os níveis de produção da IL-4, além das outras citocinas, também foram significativamente aumentadas após o tratamento com tamoxifen e anti-estradiol em LES experimental induzido, onde também pôde ser observado efeito terapêutico benéfico (DAYAN et al., 1997). Em humanos, os níveis de IL-4 no soro de pacientes com LES ativo não mostraram níveis significativamente baixos em relação ao controle sadio (AL-JANADI et al. 1994). Em seu recente estudo, SANTIAGO et al (1997), ao trabalharem com camundongos transgênicos para a IL-4, apontam um efeito protetor desta interleucina contra o desenvolvimento espontâneo de glomerulonefrite típica do LES. Estes autores sugerem uma ligação entre a IL-4 e a redução de respostas da subpopulação Th1 envolvidas na produção de autoanticorpos, resultando na proteção contra a doença. Desta forma, a IL-4 parece assumir um importante papel na modulação das respostas de Th1 e Th2. Quanto aos nossos resultados em relação à produção da IL-4, não pudemos constatar diferenças significativas entre os grupos lúpico e controle (figura 10). A dispersão dos valores em ambos os grupos foi a mesma, claramente visualizado pelos histogramas (figura 11). O fato da IL-4 não ter sido detectada pelo ensaio em praticamente 50% do grupo poderia estar condizente com os dados na literatura caso não tivesse se aproximado às observações feitas em relação ao grupo controle, onde 36% também não mostraram níveis detectáveis para a IL-4 (tabela 11).

Assim como procuramos observar o efeito do hormônio DHEA na síntese da IL-2 por linfócitos T ativados de indivíduos portadores de LES,

investigamos também a interação deste hormônio na produção da IL-4 nesta patogenia. Alguns autores têm observado o comportamento desta interleucina frente a DHEA em camundongos normais com o intuito de se compreender a ação deste hormônio esteróide em comparação ao efeito de glucocorticóides sobre a IL-4. DAYNES & ARANEO (1989) já haviam mostrado, em ensaios com camundongos C3H/HeN, que a administração *in vivo* de Dexametasona aumentava a produção da IL-4 por células T estimuladas com OVA *in vivo* e *in vitro*. WU et al. (1991) observaram um aumento considerável na síntese da IgE estimulada pela IL-4, resultante de linfócitos humanos ativados, quando tratados com glucocorticóides. Células linfóides de camundongos tratados com DHEA e DHEA-S, após imunização com OVA, assim como o pré-tratamento destas células com DHEA nas concentrações que variaram de 10^{-6} a 10^{-12} M, não modificaram o padrão de secreção da IL-4 em relação ao controle (DAYNES et al., 1990). PADGETT et al. (1995) mostraram que camundongos BALB/c estimulados com anti-IgD revelaram um desrêscimo na concentração sérica da IL-4 após o tratamento *in vivo* com DHEA e um aumento da produção desta mesma citocina quando tratados com hidro cortisona. No LES, o efeito da DHEA sobre a produção da IL-4, provenientes de linfócitos T de pacientes, não foi de forma alguma relevante (SUZUKI et al., 1995). As nossas observações estão condizentes com estes últimos dados. Ao estabelecermos o valor de 10 pg/ml como limite inferior para considerarmos que houve modificação do padrão de secreção da IL-4 após o tratamento com DHEA no grupo lúpico, observamos que 60% do grupo mostraram estabilidade em relação à síntese desta citocina (tabelas 12 e 13). Além do mais, a não relevância entre os grupos tratado e não tratado com DHEA quanto à produção da IL-4 é

perfeitamente aceitável uma vez que a síntese desta citocina não tenha revelado padrão de produção específico, assim como discutimos anteriormente quanto ao perfil da IL-2.

Em relação ao controle, a estabilidade do padrão de secreção da IL-4 entre os grupos tratados ou não com o hormônio, foi observada em grande parte do grupo. Como não houve significância entre os grupos quanto à síntese da IL-4, estes resultados, analisados por si só, sem propósito de comparação com os eventos do grupo das portadoras, estão de acordo com os trabalhos descritos na literatura, acima citados e que não associam modificação do padrão da IL-4 com o hormônio DHEA.

Em relação ao padrão de produção da IL-10, observamos um significativo aumento na síntese desta citocina no grupo das portadoras de LES, quando comparadas ao controle, nas amostra que não receberam estímulo (figuras 22 e 23). LLORENTE et al. (1994) observaram uma produção aumentada da IL-10 *in vitro*, por células mononucleares, não estimuladas, do sangue periférico de pacientes com artrite reumatóide, síndrome de Sjörgren e LES. Estes autores apontam o não envolvimento de linfócitos T neste processo, e sim, o envolvimento de linfócitos B ou monócitos. HOUSSIAU et al. (1995) detectaram níveis de IL-10 no soro de pacientes com LES e estabeleceram uma correlação positiva com a atividade da doença e com títulos de anticorpos anti-DNA. As observações de ROUSSET et al. (1992) mostram que a IL-10 induz linfócitos B humanos ativados a secretarem grandes quantidades de IgG, IgA e IgM, atuando como um potente fator de

crescimento e de diferenciação para estas células. A IL-10 tem sido apontada como citocina que tem forte contribuição no processo de desenvolvimento no LES pelo seu importante papel na amplificação de respostas humorais, por estar relacionada com a hiperatividade de linfócitos B e com a produção de autoanticorpos (LLORENTE et al., 1995).

As observações de que o padrão de síntese da IL-10 em LES não implica envolvimento de células T (LLORENTE et al., 1994; LLORENTE et al., 1995) vão ao encontro dos nossos resultados, onde o nível de produção desta citocina, resultante de cultura de linfócitos sob estímulo da PHA, não foi significativo em relação ao controle (figuras 16 e 17). Ao contrário destas últimas observações, o nível da IL-10 em sobrenadante de cultura de células esplênicas estimuladas com Concanavalina A, no LES experimental induzido, mostrou-se aumentado em relação ao controle (SEGAL et al., 1994; DAYAN et al., 1995). Este ponto contraditório em relação às células que possam estar envolvidas na síntese desregulada da IL-10 em modelos humano e experimental, não elimina o fato de que esta citocina tenha um importante envolvimento na hiperatividade das células B e formação de autoanticorpos, uma vez que o LES induzido em camundongos se parece, em muitos aspectos, com o LES humano, principalmente em relação aos altos níveis de autoanticorpos formados (SEGAL, et al., 1995).

Portanto, os nossos dados em relação ao padrão aumentado da IL-10 em amostras sem estímulos, em comparação aos dados relativos às amostras estimuladas com o mitógeno, indicam que, na nossa casuística a produção da

IL-10 deve ser oriunda de linfócitos B ou monócitos, e não de células T, uma vez que as culturas de células mononucleares do sangue periférico, na ausência de estímulo, permite que as demais células, com exceção dos linfócitos T que não revelaram significativos envolvimento quando estimulados especificamente, contribuam, muito provavelmente sob forma ativada, com o seu padrão de produção.

Quanto à influência do hormônio DHEA na síntese da IL-10 em LES, não constatamos diferenças significativas entre as amostras tratadas e as não tratadas com o hormônio (figura 18). Ao estabelecermos os valores maiores ou iguais a 9,5 pg/ml como limite inferior para considerarmos que houve modificação do padrão de síntese da citocina, constatamos que praticamente metade do grupo revelou um aumento enquanto que as demais integrantes mostraram uma diminuição do nível de produção da IL-10, após o tratamento hormonal em cultura (tabelas 16 e 17). Estes eventos se reproduziram no grupo controle, onde foi constatado uma variação positiva, na síntese da IL-10, em metade do grupo enquanto que as demais revelaram uma diminuição do seu nível de produção.

Na literatura, investigações que relacionem IL-10 e DHEA em LES são escassas. Estudos que se aproximam a este tipo de interação são aqueles que abordam modulação de citocinas com a idade, e o papel do hormônio DHEA é apontado como crucial. Alguns trabalhos têm mostrado que a desregulação na produção de citocinas pode estar fortemente relacionada com várias doenças associadas à idade, como por exemplo, a IL-6 e a IL-10, que tem importante

papel no desenvolvimento do processo da autoimunidade (LLORENTE et al., 1994; NAGEL, et al., 1988). Terapia com DHEA e DHEA-S *in vivo* em camundongos velhos restauraram os níveis aumentados de IL-10, IL-6 e IFN- γ secretados por células linfóides não estimuladas (SPENCER et al., 1995). Estes autores sugerem que o DHEA-S possa ser um regulador natural das atividades enzimáticas dos peroxissomas, que por sua vez, normaliza a composição de ácidos graxos na membrana celular de linfócitos e macrófagos que se altera com o avanço idade. Desta forma, as atividades destas células poderiam ser recuperadas.

Diante desta atraente hipótese, gostaríamos de levantar a seguinte questão: Na condição de hormônio esteróide, será que o longo tempo de tratamento com corticoestróide poderia resultar na recuperação da referida atividade enzimática dos peroxissomas, uma vez que os níveis séricos do hormônio DHEA-S, na nossa casuística, se encontram baixos? Caso fosse verdade, a falta de significância dos resultados entre os grupos, lúpico e controle, quanto ao padrão de produção das citocinas pelas células T, estaria baseada na recuperação das atividades por estas células, comportamento este observado em alguns estudos longitudinais em LES, em relação à IL-2, conforme citado anteriormente.

Muito embora existam inúmeras evidências sobre o envolvimento das citocinas no desenvolvimento do processo da autoimunidade, mais especificamente, no LES, nós não conseguimos identificá-los como pretendíamos ou esperávamos. A nossa principal questão era saber como se

comportaria algumas das citocinas secretadas pelas células Th1-*like* e Th2-*like* quando as mudanças no circuito imunoregulatório levasse à formação de autoanticorpos. Num primeiro momento, acreditávamos que poderíamos visualizar cada uma destas citocinas, desempenhando o papel que, teoricamente, atribuímos a elas, justificando o desenvolvimento da doença. No entanto, a nossa matemática imunoregulatória falhou. A análise comparativa das distribuições das frequências das 3 citocinas, resultantes de sobrenadante de cultura sob estímulo do mitógeno, nos grupos lúpico e controle, nos dá a idéia do comportamento de cada uma delas em relação à outra (figuras 24 e 25). Ao compararmos esses grupos, apesar de não haver diferenças significativas, nos chamou a atenção o comportamento da IL-10 em LES, a qual revelou um perfil contínuo e um deslocamento de suas concentrações em relação às demais, fatos estes não observados no controle. A acentuada variabilidade, quanto à síntese de citocinas, que observamos no grupo lúpico e que também se expressa no grupo controle nos leva a concluir que a influência dos fatores ambientais tenha sido crucial na expressão individual. A observação deste comportamento no grupo controle sirva de parâmetro para mostrar que as mulheres portadoras de LES talvez tenham resgatado um estado de equilíbrio, juntamente com a doença, pelo menos no que diz respeito ao padrão das citocinas oriundas de células T.

6 - CONCLUSÕES

1. Os níveis séricos do hormônio DHEA assim como as concentrações de seu sulfato estavam significativamente diminuídos no grupo das mulheres portadoras de LES em relação ao grupo controle.
2. Não observamos diferenças entre os grupos quanto à produção de IL-2, IL-4 e IL-10, oriundas de sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico estimuladas com PHA.
3. Não foi possível constatar influência do hormônio DHEA sobre a síntese das referidas interleucinas.
4. A produção aumentada da IL-10 por células mononucleares não estimuladas, no LES, sugere um envolvimento de células B e/ou monócitos ativados neste processo.
5. A acentuada variabilidade na síntese das citocinas, em ambos os grupos, sugere uma forte influência dos fatores ambientais que exercem pressões em um nível individual.

7 - RESUMO

O desequilíbrio imunoregulatório no LES se caracteriza pela excessiva produção de imunoglobulinas e autoanticorpos direcionados contra antígenos nucleares, e pelas anormalidades funcionais da célula T, que podem se expressar através de padrões alterados de produção das citocinas relacionadas, principalmente as sintetizadas pelas subpopulações Th1 e Th2. A deficiência na produção da IL-2 tem sido apontada como um evento comum nesta doença, sendo diretamente correlacionada, por alguns autores, aos baixos níveis séricos do hormônio DHEA. Neste trabalho, propusemos um estudo dos padrões de síntese de algumas das citocinas sintetizadas pelas células Th1 e Th2 *in vitro*, as quais incluem a IL-2, a IL-4 e a IL-10, em mulheres com LES. Com o objetivo de se verificar a existência de uma associação entre estes padrões e a produção do hormônio DHEA, foi realizada determinação sérica hormonal. Os nossos resultados revelaram uma significativa diminuição das concentrações séricas da DHEA no grupo das portadoras da doença, em relação aos indivíduos controle. Células mononucleares do sangue periférico, estimuladas com PHA, oriundas de indivíduos com LES, não revelaram padrão alterado de produção de citocinas quando comparadas aos padrões das mesmas em amostras dos indivíduos do grupo controle. Constatamos uma variabilidade acentuada na secreção destas interleucinas, em ambos os grupos. O hormônio DHEA, quando adicionado à cultura de células, também não alterou o padrão de síntese de nenhuma das citocinas relacionadas. Observamos uma produção aumentada da IL-10 pelas células mononucleares dos indivíduos com LES, em relação ao controle, nas

culturas de células que não receberam estímulos exógenos, sugerindo um envolvimento de linfócitos B e/ou monócitos possivelmente ativados neste processo. Portanto, o nosso estudo não revelou envolvimento das subpopulações Th1 e Th2 no grupo das mulheres lúpicas, tampouco envolvimento do hormônio DHEA no padrão de secreção, muito embora este hormônio esteja significativamente diminuído neste grupo. A acentuada variabilidade na síntese das citocinas pesquisadas, em ambos os grupos, sugere uma forte influência dos fatores ambientais e provavelmente, a recuperação do equilíbrio imunoregulatório, pelo menos quanto ao envolvimento destas subpopulações celulares.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALCOCER-VARELA, J., LLORENTE, L. & ALARCON-SEGOVIA, D. Immunoregulatory circuits and potential treatment of connective tissue diseases. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **111**: 348-354, 1996.
- AL-JANADI, M., ABDULHAMID, A-W. & RAZIUDDIN, S. Soluble CD23 and interleukin-4 levels in autoimmune chronic active hepatitis and systemic lupus erythematosus. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **71**: 33-37, 1994.
- ANDREWS, B. S., EISENBERG, R. S., THEOPHILOPOULOS, A. N., IZUI, S., WILSON, C. B., McCONAHEY, P. J., MURPHY, E. D., ROTH, J. B. & DIXON, F. J. Spontaneous murine lupus-like syndromes. Clinical and immunopathological manifestations in several strains. *J. Exp. Med.*, **148**: 1198, 1978.
- BARRET-CONNOR, E. & GOODMAN-GRUEN, D. The epidemiology of DHEAS and cardiovascular disease. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **774**: 259-270, 1995.
- BEIGUELMAN, B. *Curso Prático de Bioestatística*. 2a ed., Revista Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, Cap.4, p 95-134, 1991.
- BUFFINGTON, C. K., POURMOTABBED, G. & KITABCHI, A. E. Case report: Amelioration of insulin resistance in diabetes with dehydroepiandrosterone. *Am. J. Med. Sci.*, **306**: 320-324, 1993.
- CARLSTEN, H., HOLMDAHL, R., TARKOWSKI, A. & NILSSON, L. A. Oestradiol suppression of delayed-type hypersensitivity in autoimmune (NZB/NZW)F1 mice is a trait inherited from the healthy NZW parental strain. *Immunology*, **67**: 205-209, 1989.
- DA SILVA, J. A. Sex hormones, glucocorticoids and autoimmunity: facts and hypotheses. *Ann. Rheum. Dis.*, **54**: 6-16, 1995.

- DAYAN, M., ZINGER, H., KALUSH, F., MOR, G., AMIR-ZALTZMAN, Y. & KOHEN, F. The beneficial effects of treatment with tamoxifen and anti-oestradiol antibody on experimental sytemic lupus erythematosus are associated with cytokine modulations. *Immunology*, **90**: 101-108, 1997.
- DAYNES, R.A. & ARANEO, B. A. Contrasting effects of glucocorticoids on the capacity of T cells to produce the growth factors interleukin 2 and intrleukin 4. *Eur. J. Immunol.*, **19**: 2319-2325, 1989.
- DAYNES, R.A., DUDLEY, D. J. & ARANEO, B.A. Regulation of murine lymphokine production in vivo. II. Dehydroepiandrosterone is a natural enhancer of interleukin 2 synthesis by helper T cells. *Eur. J. Immunol.*, **20**: 793-802, 1990.
- DAYNES, R. A., ARANEO, B. A., DOWELL, T. A., HUANG, K. & DUDLEY, D. Regulation of murine lymphokine production in vivo. III. The lymphoid tissue microenvironments exerts regulatory influences over T helper functions. *J. Exp. Med.*, **171**: 979-996, 1990.
- DAYNES, R. A., ARANEO, B. A., ERSHLER, W. B., MALONEY, C., GANG-ZHOU, L. & RYU, S-Y. Altered regulation of IL-6 production with normal aging. *J. Immunol.*, **150**: 5219-5230, 1993.
- DEAPEN, D. M., WEINRIB, L., LANGHOLZ, B., et al. A revised estimate of twin concordance in SLE: A survey of 138 pairs. *Arthritis Rheum.*, **29**: S26, 1986.
- DE HORATIUS, R. J., RUBIN, R. & MESSNER, R. P. Lymphocytotoxic antibodies in laboratory personnel exposed to SLE sera. *Lancet*, **2**: 1141-1142, 1972.
- DE HORATIUS, R. J., PILLARISSETTY, R., MESSNER, R. P. & TALAL, N. Anti-nucleic acid antibodies in systemic lupus erythematosus patients and their families. Incidence and correlation with lymphocytotoxic antibodies. *J. Clin. Invest.*, **56**: 1149-1154., 1975.
- FALANY, C. N., COMER, K. A., DOODLEY, T. P. & GLATT, H. Human dehydroepiandrosterone sulfotransferase. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **774**: 59-72, 1995.

- FESSEL, W. J. Epidemiologic of systemic lupus erythematosus. *Rheum, Dis. Clin. of North Am.*, **14**: 15-24, 1988.
- FRIOU, G. J. Clinical application of lupus serum-nucleoprotein reaction using fluorescent antibody technique. *J. Clin. Invest.*, **36**: 890, 1957.
- GRIFFING, W. L., MOORE, S., LITHRA, H. S., et al. 1980. Associations of the antibodies to native DNA with HLA-DR23: a possible major histocompatibility linked human immune response gene. *J. Exp. Med.*, **152**: 319S.
- HARGRAVES, M. M., RICHMOND, H. & MORTON, R. Presentation of two bone marrow elements: the "tart" cell and the "LE" cell. *Proc. Staff Meet. Mayo Clin.*, **23**: 25-28, 1948.
- HARLEY, J.B., KIMBERLEY, K.G. Autoantibodies. *Rheum. Dis. Clin. of North Am.*, **14**: 43-56, 1988.
- HELYER, B. J. & HOWIE, J. B. Renal disease associated with positive lupus erythematosus in cross-bred strains of mice. *Nature (London)*, **197**: 197, 1963.
- HERRINGTON, D. M. Dehydroepiandrosterone and coronary atherosclerosis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **774**: 271-280, 1995.
- HORNSBY, P. J. Biosynthesis of DHEAS by the human adrenal cortex and its age-related decline. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **774**: 29-46, 1995.
- HOUSSIAU, F. A., LEFEBVRE, C., BERGHE, M. V., LAMBERT, M., DEVOGELAER, J-P. & RENAULD, J-C. Serum interleukin 10 titers in systemic lupus erythematosus reflect disease activity. *Lupus*, **4**: 393-395, 1995.
- HUANG, F-P. & STOTT, D. I. Dual inhibitory and stimulatory activities in serum from SLE patients and lupus mice that regulate the proliferation of an IL-2-dependent T cell line. *Lupus*, **4**: 297-303, 1995.

- INMAN, R. D. Immunologic sex differences and the female predominance in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.*, **21**: 849, 1978.
- ISRAELI-LINKER, M., BAKKE, A. C., KITRIDOU, R. C., GENDLER, S., GILLIS, S., & HORWITZ, D.A. Defective production of interleukin 1 and interleukin 2 in patients with systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.*, **130**: 2651-2655, 1983.
- KIMBERLEY, R.P. Corticosteroids and anti-inflammatory drugs. *Rheum. Dis. Clin. of North Am.*, **14**: 203-221, 1988.
- KLINMAN, D. M. & STEINBERG, A. D. Inquiry into murine and human lupus. *Immunol. Rev.*, **144**: 157-193, 1995.
- KROEMER, G., ANDREU, J. L., GONZALO, J. A., GUTIERREZ-RAMOS, J. C. & MARTINEZ-A, C. Interleukin-2, autotolerance and autoimmunity. *Adv. Immunol.*, **50**: 147-235, 1991.
- LABRIE, F., BÉLANGER, A., SIMARD, J., LUU-THE, V. & LABRIE, C. DHEA and peripheral androgen and estrogen formation: intracrinology. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **774**: 16-28, 1995.
- LIEBERMAN, S. An abbreviated account of some aspects of the biochemistry of DHEA, 1934-1995. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **774**: 1-15, 1995.
- LINKER-ISRAELI, M., DEANS, R. J., WALLACE, D. J., PREHIN, J., OZERI-CHEN, T. & KLINENBERG, J. R. Elevated levels of endogenous IL-6 in systemic lupus erythematosus: A putative role in pathogenesis. *J. Immunol.*, **147**: 117-123, 1991.
- LLORENTE, L., RICHAUD-PATIN, Y., FIOR, R., ALCOCER-VARELA, J., WIDJENES, J., FOURRIER, B. M., GALANAUD, P. & EMILE, D. In vivo production of interleukin-10 by non-T cells in rheumatoid arthritis, Sjögren's syndrome, and systemic lupus erythematosus: A potential mechanism of B lymphocyte hyperactivity and autoimmunity. *Arthritis Rheum.*, **37**: 1647-1655, 1994.

- LLORENTE, L., ZOU, W., LEVY, Y., RICHAUD-PATIN, Y., WIDEJENS, J., ALCOCE-
VARELA, J., MOREL-FOURRIER, B., BROUET, J.C., ALARCON-SEGOVIA, D.,
GALANAUD, P. & EMILIE, D. Role of interleukin 10 in the B lymphocyte hyperactivity
and autoantibody production of human systemic lupus erythematosus. *J. Exp. Med.*,
181: 839-844, 1995.
- LONGCOPE, C. Metabolism of dehydroepiandrosterone. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **774**: 143-
148, 1995.
- LUCAS, J. A., AHMED, S. A., CASEY, M. L. & MACDONAL, P. C. Prevention of
autoantibody formation and prolonged survival in New Zealand Black/New Zealand
White F1 mice fed dehydroepiandrostrone. *J. Clin. Invest.*, **75**: 2091-2099, 1985.
- MALEFYT, R. W., ABRAMS, J., BENNETT, B., FIGDOR, C. G. & VRIES, J. E. Interleukin
10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of
IL-10 produced by monocytes. *J. Exp. Med.*, **174**: 1209-1220, 1991.
- MALEFYT, R. W., YSSEL, H. & VRIES, J. E. Direct effects of IL-10 on subsets of human
CD4⁺ T cell clones and resting T cells. *J. Immunol.*, **150**: 4754-4765, 1993.
- MEIKLE, A.W., DORCHUCK, R.W., ARANEO, B. A., STRINGHAM, J. D., EVANS, T. G.,
SPRUANCE, S. L. & DAYNES, R.A. The presence of a dehydroepiandrosterone-
specific receptor binding complex in murine T cells. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*,
42: 293-304, 1992.
- MOSMANN, T. R., CHERWINSKI, H., BOND, M. W., GIEDLIN, M. A. & COFFMAN, R. L.
Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of
lymphokine activities and secretes proteins. *J. Immunol.*, **136**: 2348-2357, 1986.
- MOSMANN, T. R. & COFFMAN, R. L. Two types of mouse helper T-cell clone. *Immunol.*
Today, **8**: 223-227, 1987.

- MOSMANN, T. R. & COFFMAN, R. L. Th1 and Th2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Ann. Rev. Immunol.*, **7**: 145-173, 1989.
- MURAKAWA, Y., TAKADA, S., UEDA, Y., SUZUKI, N., HOSHINO, T. & SAKANE, T. Characterization of T lymphocyte subpopulations responsible for deficient interleukin 2 activity in patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol.*, **134**: 187-195, 1985.
- NEISCHLAG, E., LORIAUX, D. L., RUDER, H. J., ZUCKER, I. R., KIRSCHNER, M. A. & LIPSETT, M. B. The secretion of dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulphate in man. *J. Endocr.* **57**: 123-134, 1973.
- NESTLER, J. DHEA: a coming age. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **774**: ix-xi, 1995.
- ORENTREICH, N., BRIND, J. L., RIZER, R. L. & VOGELMAN, J. H. Age changes and sex differences in serum dehydroepiandrosterone sulfate concentrations throughout adulthood. *J. Clin. Endocr. Metab.*, **59**: 551-555, 1984.
- PADGETT, D. A., SHERIDAN, J. F. & LORIA, R. M. Steroid hormone regulation of a polyclonal Th2 immune response. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **774**: 323-325, 1995.
- PARKER, L. N. Control of adrenal androgen secretion. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.*, **20**: 401-421, 1991.
- REICHLIN, M. & MATTIOLI, M. Correlation of a precipitin reaction to a RNA protein antigen and a low prevalence of nephritis in patients with systemic lupus erythematosus. *N. Engl. J. Med.*, **286**: 908-911, 1972.
- ROMAGNANI, S. Lymphokine production by human T cells in disease state. *Annu. Rev. Immunol.*, **12**: 227-257, 1994.

- ROTHFIELD, N. F. & STOLLAR, B. D. The relation of immunoglobulin class, pattern of antinuclear antibody, and complement fixing antibodies to DNA in sera from patients with systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Invest.*, **46**: 1785, 1967.
- ROTHFIELD, N. F. Systemic Lupus Erythematosus. In: KATZ, W.A. *Rheumatic Diseases: Diagnosis and Management*. J.B. Lippincott Co., p. 756-776, 1977.
- ROUBINIAN, J. R., PAPOIAN, R. & TALAL, N. Androgenic hormones modulate autoantibody responses and improve survival in murine lupus. *J Clin. Invest.*, **59**: 1066-1070, 1977.
- ROUBINIAN, J. R., TALAL, N., GREENSPAN, J. S., GOODMAN, J. R. & SIITERI, P. K. Effect of castration and sex hormone treatment on survival, anti-nucleic acid antibodies, and glomerulonephritis in NZB/NZW F1 mice. *J. Exp. Med.*, **147**: 1568-1583, 1978.
- ROUBINIAN, J. R., TALAL, N., GREENSPAN, J. S., GOODMAN, J. R. & SIITERI, P. K. Delayed androgen treatment prolongs survival in murine lupus. *J. Clin. Invest.* **63**: 902-911, 1979.
- ROUSSET, F., GARCIA, E., DEFRANCE, T., PÉRRONE, C., VEZZIO, N., HSU, D-H., KASTELEIN, R., MOORE, K. M. & BANCHEREAU, J. Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**: 1890-1893, 1992.
- SANTIAGO, M-L., FOSSATI, L., JACQUET, C., MÜLLER, W., IZUI, S. & REININGER, L. Interleukin-4 protects against a genetically linked lupus-like autoimmune syndrome. *J. Exp. Med.*, **6**: 65-70, 1997.
- SCHUR, P. H., MEYER, I., GAROVOY, M. & CARPENTER, C.B. Associations between systemic lupus erythematosus and major histocompatibility complex: clinical and immunological considerations. *Ann. Rheum. Dis.*, **47**: 913-917, 1988.

- SCHUR, P. H. Clinical features of SLE. In: KELLEY, W.N., HARRIS, E.D., RUDDY, S. & SLEDGE, C.B. *Textbook of Rheumatology*. 3rd ed. Philadelphia, W.B. Saunders Company, p.1101-1129, 1989.
- SEGAL, R., DAYAN, M. ZINGER, H. & MOZES, E. Methotrexate treatment in murine experimental systemic lupus erythematosus (SLE); clinical benefits associated with cytokine manipulation. *Clin. Exp. Immunol.*, **101**: 66-72, 1995.
- SMITH, C. D. & CYR, M. 1988. The history of lupus erythematosus. *Rheum. Dis. Clin. of North Am.*, **14**: 1-14.
- SMITH, H. R. & STEINBERG, H. D. Autoimmunity - A perspective. *Ann. Rev. Immunol.*, **1**: 175-210, 1983.
- SPENCER, N. F. L., POYNTER, M. E., HENNEBOLD, J. D., MU, H-H. & DAYNES, R. A. Does DHEAS restore immune competence in aged animals through its capacity to function as a natural modulator of peroxisome activities? *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **774**: 200-216, 1995.
- SPRONK, P. E., BORG, E. J., LIMBURG, P. C. & KALLENBERG, C. G. M. Plasma concentration of IL-6 in systemic lupus erythematosus; an indicator of disease activity? *Clin. Exp. Immunol.*, **90**: 106-110, 1992.
- SUZUKI, T., SUZUKI, N. DAYNES, R. A. & ENGLEMAN, E.G. Dehydroepiandrosterone enhances IL2 production and cytotoxic effector function of human T cells. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **61**: 202-211, 1991.
- SUZUKI, T. SUZUKI, N. ENGLEMAN, E. G., MIZUSHIMA, Y. & SAKANE, T. Low serum of dehydroepiandrosterone may cause deficient IL-2 production by lymphocytes in patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *Clin. Exp. Immunol.*, **99**: 251-255, 1995.

TALAL, N., DAUPHINEE, J. & WOFSY, D. Interleukin-2 deficiency, genes and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.*, **25**: 838-842, 1982.

TAN, E.M., COHEN, A.S., FRIES, J.F., MASI, A.T., MCSHANE, D.J., ROTHFIELD, N., SCHALLER, J.G., TALAL, N. & WINCHESTER, R.J. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.*, **25**: 1271-1277, 1982.

TAN, E. M. Antinuclear antibodies: diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for cell biology. *Adv. Immunol.*, **44**: 93-159, 1989.

THEOPHILOPOULOS, A. N. & DIXON, F. J. Murine models of systemic lupus erythematosus. *Adv. Immunol.*, **37**: 269-391, 1985.

VAN VOLLENHOVEN, R. F., ENGLEMAN, E. G. & MCGUIRE, J. L. An open study of dehydroepiandrosterone in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.*, **37**: 1305-1310, 1994.

WALLACE, D. J. & METZGER, A. L. Can an earthquake cause flares of rheumatoid arthritis or lupus nephritis? *Arthritis Rheum.*, **37**: 1826-1828, 1994.

WASICEK, C.A. & REICHLIN, M. Clinical and serological differences between systemic lupus erythematosus patients with antibodies to Ro versus patients with antibodies to Ro and La. *J. Clin. Invest.*, **69**: 835-843, 1982.

WINFIELD, J. B. , BRUNNER, C. M. & KOFFLER, D. Serologic studies in patients with systemic lupus erythematosus and central nervous system disease. *Arthritis Rheum.*, **21**: 239-248, 1978.

WU, C. Y., SARFATI, M., HEUSSER, C., FOURNIER, S., RUBIO-TRUJILLO, M., PELEMAN, R. & DELESPESE, G. Glucocorticoids increase the synthesis of immunoglobulin E by interleukin 4-stimulated human lymphocytes. *J. Clin. Invest.*, **87**: 870-877, 1991.

ANEXO - Ficha dos Pacientes Portadores de LES (*)

Nome:

HC:

Idade:

Sexo:

Raça:

Tempo de doença (meses):

Tempo de seguimento (meses):

Sintomas gerais:

1. Lesão malar ()
2. Lesão discóide ()
3. Fotossensibilidade ()
4. Alopecia ()
5. Úlcera oral ()

Outra manifestação cutânea:

Biópsia de pele:

6. Artrite ()
7. Artralgia ()
8. Necrose Asséptica ()

Outra manifestação articular:

9. Doença renal: Proteinúria () Cilindrúria () Hematúria ()
Hipertensão arterial ()

Outra alteração renal:

Biópsia renal:

10. Serosite: Pleurite () Pericardite ()

Outros:

- Infarto miocárdio ()
- Hemorragia pulmonar ()
- Hipertensão pulmonar ()
- Infiltrado intersticial ()
- Miocardite ()
- Endocardite ()

Outra manifestação pulmonar:

Outra manifestação cardíaca:

11. Neuropsiquiátrica: Convulsão () Psicose ()
 Neuropatia periférica ()
 Psicose por esteróide ()
 Neuropatia craniana ()
 Mielite transversa ()

Outra manifestação psiquiátrica:

Outra manifestação neurológica:

12. D.O hematológica: Anemia hemolítica ()
 Leucopenia < 4000 ()
 Linfopenia < 1500 ()
 Trombocitopenia < 100000 ()
 Taxa de hemoglobina quando do diagnóstico:

13. Síndrome de Sjorgen associada ()

14. Trato gastrointestinal ()

15. Alterações oculares ()

16. Fenômenos tromboembólicos ()

17. Doenças auto-imunes associadas:

18. Antecedentes de doenças auto-imunes:

19. Fenômeno de Raynaud ()

20. Mialgia e ou miopatia ()

21. Outras alterações clínicas:

22. Células LE:

23. FAN:

24. Anti-DNA:

Anti-Sm:

Anti-Ro:

Anti-La:

25. Outros auto anticorpos:

26. Sorologia para Lues:

Anticardiolipina:

27. Corticosteróides:

Anti-maláricos:

Ciclofosfamida:

Azatioprina:

Pulse de esteróides:

Pulse de ciclofosfamida:

Plasmaferese:

28. Complicações da terapêutica:

29. infecções:

(*) Elaborado pelo Serviço de Reumatologia do Hospital de Clínicas da UNICAMP.