

C472579
R905828
02/12/98

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ - UFC
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL

ASPECTOS IMUNOLÓGICOS DO LUPUS
ERITEMATOSO SISTÊMICO EM NOSSO
MEIO.(Fortaleza-Ceará)

D
616.78
T266a
1998

IRAMI PINHEIRO TAVARES TEIXEIRA

FORTALEZA

1998

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

UFC	BIBLIOTECA UNIVERSITÁRIA
Nº. R 905828	
02/12/98	

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ - UFC
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL

ASPECTOS IMUNOLÓGICOS DO LUPUS ERITEMATOSO
SISTÊMICO EM NOSSO MEIO.(Fortaleza-Ceará)

Irami Pinheiro Tavares Teixeira

Dissertação apresentada ao Curso de Pós- Graduação em Patologia e Medicina Legal do Centro de Ciências da saúde da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Patologia.

Orientador:
Prof.Dr. José Ajax Nogueira Queiroz

Fortaleza

1998

T266a Teixeira, Irami Pinheiro Tavares

Aspectos imunológicos do lupus eritematoso sistêmico em nosso meio

(Fortaleza-Ceará)/ Irami Pinheiro Tavares Teixeira- Fortaleza,1998

81f. : il

Inclui referências bibliográficas

Orientador: Prof. Dr. José Ajax Nogueira Queiroz

Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal do Ceará.

Departamento de Patologia e Medicina Legal.

1.Lupus eritematoso sistêmico. 2.Imunologia. I Título.

ASPECTOS IMUNOLÓGICOS LUPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO EM NOSSO MEIO

Dissertação apresentada ao Curso de Pós- Graduação em Patologia e Medicina Legal do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Patologia.

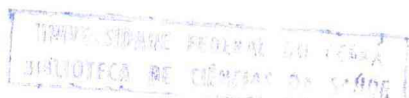
Data da aprovação : ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Ajax Nogueira Queiroz
Orientador

Prof. Dra. Yacy Mendonça

Prof. Dr Eilson Goes de Oliveira



Ao Deus do meu coração,
ao Deus da minha compreensão
à dádiva da vida.

Aos meus pais que souberam me orientar para a vida no
caminho da verdade e na busca do saber.

Ao meu esposo e filhos pelo apoio e compreensão nos
momentos ausentes.

AGRADECIMENTOS

Ao grande Criador por permitir nossa existência.

Ao meu orientador Dr. Ajax pelo incentivo e amizade.

A Dra. lacy por sua docilidade, amizade e exemplo como pesquisadora.

Ao Laboratório Clementino Fraga, pela possibilidade de usarmos seus equipamentos

Ao Dr. José Gerardo de Araújo por nos permitir que utilizássemos seu ambulatório e sua disponibilidade em sempre nos ajudar quando às dúvidas apareciam.

A todos os funcionários e professores do DPML e aos pacientes que colaboraram para realização deste trabalho.

Ao Dr Hermênio pelo incentivo ao gosto da imunologia.

A Dra. Margarida e a Adriana do Núcleo de Medicina Tropical por toda ajuda fornecida.

Ao prof. Dr. Henry de Holanda Campos, com sua tranquilidade e grande competência, muito contribuiu para a realização deste trabalho.

Ao Dr. Eilson Goes de Oliveira, homem culto que muito engrandece a medicina .

RESUMO

LES é uma doença que acomete vários órgãos e sistemas do ser humano. A etiologia é desconhecida, mas vários fatores, tais como, genéticos, imunológicos, ambientais, virais e até emocionais estão envolvidos com sua fisiopatologia. A prevalência do LES nas diversas regiões do planeta é bastante variável sendo de 4 a 250/100.000 habitantes. No Brasil, sua prevalência é desconhecida. O Les se enquadra no grupo das doenças auto-imunes, apresentando muitas alterações imunológicas. As mais freqüentes relatadas na literatura mundial são: a produção excessiva de auto-anticorpos e as alterações nos linfócitos T. O sistema imunológico e suas alterações incluindo a resposta imunológica, são determinadas geneticamente e são influenciadas pelas interações do indivíduo com o ambiente. A nossa região tem características climáticas e sócio-culturais que podem atuar no sistema imunológico e conseqüentemente as alterações encontradas nos pacientes com LES.

Este trabalho tem por objetivo comparar algumas alterações imunológicas encontradas em pacientes com LES no nosso meio com aquelas descritas na literatura mundial e procurar possíveis relações entre estas. Os pacientes com LES (n=20) foram provenientes do HUWC e HGCC, o grupo controle n=20 se constituiu de indivíduos normais pareados por idade e sexo, todos residentes em Fortaleza. A anamnese, exame clínico, exame hematológico e imunológicos foram usados na obtenção de informações para os critérios de inclusão ou exclusão dos indivíduos no trabalho e para classificar os pacientes no índice de atividade SLEDAI. (gravidade da doença). Os parâmetros para a avaliação imunológica foram obtidos, através da imunofenotipagem do linfócitos T (CD3), LT auxiliares (CD4), LTs/c supressor/citotóxico (CD8), linfócito B (CD19) e células NK (CD56) por citometria de fluxo, detecção dos auto-anticorpos anti DNA nativo e antifosfolípide por métodos imunoenzimático e exames hematológicos. Os resultados mostraram que o tempo de patologia variou de 30 dias a 11 anos com $x = 4,1$ anos, o índice SLEDAI variou de 0-35 com média de 11,8 e $s=9,8$. As principais manifestações clínicas apresentadas foram alterações de pele, mucosa e alopecia em 08(40%), artrite em 06(30%), vasculite em 5 (25%), serosite em 4(20%) e alterações do Sistema Nervoso Central (SNC) em 04(20%). As alterações laboratoriais principais foram: redução dos componentes do complemento (C3 e/ou C4) 13(68%), proteinúria 6(30%), hematuria 6(15%). As alterações no hemograma foram redução do hematócrito com $x = 33,1\%$ e dos linfócitos totais com $x = 1.680$ cels/mm³ ambas com $p < 0,005$ quando comparadas ao grupo controle. A Imunofenotipagem dos pacientes com LES em comparação com o grupo controle em valores absolutos mostrou redução na quantidade de LT (CD3) com $p < 0,01$, LT auxiliares (CD4) $p < 0,03$, nos LTs/c (CD8) e das células NK $p < 0,005$ a média dos valores encontrados foram as seguintes: linfócito T (CD3) de 1.259,3 cels/mm³, CD4 de 766,5 cels/mm³ e CD8 de 428,6 cels/mm³. Houve correlação de (Pearson) significativa e negativa entre

o índice SLEDAI e os LT(CD3) e os LTs/c(CD8) com $r = -0.53$, $r = -0.63$ respectivamente e positiva com os LB(CD19) $r = + 0.56$. Detectamos anticorpos anticardiolipina da classe IgG e IgM em 10 e 20% respectivamente estando todas com SLEDAI maior que 12. As alterações clínicas e imunológicas encontradas nos pacientes com LES apresentam muitas semelhanças ao que é descrito na literatura, porém ressaltamos que algumas diferenças apresentadas podem ser devidas às características de nossa região, e necessitam ser melhor estudadas para se definir as reais implicações destas no sistema imológico dos pacientes com LES.

SUMÁRIO

RESUMO

1	INTRODUÇÃO	09
1.1	FATORES ETIOLÓGICOS	09
1.1.1	Fatores genéticos	09
1.1.2	Fatores virais	10
1.1.3	Fatores ambientais	11
1.1.4	Alterações emocionais e influências hormonais	12
1.2	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E DIAGNÓSTICO	13
1.3	TRATAMENTO	15
1.4	ATIVIDADE DA DOENÇA	15
1.5	PREVALÊNCIA	16
1.6	CONCEITOS FUNDAMENTAIS PARA COMPREENSÃO DO SISTEMA IMUNE	17
1.6.1	Tolerância	17
1.6.2	Auto imunidade	17
1.6.3	O papel das proteínas de choque térmico (HSP)	18
1.7	ALTERAÇÕES IMUNOLÓGICAS NO LES	19
1.7.1	Linfócito B e autoanticorpos	19
1.7.2	Produção de autoanticorpos	20
1.7.2.1	Anti DNA nativo	21
1.7.2.2	Anticorpos antifosfolípide (AAF)	22
1.7.3	Linfócitos T e suas alterações	24
1.7.4	Células “natural killer (NK)”	25
1.7.5	Defeitos do sistema complemento	26
2.	OBJETIVOS	29
3.	MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1	Casuística	30
3.1.1	Pacientes	30
3.1.2	Controles	31
3.2	Coleta de sangue	31
3.3	Exames laboratoriais	31
3.3.1	Hemograma completo	31
3.3.2	Imunofenotipagem de linfócitos	32
3.3.3	Realização de reação imuno enzimática para	33
3.4	MATERIAL UTILIZADO	36
3.4.1	Equipamentos	36
3.4.2	Kits	36
3.4.3	Reagentes	36
3.4.4	Outros	36
3.5	Método estatístico	37

4	RESULTADOS	38
4.1	Avaliação da atividade clínica da doença	38
4.2	Avaliação da atividade da doença segundo parâmetros laboratoriais	39
4.3	Níveis de hematócrito, linfócitos e plaquetas em pacientes portadores de LES e controles normais	40
4.4	Avaliação da imunofenotipagem dos linfócitos T, B, CD4, CD8 e NK células em pacientes com LES e controles normais	41
4.5	Imunofenotipagem e sledai	43
4.6	Presença de anticorpos anticardiolipina	45
4.7	Auto anticorpos antidna x imunofenotipagem	47
5	DISCUSSÃO	49
5.1	Aspectos hematológicos e imunológicos dos pacientes portadores de LES e controles normais	50
5.2	Presença de anticorpos anticardiolipina	53
5.3	Imunofenotipagem e DNA	54
6	CONCLUSÕES	55
	SUMMARY	57
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
	ANEXOS	70

1 INTRODUÇÃO

Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) faz parte do grupo das doenças auto-imunes mediada por imunocomplexos. Caracteriza-se por múltiplas anormalidades no sistema imunológico, merecendo destaque à produção excessiva de auto-anticorpos que, em associação com processos inflamatórios, podem levar à lesão grave de vários órgãos como a pele e os sistemas músculo esquelético, cardiopulmonar e urinário. Apresenta-se com manifestações clínicas as mais variadas a depender do órgão atingido. Sua etiologia ainda é desconhecida, apesar do grande número de pesquisas e informações obtidas através do emprego, na atualidade, de tecnologias avançadas tais como: Reação de Cadeia Polimerásica (PCR), Reação Imunoenzimática (ELISA) e Imunofenotipagem, que estudam, detectam e quantificam genes, moléculas e células. Atualmente sabe-se que sua etiologia não é única, pois depende de condições multifatoriais, tais como: genéticas, ambientais, alimentares, emocionais e virais que participando de sua etiopatogenia, desencadeiam ou exarcebão a doença. (BELMONT, et al, 1994 e WOODS JR., 1993).

1.1 FATORES ETIOLÓGICOS:

1.1.1 *Fatores genéticos*

Algumas evidências sugerem que fatores genéticos são importantíssimos no desenvolvimento do LES. Estudos em familiares de pacientes portadores da

doença, revelaram graus de prevalência diferentes para o LES. Além disso parecem existir diferenças quanto as áreas geográficas estudadas. (WOODS Jr., 1993). Também foram encontradas que deficiências hereditárias do fator C4, estão relacionadas com LES em americanos e europeus caucasianos. (ARNETT JR, 1993).

É citado por WOODS Jr., 1993, que anormalidades imunológicas são encontradas mais freqüentemente em familiares de indivíduos com LES do que em controles, existindo uma forte concordância entre a presença de anticorpos antinucleares (ANA), hipergamaglobulinemia e a expressão da doença entre gêmeos idênticos. Atualmente o Sistema de Antígenos Leucocitários Humanos (ALH), tem sido extensivamente estudado na tentativa de identificar diferenças que possam estar relacionadas a maior ou menor susceptibilidade à doença. Dentre as diversas alterações genéticas ocorridas no LES relacionadas com o sistema de antígenos leucocitários humanos destaca-se uma associação genética fraca com o HLA DR3 e DR2. (WOODS Jr., 1993 e PETRI, 1996).

Existem outras características que interferem com o sistema imunológico e conseqüentemente têm algum tipo de participação no desencadeamento da doença tais como: A da ação imunomoduladora da prolactina e a localização de seus genes que situam-se no braço curto do cromossomo 6, o mesmo que carrega ALH. (OLIVEIRA, 1997).

1.1.2 Fatores virais

A microscopia eletrônica demonstrou que existem nos tecidos lúpicos, de forma não usual, inclusões tubuloreticulares que compartilham uma superfície semelhante a estruturas tubulo reticulares e nucleoproteínas do paramixovírus. A presença destas estruturas são manifestações, não específicas, de dano celular induzido pela ação de elevados níveis de IFN α em pacientes com LES. Estudos sorológicos para anticorpos antivirais no LES revelaram, muitas vezes, títulos elevados de anticorpos dirigidos contra vírus aparentemente não relacionados com

a doença. Nestes estão incluídos os vírus do sarampo, rubéola, parainfluenza, parotidite e Epstein Baar, sugerindo que estes anticorpos podem ter sido produzidos por ativação não específica de linfócitos B.(WOODS Jr., 1993).

Atualmente já se sabe que a IL10 está aumentada nos pacientes com LES e que esta, possui ação de estimulante policlonal para linfócitos B . (LLOURETE, et al, 1994 e HAGIWARA, et al, 1996). Por outro lado já está estabelecido que a IL10 humana exibe seqüência homóloga para um pedaço do genoma do vírus Epstein Baar, que compartilha algumas propriedades funcionais com a IL-10 humana e murina, passando assim a ser designada como viral IL10. (MALERFYT, et al, 1991 e DEL PRETE, et al, 1993).

1.1.3 Fatores ambientais

Alguns fatores do ambiente parecem estar mais diretamente relacionados com exacerbação da doença e dentre estes, podemos ressaltar a irradiação solar e alimentação.

A influência da irradiação solar no Sistema Imunológico tem seu papel evidenciado pelas alterações do DNA, desencadeando a formação de autoanticorpos, levando assim a manifestações inflamatórias típicas do LES. (WOODS Jr.,1993) Também foram encontradas alterações nos nível dos linfócitos T supressores (CD8) e *célula Natural Killer* (NK). (NIVED, et al, 1992 CRUZ & FILHO, 1994).

A dieta também apresenta grande influência, pois foi constatado que em camundongos com LES, submetidos a dietas pobres em gorduras, houve um retardo no aparecimento das alterações imunorregulatórias, formação de imunocomplexos e alterações renais, provavelmente pelo tipo de prostaglandina sintetizada. (WOODS Jr., 1993).

1.1.4 Alterações emocionais e influências hormonais

De acordo com FANTINI, et al, 1995, os estresses psicossociais e as respostas de adaptação podem contribuir para a ocorrência de doenças imunológicas. No estresse, existem variações em neurotransmissores, hormônios e interleucinas, que só agora têm sido mais pesquisados. Também nos últimos anos tem-se estudado melhor o papel imunorregulatório do sistema neuroimunoendócrino na patogênese das doenças de origem inflamatória. (OLIVEIRA, 1997). Essa função imunorregulatória, pode ser exemplificada pela capacidade que a hipófise tem de regular funções imunológicas, secretando o hormônio do crescimento (HC) e prolactina (PLC) ambos com ação imunoestimulante e o hormônio adreno corticotrófico (ACTH) com ação imunossupressora. Por sua vez, o sistema imune pode agir no sistema endócrino pela liberação de mediadores em resposta as reações imunes e inflamatórias, tais como: bradicinina, histamina e fator ativador de plaquetas. Estes possuem especificidade na indução da liberação de prolactina.(BERCZI, 1991).

Dentre os diversos hormônios pesquisados destaca-se a prolactina. A partir de 1978 a sua relação com o sistema imune passou a ser estudada sistematicamente, após ter sido comprovada que a imunodeficiência adquirida por hipofisectomia em ratos era restaurada por este. O mecanismo pelo qual a prolactina age na função imune é pouco conhecido (OLIVEIRA, 1997). Atualmente novas relações entre esse hormônio e o sistema imune vêm sendo descobertas, destacando-se a indução no aumento da produção de imunoglobulinas IgG, IgM, IgA, e anticorpos anti-DNA por células mononucleares de sangue periférico (CMSP) dos pacientes com LES e normais. (GUTIERREZ, et al, 1994). A hiperprolactinemia está associada a presença de anticorpos anti-nucleares (ANA), e também correlacionada com a interleucina -6 (IL-6) no líquido céfalo raquidiano (LCR) de pacientes com LES com comprometimento do Sistema Nervoso Central (SNC). (GUTIERREZ, et al, 1994 e JARA, et al, 1993)

Há presença de receptores nos linfócitos T e B específicos para prolactina. (RUSSEL, et al, 1985), e o fato dos linfócitos secretarem uma

substância semelhante a esta, sugerem que a imunomodulação seja uma função inerente a esse hormônio. (OLIVEIRA, 1997). A proliferação linfocitária sob ação da prolactina depende de dois fatores: níveis circulantes de prolactina da hipófise anterior e da capacidade de células T, uma vez estimuladas, de produzirem uma substância semelhante a prolactina com possíveis propriedades autócrinas (MONTENEGRO, et al, 1994).

As recentes pesquisas sobre a PLC e seu papel imunoregulatório, vem fazendo vários pesquisadores considerar a possibilidade de que este possa ser um hormônio chave na imunoestimulação. (OLIVEIRA, 1997).

As alterações dos hormônios sexuais presentes no LES associam-se mais freqüentemente ao sexo feminino numa freqüência maior de 9 a 13 vezes (em idade reprodutiva) do que ao sexo masculino (TALAL & AHMED, 1993). Exacerbações ocorrem em situações de interferências hormonais como gravidez, uso de contraceptivos orais e pós-parto. (OLIVEIRA, 1997, TALAL & AHMED, 1993).

1.2 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E DIAGNÓSTICO

O LES apresenta um quadro clínico bastante polimorfo na fase ativa da doença, com queixas generalizadas, habitualmente sistêmicas e vagas, tais como: fadiga, emagrecimento, febre e adinamia. Existe comprometimento de vários órgãos ou sistemas, ou ainda, mais raramente, de um único órgão isoladamente, dependendo do local de ocorrência das lesões vasculares, que são, em parte, as responsáveis pela sua patogênese.

As manifestações clínicas do LES assumem maior importância quando levam a comprometimento da qualidade e risco de vida. Dentre os principais

comprometidos, as manifestações clínicas que assumem uma maior importância são:

- cutâneo - “rush” malar, foto-sensibilidade e alopecia;
- músculo-esqueléticas - poliartralgia e poliartrite;
- Cardiopulmonar - derrame pleural, hipertensão pulmonar, pericardite, lesões de valvas cardíacas em associação ou não a anticorpos antifosfolípidos;
- Neurológico - convulsão, cefaléia lúpica e uma síndrome cerebral. Estas manifestações podem estar associadas ou não a presença de anticorpos antifosfolípidos;
- manifestações hematológicas - leucopenia (leucócitos $< 4000\text{mm}^3$), linfopenia (linfócitos $< 1500\text{mm}^3$), e trombocitopenia (plaquetas $< 100.000\text{mm}^3$);
- gastro-intestinais - congestão hepática, hepatite crônica persistente e;
- renais - proteinúria persistente ($> 0.5\text{g}/\text{dia}$ ou $> 3+$), presença de hemácias, cilindros celulares granulados, tubulares ou mistos e ainda, insuficiência renal crônica. (PETRI, 1996).

Atualmente o diagnóstico do LES é feito com base na história clínica do doente e presença de anticorpos nos testes sorológicos. Os critérios clínicos têm como base o preenchimento de 4 dos 11 itens do Colégio Americano de Reumatologia (ACR). (TAN, et al, 1982). Anexo 1.

1.3 TRATAMENTO

O tratamento atual do LES é realizado de acordo com as manifestações clínicas, gravidade e evolução do paciente. As principais drogas utilizadas são: antimaláricos, corticosteroides e imunossupressores como a azatioprina e ciclofosfamida.

O tratamento do LES melhorou em 90% a expectativa de vida após 10 anos do diagnóstico, por outro lado as complicações advindas das drogas utilizadas assumem uma grande importância em relação a qualidade de vida e sobrevivência. (PETRI, 1996).

1.4 ATIVIDADE DA DOENÇA:

O LES é uma doença que traz como marca fundamental a flutuação de sua atividade. Essa atividade foi definida por BOMBARDIER, et al, 1992 como sendo, manifestações reversíveis de um processo inflamatório subjacente, refletindo a severidade de comprometimento do órgão envolvido. O julgamento clínico correto determina o grau da atividade da doença nos pacientes com LES, para fundamentar as decisões terapêuticas. (BOMBARDIER, et al, 1992). Muitos estudos da utilidade e validade dos índices disponíveis têm sido realizados, existindo quatro principais índices: BILAG, SLEDAI, SLAM, LAI. (KALUNIAN, 1993)

BILAG - este índice divide a atividade do LES em oito sistemas orgânicos. Os escores atribuídos a cada sistema orgânico baseiam-se no princípio da intenção do tratamento a ser utilizado. (KALUNIAN, 1993)

SLAM - lista trinta e três manifestações clínicas e laboratoriais que são classificadas como ativas ou inativas. Os graus de estimativa da atividade são baseados na severidade do aumento da incapacidade e da destruição de órgãos. Este índice necessita que se acompanhe o paciente rigorosamente para detectar a necessidade de uma mudança no tratamento. (KALUNIAN, 1993).

LAI - Tem sido muito utilizado quando o paciente possui alterações de função renal e/ou apresenta-se com infecção fatal. É constituído de cinco pontos que são: exame médico, sintomas do paciente, órgãos envolvidos, medicações em uso e alterações laboratoriais. Estas recebem valores numéricos de acordo com o grau de comprometimento dos órgãos ou das alterações laboratoriais e das medicações em uso nas últimas duas semanas que antecederam ao exame. (KALUNIAN, 1993 e PETRI, et al, 1991).

SLEDAI. É composto de vinte e quatro itens que são agrupados em nove sistemas orgânicos. Esse índice é calculado a partir da presença das alterações clínicas e/ou laboratoriais que recebem valores numéricos variáveis a depender do risco de vida advindo da gravidade destas e do comprometimento dos órgãos envolvidos. A soma dos escores varia de 0 a 105, determinando ou não a atividade da doença, ficando a maioria dos pacientes numa média de 35 pontos. As manifestações devem estar presentes até um mês antes da avaliação. (PETRI, et al, 1991 e KALUNIAN, 1993).

No nosso trabalho adotamos como índice da atividade o SLEDAI por ser mais apropriado para as nossas finalidades. É um índice abrangente com um questionário único e de fácil aplicação. (anexo 2).

1.5 PREVALÊNCIA

Sua prevalência segundo dados dos EUA é de 4 a 250 por 100.000 indivíduos. Esta prevalência é muito ampliada pelos vários critérios adotados no seu estudo como região, raça e outros.(SCHUR,1993). Em nosso País, não existem estudos epidemiológicos, o LES incide em todas as raças parecendo ser mais prevalente em negros; afeta as mulheres 4(quatro) vezes mais do que os homens, e embora possa ocorrer em qualquer idade, tem um pico de incidência entre 15 a 45 anos. (SATO, 1995).

1.6 CONCEITOS FUNDAMENTAIS PARA COMPREENSÃO DO SISTEMA IMUNE

O sistema imunológico, mesmo nos seres mais simples, é essencial para a manutenção da constituição do organismo. Mantendo as funções de vigilância e defesa, age desta forma detectando e eliminando, na maioria das vezes, alterações de origem externas (microorganismos) e internas (cânceres). Nessa função, vários mecanismos são ativados, dentre eles o gerar receptores com enorme potencial de diversidade, isto é, moléculas capazes de se ligar aos mais variados antígenos, e assim desencadear doenças auto-imunes. (ADAMS, 1996) Nesse processo vários mecanismos estão envolvidos como descrevemos a seguir:

1.6.1 Tolerância

Foi descrito por MUHLEN & NAKAMURA, (1996) que a tolerância é um estado de não responsividade a antígenos ou seja, de inabilidade em desencadear uma resposta imunológica destrutiva aos estímulos antigênicos. Essa tolerância é adquirida por mecanismos que abortam ou inativam clones auto-reativos durante e depois do desenvolvimento embrionário do Sistema Imune (SI).

1.6.2 Auto/imunidade

A autoimunidade é uma falha do sistema imune que não reconhece como "próprio" algumas das estruturas pertencentes ao organismo. Dessa forma, são gerados anticorpos e/ou células auto-reativas para seus próprios componentes desencadeando assim lesão tecidual. Essa pode ocorrer por uma apresentação anormal de antígenos do "self" que são autoantígenos alterados e/ou antígenos combinados com determinantes antigênicos estranhos; ou apresentação anormal das células apresentadoras de antígenos (APC) com

aumento nas células da expressão do complexo maior de histocompatibilidade classe II (CMHII). Situações como a administração de drogas, infecções virais e bacterianas ou efeitos adjuvantes podem ser desencadeadoras. Além desses outros mecanismos envolvidos na autoimunidade tais como:

- perda do mecanismo de supressão de linfócitos T supressores e/ ou aumento de T auxiliar;
- o mimetismo molecular, que seria o compartilhamento de estruturas similares levando a desencadear as reações auto-imune. O principal exemplo desse mecanismo é a reação cruzada entre os antígenos da bactéria *estreptococo beta-hemolítico* e antígenos presentes na miosina do músculo cardíaco que podem levar a febre reumática;
- alteração da rede de idiotipos e antiidiotipos nos anticorpos e receptores celulares.

1.6.3 O papel das proteínas de choque térmico (HSP)

Atualmente o papel das proteínas de choque térmico é um novo mecanismo, que vem sendo bastante estudado. As HSP, constituem-se de moléculas altamente conservadas que são induzidas rapidamente na exposição celular ao calor e uma grande variedade de outros estímulos estressantes contra um nível de repressão basal da síntese protéica em geral. (DHILLOW, et al, 1994)

No LES está particularmente implicada, a "90kda heat shock protein" (HSP90), que age contribuindo em estabilizar receptores celulares, dentre eles o receptor para corticosteroide. No LES há participação também nas alterações imunológicas através dos mecanismos de mimetismo molecular, resposta a super antígenos e estímulos direto de células efectoras da resposta imune com formação de anticorpos para a HSP90, resultante da sua própria constituição.

(DHILOW, et al, 1994). No LES encontramos também o aumento de HSP90 em subtipos específicos da doença como a síndrome antifosfolípide, doença neuropsiquiátrica e cardiorespiratória. (DHILOW, et al, 1994).

1.7 ALTERAÇÕES IMUNOLÓGICAS NO LES

Praticamente todos os componentes do Sistema Imune no LES têm sido descritos com anormalidades. Múltiplos mecanismos estão envolvidos desde a ativação de células endoteliais, produção excessiva de anticorpos, alterações do sistema complemento e o número e função dos linfócitos, não sendo possível dizer quais as anormalidades que se manifestam primeiro. Destacamos no entanto a produção excessiva de auto-anticorpos e as alterações hematológicas como os valores de hematócrito diminuído e as alterações nos números de linfócitos.

1.7.1 Linfócito B e auto-anticorpos

Os linfócitos B no LES apresentam-se hiperreativos, produzindo uma grande quantidade de anticorpos. Parte destes anticorpos produzidos são diretamente para antígenos nucleares que têm importância fundamental na patogênese do LES. Esta hiperreatividade pode ser demonstrada por experimentos realizados em culturas *in vitro* de células mononucleares do sangue periféricas (CMSP). (LINKER-ISRAELY, et al, 1990). Este experimento mostrou também que apesar do aumento no número de imunoglobulinas, estas são pouco funcionantes, pois frente a um desafio antigênico por mitógenos, estas são marcadamente deficientes na sua habilidade para proliferar. (LINKER-ISRAELY, et al, 1990).

Ainda LINKER-ISRAELY, et al, (1990), citam que o mecanismo responsável pela ativação de células B no LES é pouco entendido, e que duas

possíveis explicações para a alta espontaneidade da atividade de células B tem sido consideradas:

- a. linfócitos B são autônomos e estimulados de uma maneira autocrina;
- b. linfócitos B em atividade no LES são modulados por outras células mononucleares.

Somando-se a isto, tem sido relatada a secreção de fatores humorais para células B no LES, como a IL-10, que é produzida principalmente por monócitos e linfócitos B. A IL-10 possui a função de ativadora policlonal de linfócitos B e de intermediar sua liberação de forma autócrina e parácrina, encontrando-se, portanto com valores aumentados no LES. (LLORENTE, et al, 1995 e HAGIWARA, et al, 1996).

1.7.2 Produção de auto-anticorpos

LES é uma doença que apresenta uma variada formação de anticorpos, principalmente contra auto-antígenos. A determinação da especificidade destes anticorpos é importante pois auxiliam no diagnóstico, tratamento e prognóstico. Vários são os anticorpos produzidos contra antígenos próprios que podem estar localizados no núcleo como os: dsDNA, histona, complexo Dna-histona, Sm, RNP, SCL70, Ro/SS-a, La/SS-B proteínas centroméricas, Ku, antígenos de células em proliferação-PCNA, ou citoplasma : Ro/SS-A, RNP ribossomal, proteína P, Jo-1e, fosfolipídios. Muitos destes auto-anticorpos não são exclusivos do LES podendo ser encontrados em outras doenças como: esclerose sistêmica, síndrome de Sjogrem e doença mista do tecido conjuntivo. (LESSER P.G., 1995 e MÜHLEN & TAN, 1994).

Nos pacientes com LES, clinicamente sem atividade, a detecção de hipergamaglobulinemia e altos níveis de anticorpos para os antígenos U1-RNP, Sm e SSA(Ro) antígenos têm sido encontrados. Nestes pacientes o aumento aparente e a persistência de linfócitos B ativados parece ser dependente de células T. (SPRONG, 1993).

Diante da grande variação de autoanticorpos, nosso interesse voltou-se particularmente para o Anti DNA nativo e anticorpo anticardiolipina.

1.7.2.1 Anti DNA nativo

Existem dois tipos de anticorpos antiDNA, um é diretamente para a dupla fita do DNA (dsDNA) também chamado de DNA nativo, que na imunofluorescência, pode apresentar os padrões nuclear homogêneo ou nuclear periférico. O outro contra o DNA desnaturado (ssDNA), que não é específico para o LES, ocorrendo em outras doenças auto-imunes. Existem várias técnicas para a detecção do anticorpo anti dsDNA, dentre elas destacam-se: as reações imunenzimáticas (ELISA), que possuem uma sensibilidade em torno de 50 a 60% e apresentam riscos de contaminação por anticorpos anti ssDNA. Já quando realizada por imunofluorescência (IF) com *Crithidia Luciliae*, possui uma maior especificidade em torno de 70 a 85%. (HAHN & TSAO, 1993, MÜHLEN & TAN, 1994).

Os anticorpos anti dsDNA, juntamente com o anti Sm são os principais anticorpos que caracterizam o LES, sendo considerados marcadores específicos da doença. O anticorpos anti dsDNA, são detectados na circulação de forma flutuante em 70% dos pacientes com atividade da doença, e são os únicos auto-anticorpos claramente implicados na patogênese do LES com formação de imunocomplexos inflamação local e dano aos órgãos. São particularmente associados a nefrite lúpica em humanos e ratos, pois são detectados depósitos nos glomérulos renais com predominância do isótipo IgG. (LEFKOWITH, et al, 1996, MÜHLEN & TAN, 1994, SPRONG, 1993).

A presença de anticorpos anti DNA, potencialmente patogênicos parece estar relacionada com a participação dos linfócitos, uma vez que estes são induzidos por certos tipos de células T auxiliares, que são detectadas em pacientes com LES ativo por nefrite e não aparecendo em pacientes normais ou em remissão. (DESAI-MEHTA, et al, 1995).

1.7.2.2 Anticorpos antifosfolípide (AAF)

Os anticorpos antifosfolípidos (AAF), têm sua importância pela ocorrência da síndrome antifosfolípide (SAF), que piora o prognóstico do LES. A SAF, descrita por HUGHES em 1985, foi inicialmente associada às doenças mistas do tecido conjuntivo principalmente LES (STAUB L.H., 1995). A sua forma primária é reconhecida desde 1989 e não está associada a nenhuma doença do tecido conjuntivo, embora possa evoluir para LES em um tempo muito longo, não é o que usualmente ocorre. (MUJIC, et al, 1993).

Esta síndrome caracteriza-se por uma diátese trombótica no adulto jovem a qual é diagnosticada pela presença de trombose em artérias e/ou veias, abortamentos recorrentes e trombocitopenia, associada a teste laboratorial positivo para anticorpos antifosfolípidos. (STAUB L.H., 1995).

A SAF associada a LES acomete mais mulheres do que homens, numa relação de 7:1. Apresentando ainda predomínio de HLA-DR2 e DR3. Na SAF primária o Haplótipo DR7 é particularmente mais freqüente. (STAUB, 1995).

Os fosfolípidos se constituem numa família de moléculas não homogêneas. Segundo (KHAMASHTHA, 1995 e STAUB, 1995), existem três técnicas para sua detecção como citamos a seguir:

1. Venereal Disease Research Laboratory - (VDRL) - O

VDRL é um teste usado no diagnóstico de sífilis, podendo apresentar resultado falso positivo para esta doença, nestas situações serve de alerta à presença de anticorpos antifosfolípide. Quando negativo não constitui critério de exclusão para o diagnóstico da SAF, por ser este um teste de baixa sensibilidade.

2. Anticoagulante lúpico (ACL) - O ACL *in vitro* funciona inibindo a coagulação, *In vivo* associa-se a trombose. Seu mecanismo de ação não é totalmente conhecido, mas sabe-se que sua ação é através da interferência com o complexo ativador de protrombina. Os fosfolípidos juntamente com o fator V e o cálcio são necessários na ativação da protrombina. Atualmente não existe um teste de padronização internacional, pois não há consenso nos métodos de avaliação uma vez que estes são realizados através de diversas técnicas para estudo da coagulação. O ACL sofre interferências de baixas doses de corticosteróides. (STAUB, 1995).

3. Anticorpo anticardiolipina (Acl) - Acl é classicamente um fosfolípido de carga negativa, representando fidedignamente toda a família dos fosfolípidos presentes na parte interna da membrana celular. Este, no entanto, necessita da presença do co-fator sérico B2GPI. Para que o Acl possa se ligar aos fosfolípidos da membrana. (STAUB, 1995).

Recentemente foi relatado em MATSUDA, et al, 1994 que a Acl é diretamente contra B2GPI e/ou o complexo CL-Gpi, podendo ocorrer nos pacientes portadores de sífilis a detecção do Acl diretamente contra a cardiolipina sozinha.

O cofator sérico B2GPI é um componente do plasma com propriedades anticoagulantes *in vitro*, que circula livremente ou associado com lipoproteínas do plasma e tem sido demonstrado estar aumentado em hiperlipidemias. Protrombina, proteína C e proteína S tem sido também caracterizadas como cofatores para a ligação de alguns anticorpos antifosfolípidos porém, o B2Gpi permanece como o cofator requerido mais freqüente. O papel do B2GPI como um fator regulador de homeostase ainda não foi confirmado embora seu consumo tenha sido descrito na coagulação intra vascular disseminada. (MAC NALLY, 1995).

A detecção da Acl está internacionalmente padronizada, sendo esta a mais usada para o diagnóstico da síndrome antifosfolípido (SAF). Somente níveis

moderados e altos de Acl (IgG e IgM) são preditivos, pois estes podem estar presentes em doenças infecciosas e malignas. (STAUB, 1995).

1.7.3 Linfócitos T e suas alterações

Os linfócitos T são identificados por suas funções efetoras e pela expressão de antígenos na superfície das membranas celulares, que podem ser identificados e enquadrados nas classes de diferenciação (CD). Estes possuem a função de reconhecer estruturas na superfície de outros tipos celulares como próprias ou estranhas e transmitir sinais de estímulo ou inibição das vias bioquímicas intracelulares. (KAMMER, et al, 1990).

Os linfócitos T maduros são caracterizados pela presença dos marcadores CD3 que aparecem na última etapa de maturação no timo e estão associados ao receptor para linfócito T (TCR) formando o complexo CD3/TCR. (ACUTO & REIUHERZ, 1982).

A função do complexo CD3/TCR é de ligar-se a antígenos polipeptídeos reconhecendo moléculas próprias do complexo maior de histocompatibilidade (CMH) nas células apresentadora de antígenos, e iniciar o sinal de ativação para proliferação celular. (KAMMER, et al, 1990 e ABBAS, 1994).

A glicoproteína CD4 está expressa nas membranas celulares dos linfócitos, caracterizando uma subpopulação de células T chamadas de auxiliares. Sua função é principalmente interagir com as moléculas da classe II do Complexo Maior de Histocompatibilidade (CMH). (TOMER, et al, 1994).

Atualmente as células CD4 apresentam subdivisões, identificadas pela presença dos receptores CD 45 (função supressora/indutora) e CD29 (auxiliar/indução). (GORLA, et al, 1990) e pelos tipos de interleucinas (IL) que

produzem, estas se subdividem em Th1 (IL2 e IFN) e Th2 (IL10 e IL4). (SIELING, et al, 1993 e FIORENTINO, et al, 1989).

A glicoproteína CD8 por sua vez está expressa nas membranas celulares dos linfócitos, caracterizando uma subpopulação de células chamadas de supressoras/citotóxicas. Sua função principal é interagir com as moléculas da classe I do complexo maior de histocompatibilidade. (FIORENTINO, et al, 1989).

No LES os linfócitos T apresentam múltiplas anormalidades que são de vital importância na patogênese da doença.

A alteração mais comum observada nos pacientes em atividade é a linfopenia que é definida como contagem de linfócitos no sangue inferior a 1500 cels/mm³. Atualmente existem muitas explicações, até mesmo conflitantes, pois alguns autores atribuem esse achado ao decréscimo de células CD8 (MORIMOTO, et al, 1980), e outros citam um decréscimo nas células CD4 e/ou uma grande heterogeneidade da razão CD4/CD8 no LES. (GORLA et al 1990). Este mesmo autor também refere que uma baixa percentagem de linfócitos T CD4 tem sido observada em pacientes com LES com doença renal ou trombocitopenia.

As células T apresentam deficiências *in vitro* na produção de IL2 e IFN γ . As disfunções de células T são correlacionadas com a alta atividade da doença. O LES também apresenta defeitos na atividade citolítica associada a CD8 o que não ocorre em outras doenças reumáticas. (ILIOPODUS & TSOKOS, 1996 e BERMAS, 1994).

1.7.4 Células “natural killer (NK)”

As células *natural killer* (NK), são linfócitos particularmente importantes na resistência da defesa natural contra doenças infecciosas e malignas. Atualmente a célula NK é definida como uma célula efetora com citotoxicidade espontânea contra várias células alvos, esta citotoxicidade não é restrita pelo complexo maior de histocompatibilidade (CMH), faltando-lhe no entanto as

características dos linfócitos T citotóxicos, granulócitos, monócitos e macrófagos. (KAY, 1986).

Nos adultos as células NK são encontradas principalmente no sangue periférico e tecidos do baço. Ocorrem outros sítios de localização embora com menor abundância, tais como: timo, linfonodos, medula óssea, trato gastrointestinal e parênquima pulmonar. A atividade humana destas células no homem, pode ser modulada por uma variedade de agentes, sendo os dois estimuladores mais potentes o $IFN\gamma$ e IL2. (KAY, 1986).

No LES as células NK apresentam-se alteradas quanto ao número de células e na sua atividade. Essas alterações parecem estar mais relacionadas com a doença do que com o tratamento, e embora tenham causa desconhecida, existe a presença de células anti NK participando dessas anormalidades. (SIBBIT, et al, 1984 e STRANNEGARD, et al, 1982). Em EWANS, et al, 1983, encontramos a referência de que mulheres com LES tem a média de citotoxicidade desenvolvidas por células NK, significativamente menor que em mulheres normais.

1.7.5 Defeitos do sistema complemento

O complemento nas pacientes com LES encontra-se bastante envolvido, podendo ocorrer desde defeitos congênitos, até consumo de complemento por ativação de imune complexos circulantes ou fixos.

Os receptores para complemento C3b (CR1) na superfície dos eritrócitos, possuem a função de transportar complexos imunes para o sistema retículo endotelial. No LES o número de CR1 está reduzido em muitos pacientes e possivelmente diminui ainda mais durante os períodos de exacerbação da doença, permitindo a permanência de maior número de imuno complexo circulantes livres que desencadeando assim, os processos inflamatórios que ocorrem no LES. (ILIPODUS, et al, 1996).

Os níveis de C3 e C4 no LES são freqüentemente diminuídos, embora sua correlação com a atividade clínica nem sempre ocorra. Esses valores apresentam maior utilidade no acompanhamento de pacientes com nefrite lúpica onde ambos estão diminuídos sendo mais acentuado o decréscimo de C4. (PETRI, 1996)

No LES encontramos também aumento na expressão das moléculas de adesão como a : VCAM-1, ICAM-1 e E-selectin nos pacientes em atividade quando comparadas com controles sadios e pacientes com LES sem atividade. (BELMONT, et al, 1994). Já SPRONG, et al, 1994, encontraram que os níveis solúveis das moléculas de adesão estão aumentadas, principalmente da Svcam-1, que se relaciona com uma maior atividade da doença (aumento do SLEDAI) e decréscimo dos fatores do complemento. Esses achados favorece a hipótese de que o depósito de imuno-complexos, ativa o sistema complemento e células endoteliais, com transmigração de células inflamatórias e eventualmente dano aos órgãos. (SPRONG, et al, 1994).

As informações sobre os aspectos imunológicos do LES, são provenientes, em sua quase totalidade, de países onde clima, hábitos e prevalência de parasitoses diferem da nossa região. Como vimos anteriormente estes aspectos podem influenciar na etiopatogenia do LES. O Ceará, Estado da região Nordeste do Brasil caracteriza-se por uma alta incidência de irradiação solar (UvA e UvB) durante os quase 365 dias do ano, alta prevalência de parasitoses (EWANS, et al, 1996), hábitos alimentares e culturais próprios (SERAINÉ, 1985).

Com o conhecimento de que os fatores do ambiente e culturais influenciam as manifestações do LES seja desencadeando ou ativando a doença nos propusemos neste trabalho, fazermos um estudo imunológico dos pacientes com LES na nossa região.

Dentre as várias alterações que compõem o LES, nos detivemos neste trabalho na avaliação da atividade imunológica quantificando o número de linfócitos CD3, CD4, CD8, CD19 e CD56, dosando anticorpos anti cardiolipina e

anti dsDNA e avaliação e análise de parâmetros hematológicos das pacientes portadores LES.

2 OBJETIVOS:

Os objetivos deste trabalho foram:

- 2.1.** Avaliar as diferentes subpopulações linfocitárias CD3, CD4, CD8, CD19, CD56 em pacientes com LES (em atividade e sem atividade) e pacientes normais no nosso meio.

- 2.2.** Avaliar a existência de correlação entre o índice de atividade SLEDAI (manifestações clínicas/laboratoriais) e os diversos subtipos de linfócitos ou ainda, certos tipos de autoanticorpos anti-DNA e anti-cardiolipina no desenvolvimento e graus de atividade do LES.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Casuísta

3.1.1 Pacientes

Foram estudados 20 pacientes portadoras de LES, diagnosticadas segundo os critérios do Colégio Americano de Reumatologia (ACR). (TAN, et al, 1982). A amostra foi constituída de pacientes do sexo feminino, provenientes do Hospital Universitário Walter Cantídio e Hospital Cesar Cals, procedentes de enfermaria ou ambulatório do Serviço de Reumatologia e só foram incluídas no trabalho após seu consentimento.

A faixa etária variou de 16 a 46 anos (média de 26,9 anos) e o tempo de doença de 1 mês a 11 anos (média de 4,11 anos). Todas as pacientes foram avaliadas (em sua visita rotineira) no ambulatório e ou no hospital após internamento por reativação da doença. Na ocasião era preenchida a ficha protocolo e realizada a coleta de material. (Anexo 2).

As pacientes portadoras de LES foram inicialmente avaliadas de acordo com o índice de atividade SLEDAI. As pacientes que apresentaram SLEDAI igual a 0 (zero) foram consideradas sem atividade clínica e as pacientes com SLEDAI maior ou igual a 1(um), foram consideradas com atividade. Incluímos no trabalho uma paciente que era portadora de síndrome antifosfolípide primária há 11 anos e vinha evoluindo com proteinúria, artrite e passou a apresentar anti dsDNA. Todas

as pacientes encontravam-se sob tratamento com corticosteroide associado ou não a cloroquina e/ou drogas imunossupressoras como a ciclofosfamida ou azatioprina.

3.1.2 Controles:

O grupo controle foi constituído de 20 mulheres, normais com faixa etária de 16 a 48 anos (média de 32.5).

3.2 COLETA DE SANGUE

A coleta de sangue foi realizada por punção venosa em tubos do tipo vacutainer de 3ml com EDTA para realização de imunofenotipagem e hemograma completo e em tubos de 5ml sem anticoagulante para coleta de soro. Estes eram congelados a -20° até realização dos exames sorológicos.

3.3 EXAMES LABORATORIAIS

3.3.1 Hemograma completo

Para o hemograma adotamos a seguinte rotina :

Identificamos os tubos com os nomes das pacientes, em seguida colocamos para a leitura no leitor automático -SKTS da COULTER. Após concluída a leitura realizamos uma revisão microscópica das lâminas, utilizando esfregaço de sangue periférico corado pelo MayGrünvald-Giemsa e analisado por microscopia óptica.

3.3.2 *Imunofenotipagem de linfócitos:*

QUANTIFICAÇÃO DE POPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS

A quantificação das populações de linfócitos foi realizada através da Citometria de fluxo, usando anticorpos monoclonais de camundongos com especificidade para antígenos linfocitários humanos, marcados com Isotiocianato de fluoresceína (FITC) ou ficoeritrina (PE). Estes foram: anti-CD3-FITC, anti-CD19-PE, anti-CD4-FITC, anti-CD8-PE e anti-CD56-PE para identificar os linfócitos T, linfócitos B, linfócitos T-auxiliares, linfócitos T-citotóxicos/supressores e células NK respectivamente.

A citometria de fluxo, como o nome indica, é um método que analisa células que se encontram em suspensão. As células, em um fluxo contínuo, são analisadas uma-a-uma ao se interporem a um feixe de raios laser. Quatro parâmetros principais relacionados a célula (partícula) são obtidos: tamanho, granulosidade, fluorescência verde, emitida pelo FITC e fluorescência vermelha, emitida pela PE. Os dados dos dois primeiros parâmetros são expressos simultaneamente num gráfico de tamanho e granulosidade, através do qual se seleciona a população celular correspondente a dos linfócitos para ser analisada. Esta seleção é definida fazendo-se um mapa eletrônico (bit-map) ao redor da população escolhida. A partir desta seleção, três outros gráficos são gerados, usando os demais parâmetros: fluorescência verde mais fluorescência vermelha, fluorescência verde e contagem percentual de partículas emitindo esta fluorescência e fluorescência vermelha e contagem percentual de partículas emitindo a fluorescência vermelha. Os valores percentuais obtidos são aplicados aos valores absolutos de linfócitos por milímetro cúbico (mm³) ou microlitro para a determinação dos valores absolutos para cada uma das populações estudadas. Essa análise requer os seguintes procedimentos:

- a) Marcar tubos de vidro com a identificação da amostra e respectivos anticorpos monoclonais, incluindo um tubo controle

onde serão colocados anticorpos monoclonais de mesmo isótipo, sem especificidade para antígenos celulares mas conjugados aos marcadores FITC e PE;

- b) Colocar 10 ul do anticorpo monoclonal marcado. No mesmo tubo, colocar 100 ul do sangue colhido com EDTA previamente homogeneizado;
- c) Agitar por cinco segundos e incubar por, pelo menos 15 minutos, para que a reação antígeno-anticorpo ocorra;
- d) Tratar a suspensão celular no sistema automático denominado "Immuno-prep" da Coulter, que prepara a amostra, através de um processo seqüencial de três etapas, onde os eritrócitos são lisados, a reação é estabilizada e a amostra conservada para análise no citômetro de fluxo;
- e) Analisar a amostra no citometro de fluxo.
- f) Gravar a informação;
- g) Emitir um relatório com os gráficos e resultados.

3.3.3 Realização de reação imunoenzimática para:

1. DOSAGEM DE ANTICORPOS ANTI-DNA:

Para a dosagem de anticorpos anti DNA foi utilizado o kit hemagen *R anti DNA nativo. Procedeu-se como se segue:

- a) A Diluição dos soros e controle para 1:26 por adição de 10ul a 250ul de diluente da amostra;
- b) Adição de 100 ul nos poços em duplicada e identificada; Incubação por 45 minutos a temperatura ambiente após o que foi desprezada a amostra e lavada 4x com a solução propria de lavagem;

- c) Adição de 100ul de conjugado, marcados HRP as microcavidades e incubação por 30 minutos a temperatura ambiente;
- d) Após a segunda incubação foram repetidos os passos do item "g";
- e) Adição de 100 ul do substrato TMB a cada cavidade;
- f) Incubação do por 10 minutos a temperatura ambiente;
- g) Adição 50ul de H₂SO 1N a cada cavidade, parar a reação;
- h) Agitação da a placa levemente para a leitura com utilização do filtro de 450nm e realização das análises para os índices de formação da curva;

2. DOSAGEM DE ANTICORPOS ANTI-CARDIOLIPINA IgM

E

IgG:

Para essa etapa foi utilizado o kit da Hemagen *R anticardiolipina e procedeu-se da seguinte maneira:

- a) O soro foi diluído 1:51 e adicionado 100ul a placa de forma duplicada e identificada para os calibradores de IgG e IgM;
- b) Em seguida as placas foram incubadas por 30 minutos;
- c) A amostra foi desprezada e lavada 4x com a solução própria de lavagem;
- d) Foram adicionados 100ul de conjugado anti IgG e anti IgM marcado com enzimas as microcavidades da placa e incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente;
- e) Após a incubação a amostra foi desprezada e realizada a lavagem por 4 vezes;
- f) Em seguida foram adicionados 100 ul do substrato (TMB) a cada cavidade e novamente incubado por 10 minutos em temperatura ambiente;

- g) Após a incubação foram adicionados 50ul de H₂SO₄ 1M a cada cavidade, a fim de parar a reação;
- h) A leitura foi feita com filtro de 450nm, após o que realizou-se a análise para os índices de GPL e MPL de acordo com os valores da amostra padrão com 32 e 36 unidades respectivamente;

3.4 MATERIAL UTILIZADO

3.4.1 Equipamentos

Centrífuga

Freezer - 20 °

imunocitometro da coulter

Leitor óptico para ELISA - Micro Reader 3 Hyperion

3.4.2 Kits

Kit Hemagen anticardiolipina - Cat. N°6606

Kit hemagem anti ds DNA - Cat. N° 6621

3.4.3 Reagentes

marcadores Couter:

Isotipos - MslgG2b - RD1 e MSIgG2a- FITC (cat. N°6604240).

■ Mslg1-RD1/Ms1IgG1 - FITC (cat.N°6603796).

Cyto-stat/ Coulter clone:

T4RD1/T8FITC (Cat N°6603802)

CD3(IgG1)FITC/B4RD1 (Cat N°6605015)

NKH.1 RD1 (Cat. N°6603857).

3.4.4 Outros

micro pipetas 10,100,1000ul.

Tubos de vacutaineres de 3 e 5 ml sem EDTA e com EDTA respectivamente.

3.5 Método estatístico

Utilizamos o programa EPI INFO 6.04 para a análise dos resultados realizando o teste de Student para comparação das médias e o coeficiente de Pearson para avaliação das correlações.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação da atividade clínica da doença

A avaliação da atividade clínica no LES, foi realizada através da utilização do índice de atividade SLEDAI, que apresentou variação de 0 a 35 e média de 12.0 (s=9.7) O tempo de doença dos pacientes foi de 30 dias a 11 anos, com média de 4.1 anos. Dos 20 pacientes avaliados apenas 2 pacientes encontravam-se sem atividade (SLEDAI igual a zero) e 18 pacientes com atividade (SLEDAI igual ou maior que um). As manifestações clínicas dos pacientes em atividade foram em ordem decrescente de freqüência: lesões de pele, mucosa ou alopecia em 8 (40%), artrite em 06 (30%), vasculite em 5(25%), serosite em 4(20%) e alterações do Sistema Nervoso Central(SNC) 4 (20%). (Tabela 1 e anexo 3).

**TABELA 01-PRINCIPAIS ALTERAÇÕES CLÍNICAS PRESENTES NOS
PACIENTES COM L.E.S. (n = 20).**

ALT. CLÍNICAS	N	%
LESÕES P.M.A*.	8	40
ARTRITE	6	30
VASCULITE	5	25
SEROSITE	4	20
SNC **	4	20

(*) PELE, MUCOSA E ALOPÉCIA

(**) SNC- SISTEMA NERVOSO CENTRAL.

4.2 Avaliação da atividade da doença segundo parâmetros laboratoriais

Na avaliação da atividade da doença coletamos do prontuário as dosagens de complemento e sumário de urina os quais são rotineiramente solicitados dos pacientes com LES. As principais alterações laboratoriais dos pacientes em atividades encontram-se listadas em ordem decrescente de frequência; redução dos componentes do sistema do complemento em 13 (68%), proteinúria em 6 (30%), alterações hematológicas 02 (10%) e hematúria 03 (15%). (tabela 2 e anexo 4).

TABELA 02-PRINCIPAIS ALTERAÇÕES LABORATORIAIS PRESENTES NOS PACIENTES COM L.E.S. (n = 20).

ALTERAÇÕES LABORATORIAIS	Nº	%
HEMATOLÓGICAS*	2	10
COMPLEMENTO**	13	68
PROTEINÚRIA	6	30
HEMATÚRIA	3	15

(*) LEUCÓCITOS < 4000 cel./mm³ E TROMBOCITOPENIA.

(**) UM PACIENTE NÃO REALIZOU A DOSAGEM DE COMPLEMENTO

4.3 Avaliação dos níveis de hematócrito, linfócitos e plaquetas entre pacientes portadores de LES e controles normais

A avaliação do hemograma, realizada nos pacientes com LES e controles normais, tem seu resultado mostrado na tabela 3. Merece destaque os resultados apresentados nos valores do hematócrito sendo este inferior nos pacientes portadores de LES e com significado estatístico ($p < 0.05$). Na contagem dos linfócitos estes apresentaram-se também menores concentrações e significante ($p < 0.05$).

TABELA 03 - PRINCIPAIS VALORES DO HEMOGRAMA EM 20 PACIENTES COM LES E 20 PACIENTES CONTROLES NORMAIS

HEMOGRAMA	PAC.COM LES			PAC. NORMAIS		
	A	X	s	A	X	s
HEMATÓCRITO *	17.8 -42.9	33.1	6.2	32.8- 45.9	38.4	3.7
LEUCOCITOS	3.6-18.2	8.00	3.9	3.6 -18.9	8.1	3.7
LINFÓCITOS *	0.5-5.89	1.68	1.25	0.90-4.40	2.67	3.0
PLAQUETAS	100-498	263	109.2	173-399	230.5	57.3

(*) DIFERENÇA ESTATIST. SIGNIFICANTE AO NÍVEL DE 5% (TESTE T)

4.4 Avaliação da imunofenotipagem dos linfócitos T, B, CD4 e NK células em pacientes com LES e controles normais.

A quantificação dos tipos celulares foi expressa em números absolutos (células/mm³) e números relativos(%). Na quantificação das subpopulações linfocitárias encontramos o número de células com expressão CD3 (LT) diminuídas com $p < 0.05$ nos valores absolutos dos pacientes com LES, quando comparadas aos controles sadios. Foi observada também uma diminuição na quantidade de linfócitos com expressão de CD4 (LTh) e CD8 (LTs) com $p < 0.005$ em números absolutos quando comparados com o grupo de pacientes normais, tal não ocorrendo porém, para números relativos.

A quantidade de linfócitos com expressão de CD19 (LB) quando comparadas com o grupo de controle normais foi maior nas pacientes com LES em termos percentuais e menor em termos absolutos, porém, sem significância estatística. As células com expressão CD56 (NK), mostraram-se em maior

quantidade nas pacientes com LES tanto em números percentuais como absolutos porém sem significado estatístico. Uma paciente apresentou números de células NK bastante aumentado (NK=51%) diferindo bastante das outras, que levou a sua exclusão da análise para NK. Ao excluirmos essa paciente (N=19), as células NK apresentaram-se menor em números absolutos com $p < 0.005$ no grupo das pacientes com LES quando comparada ao grupo controle (Tabela 4 e 5).

TABELA 04 - DISTRIBUIÇÃO DAS SUBPOPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS EM PACIENTES COM L.E.S. E CONTROLES (%)

IMUNOFENOTIPAGEM	PAC. NORMAIS	PAC. COM L.E.S.
LINFÓCITOS T (CD3)	75,6	75,2
LINFÓCITOS B (CD19)	12,6	14,1
LT AUXILIARES (CD4)	46,3	42,5
LT SUP./CITOT (CD8)	26,1	29,1
CÉLULAS NK * (CD56)	6,1	5,9

NAO APRESENTOU DIFERENÇA ESTATIST.SIGNIFICANTE EM NÍVEL DE 5%.

N=20.,

(*) N=19

TABELA 05 - DISTRIBUIÇÃO DAS SUBPOPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS EM PACIENTES COM L.E.S. E CONTROLES (cel/mm³)

IMUNOFENOTIPAGEM	PAC. NORMAIS	PAC. COM L.E.S.
LINFÓCITOS T (CD3)*	2.033,7	1.259,3
LINFÓCITOS B (CD19)	346,0	282,2
LT AUXILIARES (CD4)*	1.227,4	766,5
LT SUP./CITOT (CD8)*	713,3	428,6
CÉLULAS NK (CD56)	154,6	63,9

(*) DIFERENÇA ESTATÍSTICA SIGNIFICANTE EM NÍVEL DE 5%.

4.5 Imunofenotipagem e sledai

Ao correlacionarmos a quantidade de linfócitos das subpopulações estudadas com graus da atividade da doença usando-se o índice SLEDAI, não encontramos nenhuma diferença significativa quando comparados os números absolutos.

Ao procedermos a correlação do SLEDAI com as subpopulações de linfócitos na forma de números relativos, esta foi negativa e significativa para os linfócitos CD3 ($r = -0,53$), positiva e significativa para linfócitos CD19 ($r = +0,56$) e negativa e significativa para linfócitos CD8 ($r = -0,63$). (Tabela 6, 7 e 8).

TABELA 06 - DISTRIBUIÇÃO DOS LINFÓCITOS, SEGUNDO NÍVEL DO SLEDAI, NOS PACIENTES COM L.E.S. (%)

SLEDAI	LT	LB	CD4	CD8
0	78,8	7,5	33,0	40,4
1-4	78,8	10,3	43,6	30,5
5-12	76,0	13,9	42,0	30,8
> 12	71,8	17,9	44,6	24,4
MÉDIA	75,2	14,1	42,5	29,1
DO TOTAL				

* SEM SIGNIFICADO ESTATÍSTICO

**MÉDIA(%)

TABELA 07 - DISTRIBUIÇÃO DOS LINFÓCITOS, SEGUNDO NÍVEL DO SLEDAI, NOS PACIENTES COM L.E.S. (cel/mm³)

SLEDAI	LT	LB	CD4	CD8
0	924,2	99,20	385,0	475,4
1-4	1.394,5	176,5	776,4	538,8
5-12	1.318,8	426,0	819,9	419,2
> 12	1.230,9	273,1	816,9	368,8
TOTAL	1.259,3	282,2	766,5	428,6

sem significância

TABELA 08 - CORRELAÇÕES DE PEARSON ENTRE O SLEDAI E AS PERCENTAGENS DE LINFÓCITOS T, B, CD4 E CD8 PARA A AMOSTRA DE PACIENTES COM L.E.S.

CORRELAÇÃO	LT(CD3)	LB(CD19)	LTh(CD4)	LTs(CD8)
SLEDAI	-0,53*	0,56*	-0,16	-0,63*

(*) CORRELAÇÃO ESTATISTICAMENTE SIGNIFICANTE EM NÍVEL DE 5%.
(TESTE DE SIGNIFICÂNCIA PARA CORRELAÇÃO DE PEARSON)

4.6 Presença de anticorpos anticardiolipina

Os autoanticorpos anticardiolipina foram quantificados por ensaio imunoenzimático (HEMAGEN) onde os valores de referência normal vão até 10 unidades de MPL ou GPL para os anticorpos de isotipos IgM ou IgG respectivamente.

Nas pacientes estudadas apenas 10% apresentaram taxas maiores do que o normal para estes anticorpos do isotipo IgG e 20% para IgM. Nas pacientes que apresentaram autoanticorpo anticardiolipina IgG e ou IgM (n=4), a análise da quantificação das subpopulações linfocitárias, não foi estatisticamente significativa. (Tabela 9 e 10).

TABELA 09 - DISTRIBUIÇÃO DAS SUBPOPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS DAS PACIENTES COM LES E ANTICORPOS ANTICARDIOLIPINA DE CLASSE IgM OU IgG. (n = 4).

PACIENTE	CAR M	CAR G	L T%	L B%	CD4%	CD8%
P1	POS	POS	19,9	58,5	15,0	4,0
P2	POS	NEG	64,8	34,5	45,6	14,4
P3	POS	NEG	98,1	1,5	74,5	21,9
P4	POS	POS	87,4	3,6	48,5	25,1
MÉDIA ESPECÍFICA			67,55	24,5	45,9	16,4
MÉDIA DOS CASOS			75,2	14,1	42,5	29,1
DESPAD DOS CASOS			15,4	13,7	12,1	9,1

TABELA 10 - DISTRIBUIÇÃO DAS SUBPOPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS DAS PACIENTES COM LES E ANTICORPOS ANTICARDIOLIPINA DE CLASSE IgM OU IgG. (n = 4).

PACIENTE	CAR M	CAR G	L T (cel/mm ³)	L B	CD4	CD8
P1	POS	POS	312,4	918,5	235,5	62,8
P2	POS	NEG	3.816,7	2.032,1	2.685,8	848,2
P3	POS	NEG	3.786,7	57,9	2.875,7	845,3
P4	POS	POS	1.276,0	52,6	708,1	366,5
MÉDIA ESPECÍFICA*			2.298,0	765,3	1626,3	530,7
MÉDIA DOS CASOS**			1.259,3	282,2	766,5	428,6
DESPAD DOS CASOS			971,9	466,0	741,1	211,8

* MEDIA ESPECÍFICA (N=4)

** MÉDIA DOS CASOS (N=20)

4.7 Autoanticorpos anti DNA x imunofenotipagem

Autoanticorpos anti DNA nativo foram quantificados por ensaio imunoenzimático (HEMAGEN). Nas pacientes estudadas esses anticorpos estavam presentes em 65% e ausentes em 35%. Estes anticorpos foram usados na avaliação do índice SLEDAI como critério de atividade. Ao realizarmos a correlação entre os valores dos anticorpos anti DNA nativo, com os valores dos principais subtipos linfocitários não encontramos significado estatístico. Tabela 11 e 12.

TABELA 11 - DISTRIBUIÇÃO DAS SUBPOPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS SEGUNDO A PRESENÇA DE ANTICORPOS ANTI dsDNA EM PACIENTES COM L.E.S.

dsDNA	LT	LB	CD4	CD8
NEGATIVO	75,6	12,7	38,8	32,7
POSITIVO	74,9	14,9	44,5	27,2
TOTAL	75,2	14,1	42,5	29,1
MÉDIA (%)				

**TABELA 12 - DISTRIBUIÇÃO DAS SUBPOPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS
SEGUNDO A PRESENÇA DE ANTICORPOS ANTI dsDNA EM PACIENTES COM
L.E.S.**

dsDNA	LT	LB	CD4	CD8
NEGATIVO	1.116,3	192,2	589,3	466,4
POSITIVO	1.336,4	330,7	861,9	408,2
TOTAL	1.259,3	282,2	766,5	428,6
MÉDIA (cel / mm ³)				

5 DISCUSSÃO

As principais manifestações clínicas e laboratoriais apresentadas pelos pacientes com LES foram a redução da concentração dos componentes do complemento, avaliada pela determinação do C3 e/ouC4, ocorrendo em 68% das pacientes, lesões de pele, mucosas e alopecia em 40% , artrite em 30%, proteinúria em 30%, vasculite em 25%,serosite em 20%, e alterações do sistema nervoso central (SNC) em 20%, hematúria 15% e alterações hematológicas em 10%.

Nos dados referidos por PETRI, et al, 1991 no qual estes avaliam o SLEDAI como critério de atividade de pacientes lúpicos, os resultados obtidos foram os seguintes; redução da atividade do complemento em 54%, reações cutâneas em 12%, artrite em 37%, alterações renais 30.6%, vasculite em 9.2% serosite 10.2%, alterações neurológicas em 16.3% e hematológicas em 27.6%.

As diferenças apresentadas entre nossos dados, na frequência das alterações de consumo de complemento, artrite, alterações renais e serosite assemelham-se as encontradas por PETRI, et al, 1991.

Dois aspectos podem justificar as discordâncias entre os dois grupos de indivíduos com LES quanto as lesões cutâneas:

1- Nesta avaliação colocamos todas as lesões de pele e não somente as restritas ao SLEDAI.

2- A maior incidência solar poderia influir para maior número de lesões. No que se refere ao grupos das pacientes que apresentam vasculites não computamos apenas as de pele nele computamos também as biópsias renais. No

entanto, no trabalho apresentado por WALLACE, 1993, as lesões de pele, mucosas e alopecia apareceram em 55% apresentando uma maior concordância em relação ao encontrada no nosso estudo.

5.1 Aspectos hematológicos e imunológicos dos pacientes portadores de LES e controles normais

No nosso trabalho encontramos diferenças significativas entre o hematócrito das pacientes com LES (33.1%) e normais (38.4%) com $p < 0.05$. Na literatura é mostrado que 50% dos pacientes apresentam hematócrito diminuído, fato este relacionado a autoimunidade, a anemia das doenças crônicas e doenças renais, já em relação a leucopenia (leucócitos < 4000) foi encontrada em apenas em 5% das pacientes e sem significado estatístico ($p > 0,05$). Na literatura leucopenia está presente em 17% dos pacientes, e tem sua causa atribuída a diversos mecanismos tais como: autoimunidade, medicação, e/ou defeitos da medula óssea. (SCHUR.,1993). Questionamos se o fato destes pacientes viverem numa região com alta prevalência de doenças infecciosas e parasitárias as interações parasitas hospedeiros não serviriam de estímulo contínuo a medula óssea na produção destas células e liberação para a corrente sanguínea. Considerando que estes indivíduos são submetidos aos mesmos esquemas terapêuticos descrito na literatura internacional.

Com relação ao número de plaquetas a literatura mostra que 25 a 50 % dos pacientes com LES apresentam plaquetopenia (100.000 a 150.000). (SCHUR,1993). A grande maioria das nossas pacientes (95%) com LES não apresentaram deficiência no número de plaquetas, ao contrário, um aumento neste número foi observado, embora sem significância. Atualmente sabe-se que o fator ativador de plaquetas (PAF) pode agir no Sistema Endócrino induzindo a liberação de Prolactina, esta por sua vez tem ação imunoestimulante sobre os linfócitos (MONTENEGRO et al 1994). É citado por FANTINI, et al, 1995 que os estresses promovem uma variedade de mudanças psiconeuroendócrinas. Como exemplo

temos o aumento de prolactina. Questionamos se os estresses que nossos pacientes sofrem teriam a função de estimular a hipófise a liberar mais prolactina e se esta teria uma função retro alimentadora em nível da liberação do Fator Ativador de Plaquetas (PAF), ou ainda através de fatores previamente citados como a prevalência de doenças infecto-parasitárias que poderiam estimular a medula óssea à maior formação de plaquetas.

Linfopenia é uma das características marcantes nos pacientes com LES em atividade (SCHUR.,1993). No nosso trabalho esta não ocorreu na grande maioria das pacientes, pois o número de linfócitos em média destes foram de $1680 \text{ células/mm}^3$ sendo este menor e com $p < 0.05$. Os autores KAMMER & STEIN, 1993 atribuem como algumas das causas para esta linfopenia a presença de anticorpos antilinfócitos T e a redistribuição destes linfócitos em sítios de inflamação saindo dos vasos.

Os linfócitos LB (CD19) apresentaram-se discretamente menor em números absolutos, quando comparados a população normal, porém sem significado. Este fato não descaracteriza o LES da forma tradicional, pois os linfócitos B ativados principalmente os CD5 não foram quantificados, assim como, o uso de corticoterapia que pode interferir com os linfócitos, principalmente com os linfócitos CD5. (COWDERY, et al, 1992, ERKELLER, et al, 1993). Quando correlacionados com a atividade da doença pelo SLEDAI os linfócitos CD19 mostraram correlação de $r + 0.56$ em números percentuais, estando de acordo com a literatura, que mostra que o número de linfócitos B está aumentado e provavelmente hipereativos no LES. A hipereatividade pode estar presente mesmo nos pacientes com LES sem atividade como é mostrado no trabalho de TSOKOS, 1992. Também encontramos na literatura trabalhos que mostram não existir correlação entre o aumento de células B e o aumento de anticorpos anti DNA, (SPRONG, et al, 1993) e sim correlação do aumento de anticorpos anti DNA com o número e tipo de linfócitos CD4 (DESAI METHA, et al, 1992). Ambas correlações não foram por nós encontradas.

A quantificação dos subtipos linfocitários LT (CD3), mostrou os valores em números absolutos menores do que a população normal, com $p < 0.05$. Trabalhos como o de BERMAS, et al, 1994, descrevem que o decréscimo no

numero de células T estaria relacionado com a gravidade da doença não estando associado somente ao uso das medicações e sim a defeitos funcionais do sistema imune no LES. A correlação entre os valores obtidos de LT (CD3) com o SLEDAI mostrou: uma correlação negativa $r = -0.53$ em números relativos, havendo neste caso uma concordância dos nossos achados com os dados descritos na literatura.

Embora no LES as múltiplas alterações que ocorrem envolvam atualmente os fatores sorológicos, as alterações celulares assumem grande importância na patogênese do LES pois os defeitos no seus caminhos bioquímicos, esta relacionado com seus subtipos como relata GORLA, et al, 1990 e NEIDHART, et al, 1996. Estes atribuem as alterações aos linfócitos CD4, principalmente ao subtipo CD4 CD45 que estariam em menor quantidade e possuiriam o papel de supressor/indutor. Já para KAMMER & STEIN, 1990 os subtipos CD4 CD45 teriam a função ativar a molécula CD8 e IL 2 para promover sua proliferação.

Sabemos que as irradiações solar UVA e UVB interferem com os linfócitos LTs (CD8) aumentando o seu número na circulação sanguínea. (SCHUR,1993). Se levamos em conta a atividade supressora este fator poderia ter um papel de redução na gravidade da doença, no entanto, supomos que contraditoriamente a luz solar como elemento desencadeante de atividade lúpica quando relacionado com a expressão de células CD8, provavelmente não se relaciona a atividade supressora, mas talvez a atividade citotóxica. Ou talvez como descreve ISRAELY-LINKER 1990, que embora não tão estudado quanto o CD4 o CD8 poderia ter uma participação no estímulo de células B, podendo desta forma os linfócitos CD8 também contribuir para a hipereatividade dos linfócitos B.

As células Natural Killer (CD56) apresentaram-se em maior número por milímetro cúbico no sangue periférico das pacientes com LES, sem diferenças significantes as dos controles normais, tanto para números relativos como absolutos quando $N=20$. Ao excluirmos uma paciente que apresentou grande número de células NK (NK=51% dos linfócitos), essas apresentaram-se em menor quantidade em números percentuais e absolutos porém com diferença significativa apenas nos números absolutos. Estes dados comparados aos de

outros trabalhos como o de ERKELLER, et al, 1996 que descreve uma redução de células NK dos pacientes com LES, da ordem de um terço em relação ao controles normais, mostram-se concordantes.

Neste trabalho também encontramos correlação negativa e significativa entre linfócitos LTs (CD8) e SLEDAI, descrita também em alguns trabalhos como em MORIMOYTO, et al, 1980. Como vimos anteriormente é muito conflitante a quantificação dos subtipos linfocitários, porém os dados que obtivemos relativos a quantificação dos subtipos linfocitários e as alterações clínicas são em sua grande maioria concordantes aqueles descritos na literatura mundial.

5.2 Presença de anticorpos anticardiolipina

AXTENS e colaboradores (1994) encontraram anticorpos anticardiolipina em 24% dos pacientes lúpicas estudadas e citam que na literatura este valor é de 40%. Já no grupo de pacientes por nós estudado a prevalência destes anticorpos foi de 20% e 10% respectivamente para os isotipos IgM e IgG.

Neste trabalho destacamos duas pacientes portadores de anticorpo anticardiolipina, pois estas ilustram bem as manifestações da SAF primária e secundária:

1. Paciente com diagnóstico de Lupus recente (30 dias), encontrava-se em estado gravíssimo com pericardite, síndrome cerebral orgânica, com anticorpo anticardiolipina positivo, com números de linfócitos LTh (CD4) e LTs (CD8) baixíssimos e linfócitos B bastante aumentado. Esta paciente tinha realizado, dado a sua gravidade, pulso com "solumedrol" há 10 dias o que certamente contribui com as alterações observadas relacionadas ao número de linfócitos.

2. Paciente com diagnóstico de síndrome antifosfolípide primária há 11 anos, durante sua evolução teve abortamentos de repetição e crises convulsivas, o que, freqüentemente, ocorre nesses pacientes. Recentemente passou a apresentar proteinúria, artralgia e anticorpos anti dsDNA entrando para esquema de ciclofosfamida, além do anticoagulante oral que fazia uso.

A evolução das pacientes com SAF primária para LES, não é usual podendo ocorrer em uma percentagem pequena, que após longos anos evoluem para LES como ocorreu com a segunda paciente. (MUJIC, et al, 1995).

A presença de anticorpos antifosfolípidos (onde se incluem os anticorpos anti cardiolipina) em pacientes com LES, contribui para o descréscimo da sobrevida dos mesmos (DRENKARD, 1994). As pacientes portadoras de anticorpos anti cardiolipina costumam ter maior gravidade na doença, apresentando maior freqüência de manifestações trombóticas, neurológicas, abortamentos e cardíacas. (HOJNIK, et al, 1996) Por ser uma pequena amostra (n=4) e com tempo de patologias variados, não nos foi possível termos um valor estatisticamente significativo nas análises destes anticorpos relacionados com os subtipos linfocitários nos grupos estudados.

5.3 Imunofenotipagem e DNA

A detecção de anticorpos anti dsDNA não apresentou uma correlação significativa com os valores encontrados para os diversos tipos de linfócitos estudados. A dosagem de anticorpos anti DNA nativo foi realizada também como critério de atividade do SLEDAI. (BOMBARDIER, et al, 1992). Atualmente atribui-se as células LTh (CD4) significativo papel no estímulo a produção de anticorpos anti-DNA. (DESAI- MEHTA, et al, 1992), Os anticorpos anti DNA nativo têm também importante papel na patogênese das doenças renais.

6 CONCLUSÕES

1. As manifestações clínicas apresentadas pelas pacientes portadoras de LES não diferiram da literatura quanto as formas de manifestações, porém, apresentaram diferenças na frequência principalmente nas lesões de pele .
2. As pacientes portadoras de anticorpos anticardiolipina apresentaram maior gravidade nas manifestações clínicas.
3. A realização da imunofenotipagem dos subtipos linfocitários mostrou valores menores para os subtipos LT (CD3), LTh (CD4) e LTs (CD8) em valores absolutos com $p < 0.05$ quando $n=20$ e NK quando $n=19$ ao serem comparadas ao grupo controle.
4. Quando correlacionado com o índice de atividade SLEDAI a quantificação dos subtipos linfocitários mostrou uma correlação de $r= 0.56$ para linfócito B (CD19) e $r= -0.53$ e $r= - 0.63$ para linfócitos (CD3) e (CD8) em números percentuais respectivamente.
5. O Hematócrito das pacientes apresentaram-se menor e significativamente diminuído quando comparado com os normais.

6. As pacientes lúpicas apresentaram números de linfócitos de 1680 cels/mm^3 sendo estes menores do que os do grupo de indivíduos normais com $p < 0.05$. Embora estivessem diminuídos não apresentavam linfopenia .

7. Faz-se necessário estudo com outros marcadores CD4 específicos do tipo CD45 e CD29 e dosagens de interleucinas, para um entendimento mais profundo do LES.

Summary

LES is a disease that attacks several human organs and systems. The etiology is unknown, but many factors like genetic, immunological, environmental, viral and emotional factors are involved with its physiopathology. The prevalence of LES in several areas of the planet is too variable (4 to 250/100.000 inhabitants). In Brazil, its prevalence is unknown. LES fits in the self-immune disease group, presenting many immunological changes. The most frequent mentioned changes in world bibliography are excessive production of self-antibodies and modifications in T lymphocyte. The immunological system and its alterations, including the immunological answer, are genetically determined and are influenced by the relationship between individual and environment. Our region has sociocultural and climatic characters that can influence the immunological system, resulting the changes that are found in the patients with LES.

This work has, as purpose, to compare some immunological changes that are found in LES patients in our area with described changes in world bibliography and to look for possible relations between them. The LES patients (n=20) were derived from HUWC and HGCC. The n=20 control group consisted of normal individuals that were divided by age and sex, are all living in Fortaleza. The anamnesis and immunological, hematology and clinical exams were used to obtain information to the criterions of inclusion or exclusion of individuals in the work and to classify the patients in SLEDAI activity index (seriousness of the disease). The parameters to the immunological estimate were obtained through the phenotypic analysis of subsets of the T lymphocyte (CD3), LTh (CD4), LTs/c (CD8), B lymphocyte (CD19) and NK cells (CD56) by flow cytometric, revealment of antiphospholipid and antiactive DNA self-antibodies by ELISA methods and hematology exams. The results showed that the period of the pathology varied from 30 days to 11 years with $x=4,1$ years.

The SLEDAI index varied from 0 to 35 with a media of 11,8 and s=9,8. The main presented clinical manifestations were alterations of skin, mucous membrane and alopecia in 08(40%), arthritis in 06(30%), vasculite in 05(25%), serosite in 04(20%) and Central Nervous System(CNS) alterations in 04(20%). The principal lab alterations were reduction of the compounds of the complement(C3 and/or C4) in 13(68%), proteinúria in 06(30%), hematúria in 06(15%). The alterations in the blood count were reduction of the hematócrito with $x=33,1\%$ and of the total lymphocytes with $x=1.680$ cells/mm³, both with $p<0,005$ when compared with the control group. The phenotypy analysis subset of lymphocytos of LES patients, in comparison with the control group, in absolute values, showed reduction of the amount of TL(CD3) with $p<0,01$, auxiliar TL(CD4) $p<0,003$, s/c TL (CD8) and of the NK cells $p<0,005$. The media of the found values were the above values: T lymphocyte(CD3) of 1.259,3 cells/mm³, CD4 of 766,5 cells/mm³ and CD8 of 428,6 cells/mm³. There was a negative and expressive correlation of Pearson between the SLEDAI index and the TL(CD3) and the s/c TL(CD8) with $r= -0,53$, $r= -0,63$ respectively and positive correlation with the BL(CD19) $r= +0,53$. We noticed anticaardiolipin antibodies of IgM and IgG classes in 10% and 20% respectively, all with SLEDAI higher than 12. The clinical and immunological alterations that were found in LES patients present many similarities to what is described in bibliography, but we stick out that some presented differences may exist due to the characters of our region, and need to be studied in a better way in order to define their real implications in immunological system of LES patients.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K., LICHTMAN, A. H. , POBER J. S. *Celular and molecular immunology*. 2. ed Philadelphy: W.B Saunders, c 1994. Cap. 7. Molecular basis of T cell antigen recognition and ativation, p.136-165

ACUTO, O., REINHHERZ, E.L. The human T cell receptor structure and function. *N. Engl.J. Med.*, v.312, p.1100-1111, 1985.

ADAMS, D. How the immune system works and why it causes autoimmune disease. *Imunol. Today*, v.17, p.300-302, 1996.

AHMED, A .S., TALAL N. Importance of sex hormones in systtemic lupus erythematosus In: Wallace, D.J., HAHN, B.H. *Dubois lupus erythematosus*. 4.Ed. Philadelphia: Lea & Febiger, c.1993, cap16, sec.3, p.148-156

ARNETT Jr, F.C. The genetic basis of lupus erythematosus. In: Wallace, D.J., HAHN, B.H. *Dubois lupus erythematosus*. 4. Ed. Philadelphia: Lea & Febiger, c.1993, cap.2, sec.2, p.13-36

AXTENS, R.S., MILLER, M.H., LITTLEJOHN, G.O. et al., Single anticardiolipin measurement in the routine management of patient with Systemic Lúpus Erythematosus. **J. Rheumatol.**, v.21, n.1, p 91-93, 1994

BECZI, I. The immunology of prolactin. **Semin. Reprod. Endocrinol.**, v.10, p.196-219, 1992

BELMONT, H. M., BUYON, J., GIORNO R., ABRAMSON S. Up-regulation of endothelial cell adhesion molecules characterizes disease activity in systemic lupus erythematosus. (the Shwartzman Phenomenon revised). **Arthritis. Rheum.**, v.37, n.3, p.376-383, 1994.

BERMAS B.L. et al. T helper cell dysfunction in systemic lupus erythematosus (SLE): relation to disease activity. **J. Clin. Immunol.**, v.14, n.3, p.169 - 177, May 1994.

BOMBARDIER, C., GLADMAN, D. D., UROWITZ, M.B. et al. Derivation of the SLEDAI. The committee on prognosis studies in sle. **Arthritis Rheum.**, v.35, p.630-640, 1992.

COWDERY, S. J, FLEMING, A.L. In vivo depletion of CD4 T cells increase sensitivity to polyclonal activation: The role of interferon- γ . **Clin. Immunol. Immunopathol.**, v.62, n.1, pp.72-77, 1992.

CRUZ, B. A ., CRUZ FILHO, A . Lupus eritematoso sistêmico (LES) exacerbado por luz fluorescente. **Rev. Bras. Reumatol.**, v.34, n.6, p.336-338, Nov/dez. 1994.

- DEL PRETE, G., DE CARLI, M., ALMERIGOGNA, F., GIUDIZI., M.G., et. al. Human IL10 is produced by both type T helper (Th1) type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific prokiferation and cytokine Production. **J. Immunol.**, v.150, p. 353-360, jan.1993
- DESAI-MEHTA A., MAO, C., RAJAGOPALAN, S., et al. Structure and specificity of T cell receptors Expressed by potentially pathogenic Anti-DNA autoantibody-inducing T cells in Human lupus. **J.Clin. Invest.**, v.95, p.531-541, Feb. 1995.
- DHILLON, V. B., MACCALLUM, S., LATCHHAN D. S., ISENBERG . D. A. Elevation of the 90kDa heat-shock proteinin specific subsets of Systemic lupus erythematosus. **Q. J. Med.**, v.87, n.4, p.215-222, 1994.
- DRENKARD, C., VILLA, A .R., ALARCÓN-SEGOVIA, D., et al. Influence of the antiphospholip syndrome in the survival of patients with systemic lupus erythematosus. **J. Rheumatol.**, v.21, n.6. 1007-1072, 1994.
- ESDAILE, J. M., ABRAHAMOWICZ, M., JOSEPH, L., et al. Laboratory test as predictors of disease exacerbations in systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum.**, v.39, p.370-378, 1996.
- ERKELLER-YÜKSEL, F., HULSTAART,F., HANNET,I., et al. Lymphocyte Subset in a large Cohort of Patients with Systemic Lúpus Erythematosus. **Lúpus**, v.2, p.227-231, 1993.

EWANS, P.W., BARRET, H.M., PUSEY, C.D. Defective natural killer (NK) and killer cell function in systemic lupus erythemaatosus. *J.Clin. Lab. Immunol.*, v.10, p.71-75, 1983.

EWANS, T. G. SOUSA, A .Q., ALENCAR, J.E. et al. Blood tissue parasitic infections endemic to Northeast Brazil: schistosomiasis, cysticercosis and the leishmaniasis. In : Guerrant, R. L. et al (eds.) **At the edge of development:** health crises in a transitional society. Durham: Carolina Academic Press, c 1996. Cap12, p. 225-244.

FANTINI, S.C., LOPES, A . C. , MIRANDA, C.T. et al. Evaluation of the influence of emotional aspects on the onset of the first flare of systemic lupus erythematosus. *Rev. Bras. Reumatol.*, v.35, n.4, p.177-182, 1995.

FIORENTINO, E. D., BOND, M. W., MOSMANN, T. R. Two types of mouse T helper cell IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J.Exp. Med.*, v.170, p. 2081-2085, Dec 1989.

GORLA, R., AIRÓ, P., FRANCESCHINI, F., et al. Decreased Number of Peripheral Blood CD4+CD29, Lymphocytes and increased In Vitro Spontaneous Production of Anti-DNA Antibodies in Patients with Active Systemic Lúpus Erythematosus.*J. Rheumatol.*, v.17, n.8, p.1048-1053, 1990.

GUTIERREZ, M. A., SCOPELITIS, E., CITERA, G., SILVEIRA, L.H. et al. Prolactin, a neuroimmunomodulator implicated in the pathogenesis of rheumatic diseases. *Ver. Bras. Reumatol.*, v.34, n.2, p.65-69, 1995.

- HAGIWARA, E., GOURLEY, M.F., LEE, S., KLINMAN, D. M. Disease severity in patients with systemic lupus erythematosus correlates with an increase ratio of interleukin 10: interferon- γ - secreting cells in the peripheral blood. *Arthritis Rheum.*, v.39, n.3, p.379-385, 1996.
- HAHN, B.H. & TSAO, B.P. Antibodies to DNA. In: Wallace, D.J., HAHN, B.H. Dubois lupus erythematosus. 4. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, c.1993, cap.20, sec.4. p. 195-201.
- HOJNIK, M., GEORGE, J., ZIPOREN, L., et al. Heart Valve Involvement (Libman-Sacks Endocarditis) in the Antiphospholipid Syndrome. *Circulation*, v.93, n.8, p.1579-1587, 1996.
- HORWITZ, D. A. , LINKER- ISRAELY, M., et al. Functional properties of cd8 positive lymphocyte subsets in Systemic Lúpus Erythematosus. *J. Rheumatol.*, suppl 13, v.14, p.49-52. 1987.
- ILIOPODUS, A.G., TSOKOS, G.G. Immunopathogenesis and spectrum of infection in systemic lúpus erythematosus. *Sem. Arthritis Rheum.*, v.25, n.5, p.318- 336, 1996.
- JARA, L.J. ZAZUITE, B., IRIGOYEN, L., ORTIZ M., et al. Prolactin e interleucin 6 in the cerebro spinal fluid (CSF) of patient with systemic lupus erythematosus and central Nervous system involent CNS - SLE. *Arthritis Rheum.*, 36 (suppl), S 88, 1993.

KALUNIAN, K.C. Definition, classification, and activity indices

In: Wallace, D.J., HAHN, B.H. *Dubois lupus erythematosus*. 4. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, c.1993, cap.5, sec.2. p.58-63

KAMMER, G.M., STEIN, R. L. T lymphocyte immune dysfunction in systemic lupus erythematosus. *J. Lab. Clin. Med.*, v.115, n.3, p.274-282, 1990.

KHAMASHTA, M. A .The antiphospholipid syndrome. *Rev. Bras. Reumatol.*, v.35, n.1, p.3-5,1995.

KAY, N. E. Natural killer cells. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, v.22, p.343-359, 1986.

LEFKOWITH, J.B., GILKESON, G. S. Nephritogenic autoantibodies in lupus. *Arthritis Rheum.*, v.39, n.6, p.896-903, 1996.

LESSER, P.G. Exames laboratoriais (Utilização e interpretação no auxílio do diagnóstico das doenças reumáticas. *Ars Cvrandi*, v.28, n.4, p.12-24, 1995.

LINKER-ISRAELI, M., QUISMORIO, F.P. HORWWITZ, D.A. CD8+ Lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus sustain, rather than suppress, spontaneous polyclonal IgG production and synergize with CD4+ cells to support autoantibody synthesis. *Arthritis Reum.*, v.33, n.8, p. 1216-1225, 1990.

LLORENTE, L., RICHAUD-PATIN, Y., FIOR, R., et al. In vivo production of interleukin 10 by non-t cells in rheumatoid arthritis , Sjögren's syndrome, and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.*, v.37, n.11, p.1647-1655, 1994.

- LLORENTE, L., ZOU, W., LEVY, Y., RCHARUD-PATIN Y., et al. Role of Interleukin 10 in the B lymphocyte hyperactivity and autoanticorpo production of human systemic Lúpus Erythematosus. *J. Exp. Med.*, v.181, p.839-844, 1995.
- MALEFYT, R. W., ABRAMS, J., BENNET, B., FIGDOR, C.G., VRIES, J. E. Interleucina 10 (IL-10) Inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL10 produced by monocytes. *Exp. Med.*, v.174, p.1209-1220, 1991.
- MATSUDA J., SAETOH, N., GOHCHI, K., et al. Detection of Beta 2 glycoprotein I dependente antiphospholipid antibodies and anti b2 glycoprotein I - In antibody patient with systemic lúpus erythematosus and patient with syphilis. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, v. 103, p.239-241, 1994.
- McNALLY, T., MACKIE, I.J., MACHIN, S. J., et al. Incresead levels of *B2 Glycoprotein-1 binding antibodies are associated with a history of throboembolic complications in pacientes with SLE and prymary antiphospholipid syndrome. *Br. J. Rheumatol.*, v.34, p.1031-1036, 1995.
- MCINERNEY, M. F., CLOUGH, J.D., SENITZER, D., CATHCART, M.K. Two distinct subset of patient with Systemic Lupus Erythematosus. *Clin. Immunol. Immunopathol*, v.49, p.116-132, 1988.
- MONTENEGRO, V., MANGUEIRA, C.L.P., SELLO, E. M. C., et al. Prolactina e doenças autoimunes. *Rev. Bras. Reumatol.*, v.36, n.2, p.75-85, 1996.
- MORIMOTO, C., RUNHER, E.L., SCHLOSSMAN, S.F., et al. Alterations of immunoregulatory T cell subsets in active systemic lúpus erythematosus . *J. Clin. Invest.* , v.66, p.1171-1174, 1980.

MÜHLEN, C.A., NAKAMURA, R.M. Overview on induction mechanism of autoimmunity. *Rev. Bras. Reumatol.*, v.36, n.1, p.3-10,1996.

MÜHLEN,C.A., TAN, E.M. Autoantibody specificities in autoimmune rheumatic disease. *Rev. Bras. Reumatol.*, v.34, n.4, p.173-193,1994

MUJIC, F., CUADRADO, M.J., LLOYD, M., KHAMASHTA, M.A., et al. Primary antiphospholipid syndrome evolving into systemic Lúpus Erythematosus. *J. Rheumatol.*, v.22, n.8, p.1589-1592, 1995.

NEIDHART, M., PATAKI, F., MICHEL, B. A., FEHR, K. CD45 isoforms expression on Cd4+ and cd8+ peripheral blood T lymphocytes is related to auto immune processes and hematological manifestations in systemic lupus erythematosus. *Schweiz Med. Wochenschr.*, n.126, p.1922-1925, 1996.

NIVED, O., JOHANSSON, I., STURFELT, G. Effects of ultraviolet irradiation on natural killer cell function in systemic lupus erythematosus. *Ann. Rheum. Dis.*, v.51, n.6, p. 726-730,1992.

OLIVEIRA, S.K. F. Prolactina nas doenças de origem imunoinflamatória. *Ars Curandi.*, v.30, p.19-25, 1997.

PETRI, M., GENOVESE, M., ENGLE, E., et al. Definition, incidence and clinical description of flare in systemic lupus erythematosus. (a prospective cohort study). *Arthritis Rheum.*, v.34, n.8, p.937-944, 1991.

PETRI, M. Diagnosis os antiphospholipid antibodies. *Rheum. Dis. Clin. North Am.*, v.20, n.2, p.443-469, 1994

PETRI, M. Systemic lupus erythematosus. In: RICH, R.R. et al (eds.) **Clinical immunology: Principles and practice**. ST. Louis: Mosby, c. 1996. V.2, cap71, p.1072-1092

RUSSEL, D.H., KIBLLER, R. M., LARSONS, D.F., PAULO, B., MAGMO, B.E., Prolactin receptores on human T e B lymphocytes antagonism of prolactin bending by ciclosporin. **J. Immunol.**, v.134, p.3027-3031, 1985

SATO, E.I. Lúpus eritematoso sistêmico - LES. **Ars Curandi**, v.28, n.4, p. 29 - 33, 1995.

SCHUR, P.H. Clinical features of SLE. In: KELLEY, W.N. et al. **Textbook of rheumatology**. 4. ed. Philadelphia: W.B. Saunders, c.1993. v.2, cap.61, sec. 8, 1017-1042.

SERAINE, F. **Linguagem e cultura**: estudo e ensaios. Fortaleza: Secretaria de cultura e desporto, 1985. 221p

SIBBITT, W. L., Jr., MATHEWS, P. M., BANKHURST, A. D. Impaired release of a soluble natural killer cytotoxic factor in systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum.**, v. 27, n.10, p.1095-1100, oct. 1984

SIELING, P. A., ABRAMS J.S., YAMAMURA, M., SALGANME, P., et. al. Immunosuppressive Roles for IL10 and IL4 in human infection. (In vitro Modulation of T cell Responses in leprosy). **J. immunol.**, v. 150, n.12, p. 5501-5510, june 1993.

SPRONG P. E., BOOTSMA H., HUITEMA M.G., LIMBURG P.C., & KALLENBERG C.G.M. . Levels of soluble VCAM-1, soluble ICAM-1, and soluble E-selectin during disease exacerbations in patients with systemic lupus erythematosus (SLE): a long term prospective study. *Clin. Exp. Immunol.*, v. 97, p.439-444, 1994

SPRONG, P. E. , Van Der GUN, B.T., LIMBURG P.C., KALLENBERG, C. G. Cell B activation in clinically quiescent systemic lupus erythematosus (SLE) is related to immunoglobulin levels, but not to levels of anti-dsDNA, nor to concurrent t cell activation. *Clin. Exp. Immunol.*, v.93, n.1 p.39-44, 1993.

STAUB, H.L. Detecção de anticorpos antifosfolípidos: observações práticas. *Rev. Bras. Reumatol.*,v.35, n.5, p.285-290,sep/oct. 1995.

STRANNEGARD, Ö., HERMODSSON, S., WESTBERG, G., Interferon and natural killer in systemic lupus erythematosus. *Clin. Exp. Immunol.*, v.50, p.246-252, 1982.

TAN, E.M., COHEN, A. S., FRIES, J.F., MASI, A.J.; et al. The 1982 revised criteria for classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.*, v.25, p.1271-1277, 1982.

TSOKOS, G.C. Lymphocyte abnormalities in the human lupus. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, v.63, n.1, p.7-9, apr. 1992.

TOMER,Y., BLANK, M., SOENFELD,T. Supression of experimental antiphospholipid syndrome and systemic lupus erythematosus in mice by anticd4 monoclonal antibodies. *Arthritis Rheum.*,v.37, n.8, p.1236-1244, Aug., 1994.

WALLACE, D.J.. The clinical presentation of SLE. In: Wallace, D.J., HAHN,B.H.
Dubois lupus erythematosus. 4. ed. Philadelphia: Lea & Febiger,
c.1993, cap 33, sec.6, p.317- 321

WOODS Jr.,V.L. Pathogenesis of systemic lupus erythematosus. In: KELLEY,
W.N. et al. *Textbook of rheumatology.* 4. ed. Philadelphia: W.B. Saunders,
c.1993. v.2, cap.60, sec. 8, 999-1016.

ANEXOS

ANEXO 1

Critérios para o diagnóstico do LES revisado pelo Colégio Americano de Reumatologia(ACR) 1982 .

CRITÉRIOS

1. Rash malar
2. Rash discoide
3. Fotosensibilidade
4. Úlceras orais
5. Artrite
6. Serosite
7. Comprometimento renal
8. Comprometimento neurológico
9. Comprometimento hematológico
10. Comprometimento imunológico
11. Anticorpo antinuclear

ANEXO 2

ÍNDICE SLEDAI - PROTOCOLO DO LES -

Nomesexo.....idade..... Nasc.....
 tempo de doençapront.....Hospital.....

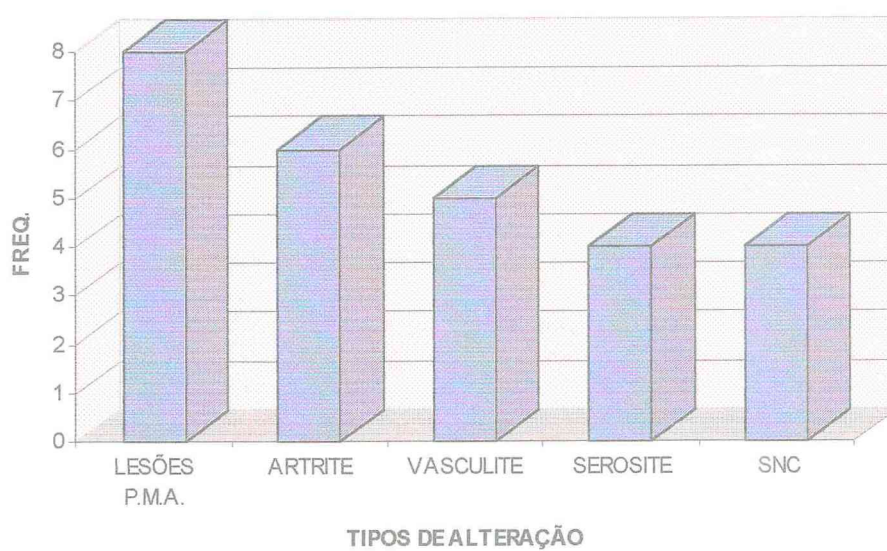
- 8....convulsão
 - 8....psicose
 - 8....síndrome cerebral orgânica
 - 8....envolvimento craniano
 - 8....cefaléia lúpica
 - 8....AVC
 - 8....vasculite
 - 4....artrite
 - 4....miosite
 - 4....cilindros urinários
 - 4....hematuria
 - 4....proteinuria
 - 4....piuria
 - 2....rush recente
 - 2....alopécia
 - 2....úlceras de mucosa
 - 2....pleurisia
 - 2....pericardite
 - 2....complemento baixo
 - 2....aumento no título de DNA
 - 1....febre
 - 1....trombocitopenia
 - 1....leucopenia
- total: _____

Tratamento atual _____

OBS: _____

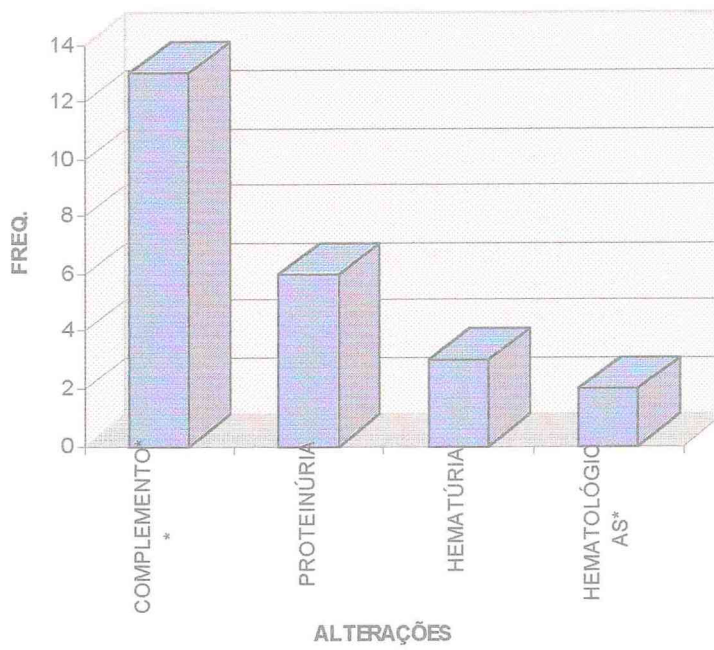
ANEXO 3

GRÁFICO 1 - PRINCIPAIS ALTERAÇÕES CLÍNICAS DETECTADAS NA AMOSTRA DE PACIENTES COM L.E.S.



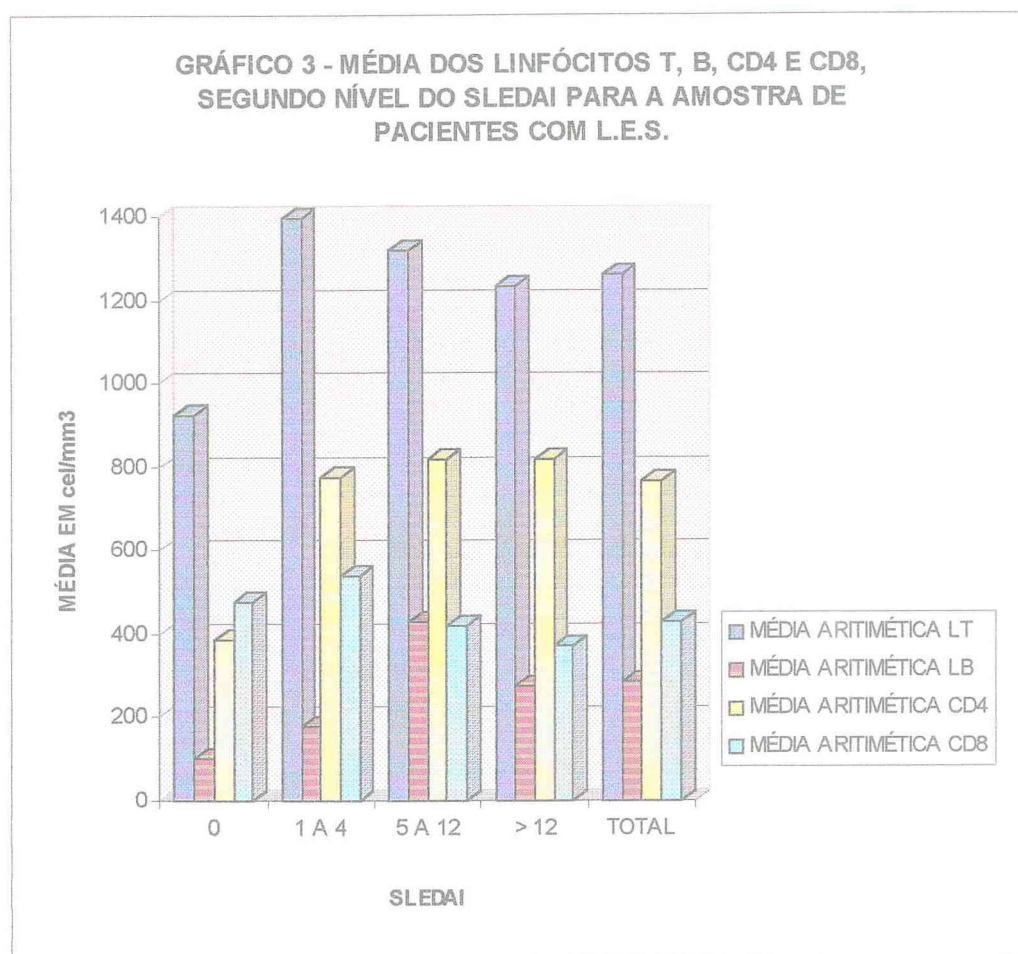
ANEXO 4

GRÁFICO 2 - PRINCIPAIS ALTERAÇÕES LABORATORIAIS PRESENTES NOS PACIENTES COM L.E.S. (n = 20)



ANEXO 5

GRÁFICO 3 - MÉDIA DOS LINFÓCITOS T, B, CD4 E CD8,
SEGUNDO NÍVEL DO SLEDAI PARA A AMOSTRA DE
PACIENTES COM L.E.S.



ANEXO 6

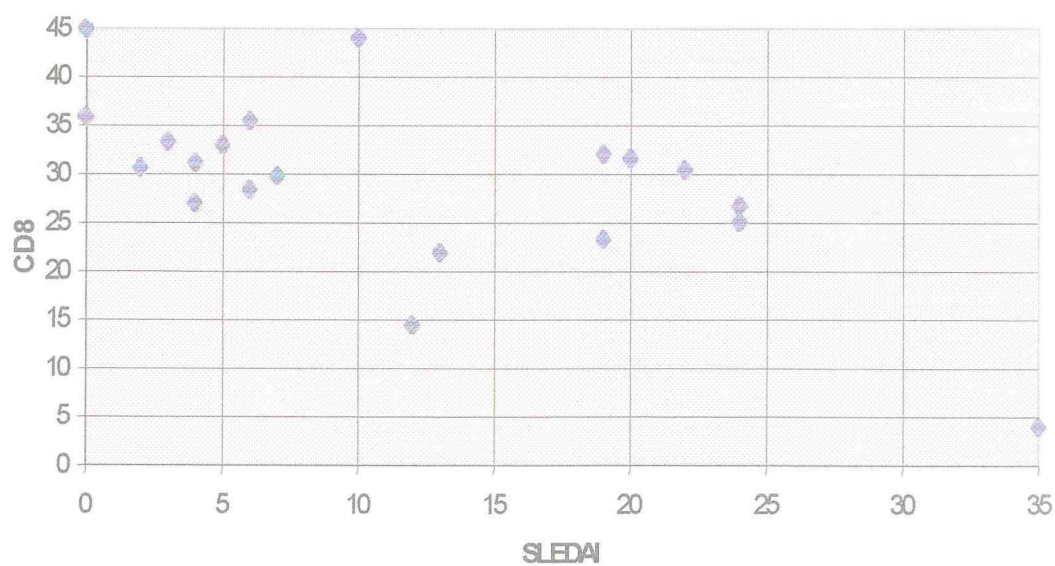


ANEXO 7



ANEXO 8

GRÁFICO 6 - CORRELAÇÃO ENTRE O SLEDAI E CD8 PARA A AMOSTRA DE PORTADORES DE L.E.S.



CASOS	IDADE	T.PAT.	COR	SLEDAI	HT	LEUC	LINF	PLAQ	LT%	LT	LB%	LB	CD4%	CD4	CD8%	CD8	NK%	NK	cd4/cd8
	anos	anos																	
1	24	6,00	p	2	39,0	7,9	2,32	216	80,5	1867,6	4,6	106,7	48,0	1113,6	30,6	709,9	3,1	71,9	1,57
2	34	1,00	b	6	41,6	6,0	2,02	267	80,0	1616,0	9,7	195,9	44,4	896,9	28,4	573,7	1,0	20,2	1,56
3	19	7,00	b	10	35,3	8,2	0,57	351	76,3	434,9	5,9	33,6	28,2	160,7	44,0	250,8	11,2	63,8	0,64
4	34	5,00	b	6	32,2	4,0	0,79	193	76,8	606,7	16,4	129,6	39,1	308,9	35,4	279,7	2,7	21,3	1,10
5	23	2,00	b	5	38,3	8,2	1,26	498	85,2	1073,5	10,6	133,6	51,8	652,7	32,9	414,5	2,0	25,2	1,57
6	38	11,00	p	20	21,6	6,6	0,70	308	78,7	550,9	4,7	32,9	50,0	350,0	31,6	221,2	12,2	85,4	1,58
7	37	2,00	p	19	34,8	5,5	0,70	229	71,9	503,3	8,7	60,9	35,6	249,2	32,1	224,7	5,1	35,7	1,11
8	32	6,00	p	4	32,7	7,8	1,70	494	70,8	1203,6	19,8	336,6	36,1	613,7	27,0	459,0	5,1	86,7	1,33
9	27	2,00	p	7	31,1	3,6	0,50	349	73,0	365,0	6,2	31,0	42,9	214,5	29,7	148,5	4,2	21,0	1,44
10	46	3,00	p	4	34,7	6,6	1,63	259	78,7	1282,8	11,6	189,1	42,5	692,8	31,1	506,9	8,3	135,3	1,37
11	21	0,33	p	19	27,6	5,6	1,82	236	79,1	1439,6	15,3	278,5	56,1	1021,0	23,3	424,1	0,4	7,3	2,40
12	19	0,08	b	35	17,8	18,2	1,57	416	19,9	312,4	58,5	918,5	15,0	235,5	4,0	62,8	1,0	15,7	3,75
13	16	0,25	p	12	29,2	14,3	5,89	324	64,8	3816,7	34,5	2032,1	45,6	2685,8	14,4	848,2	1,1	64,8	3,17
14	22	9,00	b	13	30,9	7,0	3,86	284	98,1	3786,7	1,5	57,9	74,5	2875,7	21,9	845,3			3,40
15	34	11,00	p	24	38,3	6,1	1,46	162	87,4	1276,0	3,6	52,6	48,5	708,1	25,1	366,5	3,5	51,1	1,93
16	26	9,00	p	3	32,7	9,2	1,44	104	85,0	1224,0	5,1	73,4	47,6	685,4	33,3	479,5	5,3	76,3	1,43
17	17	4,00	p	0	42,9	5,8	0,99	207	89,0	881,1	2,8	27,7	37,9	375,2	44,9	444,5	7,9	78,2	0,84
18	16	3,00	b	0	36,7	7,0	1,41	217	68,6	967,3	12,1	170,6	28,0	394,8	35,9	506,2	21,9	308,8	0,78
19	27	0,08	p	22	29,3	5,8	0,92	231	73,1	672,5	20,9	192,3	40,9	376,3	30,4	279,7	2,1	19,3	1,35
20	26	0,50	p	24	35,3	16,8	1,97	456	66,3	1306,1	30,0	591,0	36,5	719,1	26,7	526,0	1,4	26,8	1,37
MÉDIA	26,9	4,11		11,8	33,1	8,0	1,68	290,1	75,2	1259,3	14,1	282,2	42,5	766,5	29,1	428,6	5,2	63,9	1,68
MED.	26,0	3,00		8,5	33,7	6,8	1,45	263,0	77,8	1138,6	10,2	131,6	42,7	633,2	30,5	434,3	3,5	51,1	1,44
DP	8,3	3,69		9,8	6,2	3,9	1,25	109,2	15,4	971,9	13,7	466,0	12,1	741,1	9,1	211,8	5,3	68,1	0,86

ASOS	CarG	CarM	dsDNA	dsDNA	HEMOG.	COMPL.	PROTEIN.
1	neg	neg	neg	0	neg	pos	neg
2	neg	neg	neg	0	neg	pos	pos
3	neg	neg	forte	2	neg	pos	neg
4	neg	neg	fraco	1	neg	pos	neg
5	neg	neg	forte	2	neg	pos	neg
6	neg	neg	fraco	1	neg	pos	pos
7	neg	neg	neg	0	neg		neg
8	neg	neg	fraco	1	neg	neg	neg
9	neg	neg	forte	2	pos	neg	neg
10	neg	neg	fraco	1	neg	pos	pos
11	neg	neg	forte	2	neg	pos	pos
12	pos	pos	forte	2	neg	pos	neg
13	neg	pos	forte	2	neg	pos	neg
14	neg	pos	forte	2	neg	pos	neg
15	pos	pos	fraco	1	neg	pos	pos
16	neg	neg	fraco	1	pos	neg	neg
17	neg	neg	neg	0	neg	neg	neg
18	neg	neg	neg	0	neg	neg	neg
19	neg	neg	neg	0	neg	neg	neg
20	neg	neg	neg	0	neg	pos	pos

HEMAT.	L. P.M.A.	CASOS	VASCUL.	ARTRITE	SEROSITE	SNC
neg	pos	1	neg	neg	neg	neg
pos	pos	2	pos	neg	neg	neg
neg	pos	3	neg	neg	neg	neg
neg	neg	4	neg	pos	neg	neg
neg	neg	5	neg	neg	pos	neg
pos	neg	6	pos	neg	neg	neg
neg	pos	7	neg	pos	neg	pos
neg	neg	8	neg	pos	neg	neg
neg	neg	9	neg	neg	neg	neg
neg	neg	10	neg	neg	neg	neg
neg	pos	11	neg	pos	neg	neg
neg	pos	12	pos	pos	pos	pos
neg	neg	13	neg	neg	pos	neg
neg	pos	14	pos	neg	neg	neg
neg	neg	15	neg	neg	pos	pos
neg	neg	16	neg	neg	neg	neg
neg	neg	17	neg	neg	neg	neg
neg	neg	18	neg	neg	neg	neg
neg	neg	19	pos	pos	neg	pos
pos	pos	20	neg	neg	neg	neg

CONT.	IDADE anos	T.PA T. anos	COR	SLEDAI	HT	LEU	LINF	PLAQ	LT%	LT	LB%	LB	CD4%	CD4	CD8%	CD8	NK%	NK	cd4/cd8
1	20	0	p	0	37,3	8,2	3,25	210	85,0	2762,5	10,6	344,5	44,1	1433,3	28,5	926,3	8,9	289,3	1,55
2	34	0	b	0	39,4	9,4	4,40	213	79,5	3498,0	19,6	862,4	46,5	2046,0	26,9	1183,6	2,6	114,4	1,73
3	46	0	b	0	37,4	5,4	2,54	173	71,3	1811,0	16,9	429,3	51,0	1295,4	20,0	508,0	7,3	185,4	2,55
4	31	0	b	0	35,7	18,9	3,99	399	77,3	3084,3	14,7	586,5	44,0	1755,6	28,8	1149,1	3,7	147,6	1,53
5	34	0	p	0	43,9	6,5	2,21	233	70,7	1562,5	15,1	333,7	38,3	846,4	29,7	656,4	5,4	119,3	1,29
6	28	0	p	0	39,5	7,0	2,65	228	66,7	1767,6	8,8	233,2	41,6	1102,4	24,7	654,6	5,1	135,2	1,68
7	32	0	p	0	45,8	8,7	1,91	162	85,9	1640,7	6,7	128,0	59,2	1130,7	24,5	468,0	4,9	93,6	2,42
8	48	0	b	0	40,8	8,2	2,15	267	83,0	1784,5	8,8	189,2	51,7	1111,6	26,8	576,2	3,5	75,3	1,93
9	18	0	b	0	38,5	8,7	3,44	203	74,0	2545,6	13,1	450,6	39,5	1358,8	24,1	829,0	3,5	120,4	1,64
10	29	0	b	0	33,0	6,8	2,37	219	75,2	1782,2	10,6	251,2	46,8	1109,2	28,0	663,6	5,7	135,1	1,67
11	38	0	p	0	32,8	3,6	0,90	290	70,7	636,3	7,9	71,1	50,2	451,8	20,1	180,9	6,9	62,1	2,50
12	39	0	b	0	40,7	7,2	2,90	259	81,4	2360,6	10,5	304,5	62,0	1798,0	18,6	539,4	2,7	78,3	3,33
13	35	0	b	0	43,6	7,5	2,57		78,3	2012,3	10,5	269,9	53,9	1385,2	24,0	616,8	2,4	61,7	2,25
14	35	0	b	0	35,2	10,8	3,89		67,4	2621,9	20,2	785,8	36,9	1435,4	27,3	1062,0	10,0	389,0	1,35
15	39	0	p	0	34,8	6,6	1,60		66,7	1067,2	7,9	126,4	33,2	531,2	33,5	536,0	14,8	236,8	0,99
16	16	0	p	0	39,2	6,9	2,28	250	74,1	1689,5	15,6	355,7	49,7	1133,2	23,1	526,7	5,6	127,7	2,15
17	36	0	b	0	39,6	7,0	2,61	182	77,0	2009,7	13,0	339,3	43,4	1132,7	32,5	848,3	10,0	261,0	1,33
18	21	0	p	0	34,6	7,2	2,30	240	76,6	1761,8	12,7	292,1	43,6	1002,8	28,5	655,5	11,0	253,0	1,53
19	38	0	p	0	40,5	9,0	2,80	293	80,1	2242,8	7,9	221,2	45,0	1260,0	34,7	971,6	1,9	53,2	1,30
20	24	0	b	0	35,6	5,7	1,61	182	70,2	1130,2	11,0	177,1	41,9	674,6	25,6	412,2	3,4	54,7	1,64
MÉDIA	32,5	0		0	38,4	8,1	2,67	238,8	75,6	2033,7	12,4	346,0	46,3	1227,4	26,1	713,3	6,1	154,6	1,83
MED.	34,0	0		0	38,9	7,2	2,57	230,5	75,9	1811,0	11,7	304,5	45,0	1133,2	26,9	655,5	5,4	127,7	1,67
DP	8,8	0		0	3,7	3,0	0,85	57,3	6,0	676,6	4,0	208,1	7,3	391,6	4,1	258,1	3,5	91,5	0,58
TESTE	0,065				0,003	0,967	0,009	0,062	0,967	0,010	0,579	0,631	0,254	0,029	0,180	0,001	0,615	0,002	0,563

COR	LT	LB	CD4	CD8
SLEDAI	-0,123	0,270	-0,040	-0,395
dsDNA	0,215	0,282	0,308	-0,078

CONT.	CarG	CarM	dsDNA
1	neg	neg	neg
2	neg	neg	neg
3	neg	neg	neg
4	neg	neg	neg
5	neg	neg	neg
6	neg	neg	neg
7	neg	neg	neg
8	neg	neg	neg
9	neg	neg	neg
10	neg	neg	neg
11	neg	neg	neg
12	neg	neg	neg
13	neg	neg	neg
14	neg	neg	neg
15	neg	neg	neg
16	neg	neg	neg
17	neg	neg	neg
18	neg	neg	neg
19	neg	neg	neg
20	neg	neg	neg

