



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

DENISE DE QUEIROGA NASCIMENTO

**EXPRESSÃO DOS miRNAs 9 E 125B NO LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO  
JUVENIL**

**Recife**

**2019**

DENISE DE QUEIROGA NASCIMENTO

**EXPRESSÃO DOS miRNAs 9 E 125B NO LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO  
JUVENIL**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Genética.

**Área de concentração:** Genética

**Orientadora:** Prof. Dra. Paula Sandrin-Garcia

**Coorientador:** Suelen Cristina de Lima

**Recife**

**2019**

Catálogo na fonte:  
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Nascimento, Denise de Queiroga

Expressão dos miRNAs 9 e 125B no lúpus eritematoso sistêmico juvenil / Denise de Queiroga Nascimento - 2019.

89 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Paula Sandrin-Garcia

Coorientadora: Suelen Cristina de Lima

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.  
Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Genética.  
Recife, 2019.

Inclui referências e apêndices.

1. Lúpus eritematoso sistêmico juvenil 2. Epigenética 3. Autoimunidade  
I. Sandrin-Garcia, Paula (Orientadora) II. Lima, Suelen Cristina de  
(Coorientadora) III. Título

616.772 CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2021-203

DENISE DE QUEIROGA NASCIMENTO

**EXPRESSÃO DOS miRNAs 9 E 125B NO LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO  
JUVENIL**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Genética.

Aprovado em **25/07/2019**

**BANCA EXAMINADORA:**

---

Dra. Paula Sandrin-Garcia (Orientador)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Dr. Rafael Lima Guimarães (Examinador Interno)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo (Examinador Externo)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Dra. Renata Santos Almeida (Examinador Externo)  
Instituto Aggeu Magalhães/ Fiocruz - Pernambuco

Designei meu tempo e trabalho para contribuir com a ciência e descobrir um pouco mais sobre os mistérios que assolam as doenças autoimunes. Portanto, a todos os pacientes dessa pesquisa e aos demais portadores do Lúpus, dedico essa pesquisa.

## **AGRADECIMENTOS**

Eu não fiz esse mestrado acontecer sozinha. Fui a protagonista nos estudos, mas tive uma equipe de bastidores indescritível e é graças a estes que obtive os elogios e aplausos dos demais.

Agradeço a Deus primeiramente, Ele me sustentou desde sempre quando um turbilhão de questionamentos, de coisas para dar conta, de trabalhos para fazer e inúmeras decisões a tomar chegaram até mim, a minha força vem Dele. Estendo uma parcela dessa força também a minha família, em especial minha mãe Neide, minha irmã e segunda mãe Danielle e meu cunhado Rostand, meu pai e sobrinhos (meus amores) que em momento algum duvidaram da minha capacidade, inclusive foram os meus maiores incentivadores e apostadores do meu futuro, mesmo tendo que sair de casa e viver distante, abrindo mão dos abraços diários para agora andar de mãos dadas com a saudade.

Depois desse incentivo da família sanguínea, vem não menos importante o incentivo da família recifense que ganhei. Meus agradecimentos a minha orientadora, Paula Sandrin, por ter cedido essa oportunidade ímpar, por sua paciência e total credibilidade depositadas no meu trabalho, pelas horas sentadas, corrigindo, vendo como melhorar mais. A minha equipe de trabalho que se tornou mais irmãos do que amigos mesmo: Isaura, mulher incrível, de companheirismo indescritível e foi indispensável para minha caminhada até aqui, a ela eu agradeço imensamente por ter sido tão doadora e tornado meu mestrado menos trabalhoso, Guaraná, que apesar do pessimismo tomar conta dele (risos), foi aquele que se tornou mais otimista quando eu precisava. Aos demais irmãos companheiros de laboratório, que seguraram as pontas comigo, Camilla (mãezona), Ronaldo, Suelen,

Diego, Malu, Leandro, Wlisses pelas conversas e compartilhamento de conhecimento gigantescos. Doutor André, médico dos pacientes da pesquisa, na qual se disponibilizou e contribuiu significativamente para tornar esse trabalho ainda mais relevante.

As minhas amigas de apartamento, Mari, Kaka, Hellen, as duas Jéssica, que fizeram da casa compartilhada um verdadeiro lar, com risadas, bons momentos, conversas futuristas demais, vocês foram colo quando precisei de um, grata até pelas poucas brigas, mas que me fizeram amadurecer muito.

A todos meus grandes e enormes amigos, aos antigos e aos mais novos que adquirir nessa caminhada e também demais familiares que não tiveram seus nomes citados. Vocês não sabem o quanto isso fez diferença, esse trabalho também tem o dedo de vocês.

Por último, não diminuindo a importância, mas em igual parcela de contribuição, eu agradeço aos órgãos de fomento FACEPE na qual cedeu a oportunidade de estar aqui, ao programa PPGG e toda sua equipe que me receberam e me acrescentaram inúmeros saberes.

Hoje e sempre serei eternamente grata por cada um e por cada situação e aventura vivida nesses dois anos de trabalho. Me torno hoje, não só mestre em Genética, mas mestre em muitas coisas na vida também. Eu amo vocês.

## RESUMO

Lúpus eritematoso sistêmico juvenil (LESj) é uma doença autoimune e inflamatória que compromete órgãos e tecidos, que pode ser influenciado por mecanismos epigenéticos, entre outros. Nesse contexto, a ação de miRNAs, que tem como alvo genes que regulam funções imunológicas, tem sido relacionado ao LES. *NFKB1* e *TRAF6* são dois genes alvos de miRNAs e são também envolvidos em importantes vias inflamatórias. Assim, o objetivo desse estudo foi analisar a expressão do miR-9-5p e miR-125b-5p, a fim de compreender, juntamente com a expressão dos alvos *NFKB1* e *TRAF6*, sua influência no desencadeamento da inflamação no LESj. Os ensaios de expressão gênica foram realizados em 59 pacientes com LESj, sendo 35 em atividade e 24 inativos seguindo o SLEDAI  $\leq 4$  (Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index). O método usado foi a reação em cadeia de polimerase em tempo real. Como resultados, observamos que tanto o miR-9-5p (Fold Change (FC)=1,32) quanto o miR-125b-5p (FC=1,11) não apresentaram diferença significativa de expressão entre pacientes em atividade quando comparados aos pacientes inativos ( $p=0,81$ ;  $p=0,08$ ), assim como os alvos *NFKB1* (FC=0,93;  $p=0,73$ ) e *TRAF6* (FC=1,15;  $p=0,09$ ). Entretanto, foi observada uma correlação negativa entre miR-125b-5p e o *TRAF6* ( $r=0,37$ ), e em pacientes ativos essa correlação foi ainda mais acentuada quando comparado aos pacientes inativos. Dessa forma, concluímos que tanto os miRNAs quanto seus genes alvos se comportaram de forma semelhante entre os pacientes em atividade e inatividade, uma vez que estariam influenciando na inflamação desses pacientes independente da condição que estes se encontram da doença.

**Palavras- chaves:** epigenética; autoimunidade; miR-9-5p; miR-125b-5p; LESj.

## ABSTRACT

Juvenile systemic lupus erythematosus (jSLE) is an autoimmune and inflammatory disease that compromises organs and tissues, which can be influenced by epigenetic mechanisms, among others. In this context, the action of miRNAs, which targets genes that regulate immune functions, has been related to SLE. *NFKB1* and *TRAF6* are two target genes for miRNAs and are involved in important inflammatory pathways. Thus, the aim of this study was to analyze miRNA expression miR-9-5p and miR-125b-5p, in order to understand, along with the expression of *NFKB1* and *TRAF6* targets, its influence on the triggering of inflammation in jSLE. The gene expression assays were performed in 59 patients with SLE, 35 in activity and 24 inactive following SLEDAI  $\leq 4$  (Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index). The method used for a real-time polymerase chain reaction. As a result, we observed that both miR-9-5p (Fold Change (FC) = 1.32) and miR-125b-5p (FC= 1.11) showed no significant difference between active patients when compared to inactive patients ( $p=0,81$ ;  $p= 0,08$ ); as well as the targets *NFKB1* (FC = 0.93;  $p=0,73$ ) and *TRAF6* (FC = 1.15;  $p=0,09$ ). However, a negative correlation was observed between miR-125b-5p and *TRAF6* ( $r=0,37$ ) and in active patients, this correlation was even more pronounced when compared to inactive patients. Thus, we conclude that both the miRNAs and their target genes behaved in a similar way among the patients in activity and inactivity of the disease, since they would be influencing the inflammation of these patients regardless of the condition they are on disease

**Key words:** epigenetics; autoimmunity; miR-9-5p; miR-125b-5p; jSLE.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Envolvimento dos múltiplos sistemas no lúpus eritematoso sistêmico. Fonte: Crampton, S. P., Morawski, P. A., & Bolland, S. (2014) .....	23
Figura 2 – Rash malar. O eritema facial agudo no rash malar aparece como placas eritematosas com escamas. Fonte: Yun and Stein, 2015. ....	27
Figura 3 – Biogênese do miRNAs e os mecanismos de inibição da síntese proteica. Adaptado GAO et al., (2014).....	35
Figura 4 – miRNAs que participam da rede do NF-kB. Fonte adaptado: Ma et al., 2011.....	47
Figura 5 – Regulação da via do NF-kB pelos miRNAs confirmados no LES. Fonte adaptado: Essandoh, and Fan, 2014.....	48
Figura 6 – Mecanismos de sinalização TRAF6. Fonte: (Walsh, M. C., Lee, J., & Choi, Y. 2015).....	50
Figura 7 – Correlação entre o miRNA 125b-5p e o TRAF6 em pacientes com LESj ( $r=0,50$ ; $p=0,05$ ).....	68
Figura 8 – Correlação entre o miRNA 125b-5p e o TRAF6 em pacientes com condição de atividade do LESj.....	68
Gráfico 1– Expressão relativa do miR-9-5p <i>entre pacientes inativos (Média= 32,58, SD= 1,52) e pacientes em atividade (Média= 32,40, SD= 1,90)</i> .....	61
Gráfico 2– Comparação da expressão do miR-125-5p entre pacientes inativos (Média= 30,12, SD= 1,14) e pacientes em atividade (Média=30,19, SD= 1,22).....	62
Gráfico 3– Comparação da expressão do miR-9-5p entre pacientes inativos (Média= 31,63 SD= 1,24) e pacientes em atividade (Média=32,39 SD= 1,97) que apresentavam alterações renais como manifestação clínica.....	63
Gráfico 4– Comparação da expressão do miR-125-5p entre pacientes inativos (Média= 30,00 SD= 1,34) e pacientes em atividade (Média=30,31 SD= 1,11) que apresentavam alterações renais como manifestação	

	clínica.....	64
Gráfico 5–	Comparação da expressão do miR-9-5p entre pacientes inativos (Média= 31,85 SD= 1,53) e pacientes em atividade (Média= 32,18 SD= 1,64) que apresentavam rash malar como manifestação clínica.....	65
Gráfico 6–	Comparação da expressão do miR-125b-5p entre pacientes inativos (Média= 29,96 SD= 1,89) e pacientes em atividade (Média= 30,13 SD= 0,81) que apresentavam rash malar como manifestação clínica.....	65
Gráfico 7–	Comparação da expressão do gene TRAF6 entre pacientes inativos (Média= 30,01, SD= 1,20) e pacientes em atividade (Média= 29,54, SD= 1,26). método 2- $\Delta\Delta$ CT. Os valores do gráfico são expressos em FC (Fold Change).....	66
Gráfico 8–	Comparação da expressão do gene NFkB1 entre pacientes inativos (Média= 26,38, SD= 0,66) e pacientes em atividade (Média=26,21, SD= 0,51).....	67
Quadro 1–	Crítérios revisados para a classificação do lúpus eritematoso sistêmico de acordo com o Colégio Americano de Reumatologia. Fonte: HOCHBERG, 1997.....	31
Quadro 2–	miRNAs regulados diferencialmente em fluidos corporais e células mononucleares periféricas do LES. miR - microRNA, PBMC - células mononucleares periféricas. Fonte adaptado de Husakova, 2016 e do próprio autor.....	41

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características clínicas do LES de início pediátrico e de início na idade adulta. Fonte adaptado de Malattia and Martini, 2013.....	24
Tabela 2 – Programas utilizados para a escolha dos miRNAs e a quantidade de alvos que estes regulam.....	59
Tabela 3 – Manifestações clínicas apresentadas pelos pacientes participantes do grupo de pesquisa.....	60

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>Anti-dsDNA</b>	Anticorpo anti-DNA dupla fita
<b>ACR</b>	Colégio Americano de Reumatologia
<b>ADAP</b>	Proteína adaptadora promotora de adesão e degranulação
<b>ANA</b>	Anticorpo anti-nuclear
<b>Anti-Sm</b>	Antiproteína Smith
<b>Anti-Ro</b>	Antirribonucleoproteína Ro
<b>cDNA</b>	Ácido desoxirribonucleico complementar
<b>dNTP</b>	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiamino tetra-acético
<b>LES</b>	Lúpus eritematoso sistêmico
<b>NF-Kb</b>	Fator nuclear de transcrição kappa beta
<b>NFKB1</b>	Fator nuclear kappa B subunidade 1
<b>PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase do inglês <i>polymerase chain reactions</i>
<b>RT</b>	Transcriptase reversa
<b>SLEDAI-2K</b>	Medida do índice de atividade do lúpus eritematoso do inglês <i>score of lupus erithematosus disease index</i>
<b>TCLE</b>	Termo de consentimento livre e esclarecido
<b>UTR</b>	Região não traduzida do inglês <i>untranslated region</i>
<b>≥</b>	Maior ou igual que
<b>&gt;</b>	Maior que
<b>&lt;</b>	Menor que
<b>μL</b>	Microlitro

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>15</b>
1.1	OBJETIVOS	17
1.1.1	Objetivo Geral	17
1.1.2	Objetivos Específicos	17
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>18</b>
2.1	O LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO JUVENIL (LESJ)	18
2.2	EPIDEMIOLOGIA DO LESJ	20
2.3	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DO LESJ	21
2.3.1	Manifestações renais	25
2.3.2	Manifestações cutâneas	26
2.3.3	Manifestações neurológicas e articulares	27
2.3.4	Alterações imunológicas do LES	27
2.4	CRITÉRIOS PARA CLASSIFICAÇÃO DO LESJ	29
2.5	TRATAMENTO PARA O LESJ	32
2.6	EPIGENÉTICA E ETIOPATOGENESE DO LES	33
2.6.1	MiRNA e o LES	38
2.6.2	MiR-125b	40
2.6.3	MiR-9-5p	44
2.6.4	Alvo NFkB1	46
2.6.5	Alvo TRAF6	48
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>51</b>
3.1	TIPO DE ESTUDO E GRUPO AMOSTRAL	51
3.2	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO E DEFINIÇÃO DE GRUPOS	51
3.3	AMOSTRAS BIOLÓGICAS	52
3.4	ESCOLHA DOS MIRNAS E PREDIÇÃO DE ALVO	52
3.5	ISOLAMENTO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (PBMC)	52
3.6	QUANTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS	54
3.7	SÍNTESE DE CDNA	54
3.8	PREPARO DA PCR EM TEMPO REAL	55
3.9	ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA E TESTES ESTATÍSTICOS	57

3.10	APROVAÇÃO DA PESQUISA	58
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>59</b>
4.1	ALVO DOS MIRNAS	59
4.2	ANÁLISE GERAIS DOS GRUPOS	60
4.3	ANÁLISE DE EXPRESSÃO DO MIR-9-5P EM LESJ	61
4.4	ANÁLISE DE EXPRESSÃO DO MIR-125B-5P EM LESJ	62
4.5	EXPRESSÃO DOS MIR-125B-5P E MIR-9-5P EM PACIENTES COM ALTERAÇÃO RENAL E RASH MALAR	62
4.6	EXPRESSÃO DOS GENES ALVOS TRAF6 E NFKB1	65
4.7	CORRELAÇÃO ENTRE MIRNAS E GENES ALVOS	67
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>69</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>75</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>76</b>
	<b>APÊNDICE A — COMITÊ DE ÉTICA DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO</b>	<b>84</b>
	<b>APÊNDICE B — TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)</b>	<b>88</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O lúpus eritematoso sistêmico juvenil (LESj) é uma doença autoimune configurada por uma inflamação sistêmica e crônica. Esse fato ocasiona a formação de anticorpos com conseqüente deposição de imunocomplexos no organismo do indivíduo comprometendo suas funções e evoluindo para danos aos órgãos.

As manifestações do LESj são múltiplas, entretanto, quando comparados ao LES adulto (LESa), o LESj frequentemente apresenta características mais agudas e graves, com maior comprometimento dos órgãos, curso clínico mais agressivo e um acúmulo de dano mais precoce, o que acarreta em uma taxa de mortalidade de 2 a 3 vezes mais elevada que o adulto.

Dentre os pacientes com LES, 15-20% são diagnosticados durante a infância tendo a doença iniciada antes dos 16 anos (Brunner et al., 2008). Apesar da etiologia da doença não estar bem estabelecida, sabe-se que mecanismos genéticos, ambientais e imunológicos estão ligados ao seu desencadeamento. A genética, em específico, pode aumentar o risco de desenvolver o LES por contribuir com o desenvolvimento de autoanticorpos patogênicos e com a queda da autotolerância imunológica.

Recentemente, alguns estudos têm demonstrado o efeito da epigenética no desenvolvimento de doenças autoimunes, especialmente envolvendo pequenos RNAs não codificantes, tais como os microRNAs. Essas moléculas ajudam na modulação da homeostase do sistema imune ao se ligarem em genes alvos, ocasionando assim um controle na regulação desses genes. Entretanto, quando

sofrem alterações em suas funções regulatórias, os miRNAs podem contribuir para o desencadeamento de várias doenças, inclusive as autoimunes.

Mais de 1000 miRNAs já foram identificados em células humanas, e dentre estes, vários já foram analisados e associados ao LESa, se destacando o miR-155, miR-146a, miR-182, miR-17-92 e o miR-21 que possuem um papel importante na inflamação da doença. No LESj, estudos envolvendo o perfil de expressão de miRNAs ainda são considerados escassos na literatura.

Dentre os miRNAs que podem surgir como bons alvos de estudo para o LESj existem o miR-9-5p e o miR-125b-5p. O miR-9, é um miRNA que participa ativamente de diferentes eventos celulares como, por exemplo, o controle da função secretora de células produtoras de insulina, da diferenciação de células B, além de regular vias ligadas ao sistema nervoso de mamíferos. O miR-125b atua crucialmente na defesa imunológica do hospedeiro, sendo já relacionado às lesões renais, entretanto, não existem estudos voltados para a importância na autoimunidade. Ambos podem regular o processo inflamatório e tem como alvo o fator nuclear kB1 (*NFKB1*) e o *TRAF6*. Tais alvos estão intrinsecamente ligados à inflamação e podem apresentar um padrão de expressão alterado que pode ser encontrado em doenças autoimunes.

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a expressão dos miR-9-5p e o miR-125b-5p, a fim de compreender, juntamente com a expressão dos alvos *NFKB1* e o *TRAF6*, o envolvimento no desencadeamento inflamatório no LESj. Ao avaliar tais pontos será possível expandir o conhecimento sobre o LESj e averiguar os miRNAs nos processos inflamatórios envolvidos na doença.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 **Objetivo Geral**

Avaliar a expressão do miR-125b-5p e miR-9-5p entre pacientes com LESj a partir de PBMCs, além de analisar a expressão dos alvos *NFKB1* e *TRAF6* a fim de compreender as vias inflamatórias da doença.

### 1.1.2 **Objetivos Específicos**

1. Verificar os níveis de expressão *do* miR-9-5p *e do* miR-125b-5p em PBMC dentre os pacientes com LESj (ativos x inativos);
2. Averiguar as manifestações clínicas e selecionar as mais prevalentes para relacionar com a expressão do miR-9-5p e do miR-125b-5p nesses pacientes;
3. Analisar a expressão dos alvos *NFKB1* e *TRAF6* em pacientes com LESj (ativos x inativos);
4. Correlacionar a expressão do miR-9-5p e do miR-125b-5p com os genes alvo *NFKB1* e *TRAF6* de pacientes ativos e inativos.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 O LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO JUVENIL (LESJ)

O lúpus eritematoso sistêmico juvenil (LESj) é considerado uma doença autoimune crônica e multissistêmica caracterizada por uma variabilidade clínica, uma matriz de alterações imunológicas e de curso prognóstico variável (Fernandes and Brito., 2012). O lúpus foi descrito originalmente por Biett no ano de 1822 e o termo “*lupus erythematosus*” foi utilizado pela primeira vez pelo francês Cazenave, o qual faz menção às manifestações cutâneas da enfermidade. Apenas no ano de 1972, Kaposi e mais tarde em 1904 com Osler o caráter sistêmico da doença foi pioneiramente enfatizado (Zimmerman, 1997).

O início do LESj ocorre com maior frequência entre 12 e 16 anos, tornando-se menos frequente antes dos 10 anos e muito raro antes dos 5 anos de idade (Malattia and Martini, 2013). Nessa fase, a predominância do sexo feminino não é tão acentuada quando comparada a fase adulta, entretanto, os pacientes são considerados mais graves e precocemente sintomáticos. A explicação biológica ou genética para essas diferenças patológicas entre as idades ainda não foi totalmente elucidada (Mina et al, 2013).

O LESj é considerado uma doença de diagnóstico desafiador (Gheith, 2017), uma vez que se assemelha com outras patologias e pode atingir graus variáveis de comprometimento aos órgãos e ocasionar diferentes danos que pode por em risco a vida do indivíduo (Gergianaki and Bertias, 2018). Durante o curso da doença, os pacientes podem entrar em fases de inatividade dos sintomas clínicos e, posteriormente, apresentar surtos repentinos da doença (Crampton, S. P., Morawski, P. A., & Bolland, S., 2014).

De acordo com os paradigmas atuais, o lúpus é desencadeado em pessoas geneticamente suscetíveis a certos fatores ambientais e, somados a estes, as modificações epigenéticas acabam por mediar os efeitos desse ambiente sobre as respostas imunológicas (Costenbader et al, 2012). Além disso, outros fatores também contribuem para o desencadeamento dessa enfermidade, tais como os hormonais, onde mulheres com LES, por exemplo, podem apresentar alteração à resposta das células B, indispensáveis para a produção de anticorpos (Grimaldi, 2006). Quanto a questões ambientais, o LES pode ser desencadeado devido à exposição a luz ultravioleta (UV), que estimula queratinócitos, levando a ativação de células B e produção de anticorpos. Além disso, fatores podem intensificar a atividade de células T e gerar uma produção adicional de autoanticorpos. As infecções por vírus como o vírus Epstein-Barr (EBV) também tem sido associado ao início da doença em crianças (Maidhof and Hilar, 2012).

Webb et al (2011) observou que as características mais graves observadas no LESj em relação ao LESa podiam estar associadas a um maior risco genético da doença. O estudo analisou 19 loci de susceptibilidade já conhecidos ao LES e encontraram uma diferença significativa no número de portadores de alelos de risco entre os pacientes com LESj comparados aos LESa. Pacientes juvenis tinham uma doença mais severa com maior odds ratio (OR) para proteinúria, rash malar, anticorpo anti-DNA, anemia hemolítica, artrite e leucopenia (OR = 3,03, 2,13, 2,08, 2,50, 1,89, 1,53 respectivamente) quando comparados aos pacientes adultos ( $p < 0,0001$ , 0,0004, 0,0005, 0,0024, 0,0114, 0,045, respectivamente). Os autores concluíram que existe um aumento no número de loci de susceptibilidade genética associado ao diagnóstico da doença na infância.

## 2.2 EPIDEMIOLOGIA DO LESJ

Para determinar a prevalência do LESj, deve-se levar em consideração o gênero, idade, etnia e região geográfica já que tais aspectos influenciam o resultado. De acordo com Bernatsky (2007), a incidência do LESj observada em uma população canadense, variou entre 0,36 e 0,9 por 100.000 em comparação com 3,0 em 100.000 indivíduos para LESa. A relação entre meninas e meninos muda de 4:3 com o início da doença no decorrer da primeira década de vida para 4:1 durante a segunda década. Pelo fato de ser uma doença predominantemente feminina, estudos apontam para a influência de fatores hormonais no desencadeamento da doença. A produção de substâncias com elevada atividade estrogênica e redução no andrógeno em mulheres com LESa é relatada e sugere um efeito estrogênico mais duradouro e severo nas pacientes (Zimmermann, 1997).

Além de saber que a questão hormonal influencia claramente na incidência, existem também questões étnicas e ambientais. Em crianças menores de 16 anos, da região da Europa e América do Norte, a incidência equivale a 1 a cada 100.000 indivíduos, já em Taiwan o LES juvenil é estimado em 6,3 a cada 100.000 indivíduos (Huemer et al, 2001; Huang and See, 2004). No Brasil não existem, até o momento, relatos sobre a incidência da doença. Os únicos dados fornecidos foram no estado do Rio Grande do Norte, em 2002, com pacientes maiores de 15 anos, onde foi obtido a incidência de 8,7 por 100.000 habitantes/ano (Vilar and Sato, 2002) e no Paraná, sul do Brasil, com incidência de 4,8 casos por 100.000 habitantes/ano (Nakashima et al, 2011). Tal incidência pode ser devido a fatores étnicos e / ou ambientais do local, visto que o Brasil é um país miscigenado e diferentes condições climáticas.

Quanto a questão étnica, existe uma maior incidência em indivíduos de etnia negra que não vivem no continente africano, enquanto que aqueles que residem na África apresentam menor incidência da doença em adultos (Olowu, 2007). Porém, dados étnicos no LESj ainda necessitam de estudos e sabe-se apenas que a etnia, o sexo e o nível socioeconômico parecem influenciar no prognóstico dessa doença (Drenkard and Alarcón, 2000).

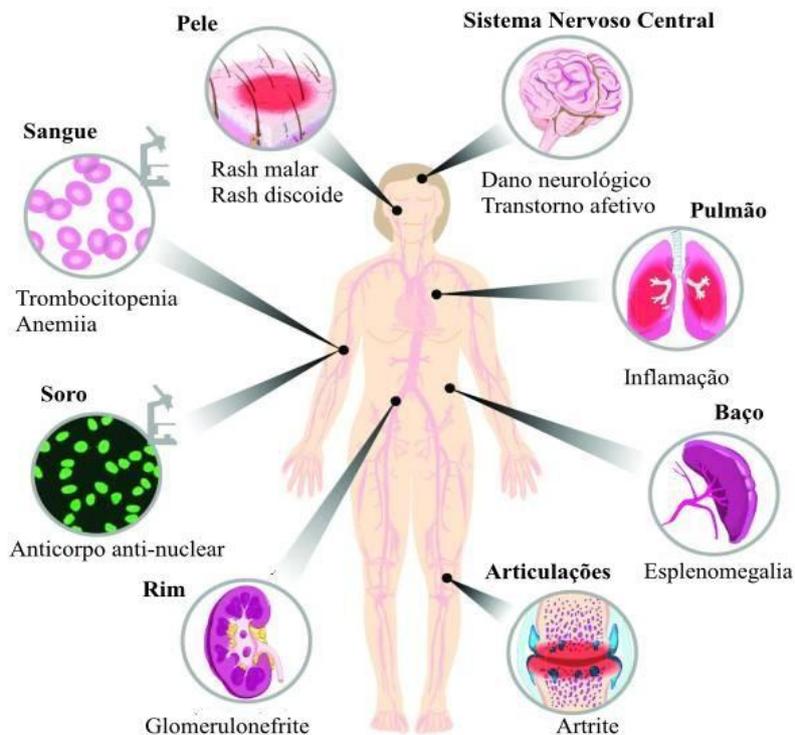
### 2.3 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DO LESJ

O desenvolvimento do LESj é constituído por fases. Primeiramente, o sistema imunológico está em equilíbrio, porém o indivíduo é geneticamente predisposto à autoimunidade. Posteriormente, a alteração imune desencadeia, mas as manifestações clínicas da doença ainda não são visíveis e definitivas. Entretanto, no decorrer dos meses ou anos, os autoanticorpos e células anormais tendem a aumentar, em seguida os sintomas começam a aparecer, e assim, o diagnóstico é dado (Tóbon et al, 2012).

A doença crônica pode ser compreendida em três etapas sendo a primeira etapa a fase de crise, em que os sintomas antecedem o diagnóstico, fase crônica, no qual pode ser de curta ou longa duração que indica o percurso do tratamento e a fase terminal, em que os cuidados são paliativos e a morte é inevitável (Rabuske, 2004). A mortalidade dos pacientes com LESj é cerca de 3 a 5 vezes maior do que a população geral e a atividade inflamatória da doença está relacionada à suscetibilidade a infecções graves como também às complicações derivadas da própria doença e complicações inertes devido ao tratamento (Picon et al, 2013).

A gravidade dos sintomas é variável podendo ser aditivos ou sequenciais, cíclicos ou persistentes, agudos ou crônicos e variar quanto ao tempo, podendo estar em atividade ou inatividade. A inatividade não é padronizada, esta pode variar de semanas, meses ou até anos e, além disso, o paciente pode progredir com o aparecimento de novos sintomas (Robinson et al., 2011). Inicialmente a doença pode exibir sintomas gerais inespecíficos como mal-estar, perda de peso, cansaço, febre baixa e, posteriormente, evoluir para manifestações cutâneas e articulares, assim como, alterações hematológicas e imunológicas (Assis and Baaklini, 2009). O envolvimento dos órgãos são os mais comuns encontrados no lúpus, mas nem todos os pacientes necessariamente apresentam em sua totalidade tais comprometimentos (Figura 1) (Crampton, S. P., Morawski, P. A., & Bolland, S., 2014)

O LESj possui alterações imunológicas e clínicas com um caráter mais agressivo e com altas taxas de morbidade quando comparados aos pacientes na fase adulta (Brunner et al., 2008; Malattia and Martini, 2013; Okuda and Santos, 2016). Por causa da maturação dos órgãos que se dá com o tempo em crianças, tanto o LESj como outras patologias, tendem a obter características clínicas mais complexas em faixas etárias menores. Poucos estudos tratam a questão de como as manifestações clínicas de LESj mudam a depender da idade de início da doença (Zhu and Huang, 2013).



**Figura 1 Envolvimento dos múltiplos sistemas no lúpus eritematoso sistêmico.** Presença dos anticorpos antinucleares no soro é uma característica do lúpus. Clinicamente, a inflamação no lúpus pode afetar a pele (erupções cutâneas), o sistema nervoso central (distúrbios neuropsiquiátricos), os pulmões (serosite), as articulações (artrite) e os rins (glomerulonefrite). Distúrbios do sangue, como anemia e trombocitopenia, também podem estar presentes. A hiperproliferação das populações imunes pode levar a um aumento do baço (esplenomegalia). Fonte: Crampton, S. P., Morawski, P. A., & Bolland, S. (2014).

Na adolescência com o aumento dos níveis de hormônios, estrógeno e progesterona, a doença começa a adquirir algumas características como a observada em adultos como, por exemplo, o envolvimento do sistema cardiovascular. O estrógeno tem sido associado a um estímulo de células T e B, macrófagos e produção de citocinas, assim como a progesterona também afeta a produção de autoanticorpos e níveis elevados de prolactina tem sido associado a crises da doença (Maidhof and Hilar, 2012). Frequentemente essa faixa etária possui alta atividade da doença e precisam ser tratados efetivamente o mais cedo possível (Maidhof and Hilar, 2012).

O LESj gera limitações no desenvolvimento da criança, pois no decorrer das crises o paciente pode ficar impossibilitado de se movimentar, sofrer fortes dores no corpo e cansaço (Bernardes, 2011). Manchas avermelhadas no rosto

conhecidas como rash malar, além de alopecia, dores de cabeça constantes, alterações renais como a nefrite e crises convulsivas são os sinais mais evidentes no LES juvenil, além de febre, comprometimento renal e cutâneo, vasculite e altos níveis de anticorpos anti-dsDNA e baixos níveis de proteínas do sistema complemento (Filipa and Rocha, 2010; Bernardes, 2011). As manifestações clínicas nos pacientes com LESj assim como suas frequências são demonstradas na tabela 1 (Malattia and Martini, 2013).

<b>Características clínicas</b>	<b>LESj</b>	<b>LESa</b>
<b>Febre</b>	20–67%	43–55%
<b>Linfadenopatia</b>	6–36%	0–1%
<b>Erupção de Malar</b>	22–79%	35–59%
<b>Lúpus discoide</b>	0-19%	3–29%
<b>Úlceras orais</b>	9–49%	13–40%
<b>Fotossensibilidade</b>	23–53%	20–57%
<b>Artrite</b>	22–88%	67–94%
<b>Nefropatia</b>	67–82%	33–53%
<b>Pericardite</b>	16–26%	13–33%
<b>Pleurite</b>	6–48%	6–33%
<b>Doença neuropsiquiátrica</b>	15–95%	33–60%
<b>Leucopenia</b>	46–64%	41–57%
<b>Trombocitopenia</b>	25–37%	6–25%
<b>Anemia Hemolítica</b>	10–76%	3–13%

**Tabela 1 Características clínicas do LES de início pediátrico e de início na idade adulta.**  
Fonte adaptado de Malattia and Martini, 2013.

### 2.1.1 Manifestações renais

O LESj apresenta, com mais agressividade, danos renais em contrapartida aos adultos (Mina and Brunner, 2013). O envolvimento renal demonstrado por anomalias urinárias ou função renal alterada está presente em 37-82% das crianças (Szymanik-Grzelak et al., 2016). Aproximadamente 90% dos pacientes com LESj chegam a desenvolver nefrite lúpica (NL), sendo que esta característica comumente aparece após 2 anos do início da doença (Malattia and Martini, 2013).

As crianças com LES tendem a ter mais facilmente a nefrite acompanhada por hipertensão arterial sistêmica, febre, linfadenopatia, manifestações de pele e articulares e o tratamento com imunossupressores torna-se mais frequentes, levando a um maior acúmulo de danos (Bertsias et al., 2012).

A nefrite é uma inflamação glomerular em que imunocomplexos são formados devido ao excesso de anticorpos que se acumulam nos rins, sendo consequentemente detectado pelo sistema complemento que inicia uma cascata de ativação envolvendo o recrutamento de monócitos e granulócitos para o local e uma possível destruição do tecido (Crampton, S. P., Morawski, P. A., & Bolland, S. 2014). Apesar da evolução no tratamento, a NL continua sendo uma das principais causas de morbidade e mortalidade em crianças (Bogdanovic et al., 2004) e cerca de 10 a 60% requer o tratamento de substituição renal (Drakoulogkona, et al., 2011).

O tratamento da NL consiste na utilização de imunossupressores para que haja diminuição dos danos aos néfrons quando a doença está ativa e prevenção de novos surtos enquanto o paciente estiver na fase de manutenção a longo prazo (Chan, 2015).

### **2.1.2 Manifestações cutâneas**

As lesões de pele começam geralmente com lesões simétricas, pequenas, discretas e eritematosas principalmente no rosto, onde irá ocasionar escamas finas que com o tempo se torna confluyente (Kuhn and Landmann, 2014). Alguns pacientes podem ser acometidos por erosões e ulcerações da cavidade oral e/ou nasal acompanhada frequentemente por edema facial (Werth, 2005).

As manifestações cutâneas levam a um diagnóstico do LES por quatro sinais visíveis: rash malar, fotossensibilidade, rash discoide e alopecia. O rash malar é caracterizada por uma erupção eritematosa nas bochechas e na ponte nasal, sendo geralmente dolorosa (Cojocarú et al., 2011) como ilustrado na Figura 2 (Yun and Stein, 2015). Quanto à fotossensibilidade, esta se faz presente na maioria dos pacientes que apresentam exacerbação incomum de erupção cutânea e é um dos sintomas aparentes após exposição solar. As lesões discóides também podem surgir em áreas do corpo que ficam expostas ao sol, ocasionando obstrução folicular e cicatrizes.

De todos esses sinais cutâneos, as erupções inflamatórias, incluindo o rash malar são mais comuns no LESj. O rash discóide é incomum na infância, com menos de 5% de casos registrados em crianças menores de 15 anos de idade e a fotossensibilidade passa a ser característica mais presente em LESa (Mina and Brunner, 2010).



**Figura 2 Rash malar.** O eritema facial agudo no rash malar aparece como placas eritematosas com escamas. Fonte: Yun and Stein, 2015.

### **2.1.3 Manifestações neurológicas e articulares**

Alterações neuropsiquiátricas apresentam um curso clínico mais agressivo e frequente em LESj quando comparado a LESa, ocasionando até maiores taxas de morbidade e mortalidade. A incidência de sintomas neuropsiquiátricos está presente em cerca de 14%-75% de todos os casos do LESj. Cerca de 70% dos juvenis desenvolvem alterações do sistema nervoso no primeiro ano após o diagnóstico inicial e o reconhecimento precoce é crucial para prevenir possíveis sequelas neurológicas que possam afetar a vida do paciente (Khajedadeh, 2018).

### **2.1.4 Alterações imunológicas do LES**

Para que o LES venha a se desenvolver, inicialmente os fatores hormonais, ambientais e genéticos, diminuem a tolerância imunológica e ocasionam um aumento de anticorpos antinucleares (ANA) resultando em um repertório autoimune aumentado que finalmente atingem órgãos alvos e ocasiona dano ao tecido (Pathak and Mohan, 2011).

O LES então caracteriza-se pela presença de autoanticorpos direcionados a antígenos nucleares e, desta forma, a atividade inflamatória é exacerbada. Presume-se que diversos fatores ambientais e genéticos contribuem para levar a

um colapso na tolerância dos linfócitos que então se propagam e fazem com que inúmeros autoanticorpos sejam formados (Mudd, et al., 2006).

Vale salientar que ocorrem outros lapsos no que se refere a imunidade do LES e a etiologia não está elucidada por completo. Sabe-se que a fagocitose, a atividade de apoptose das células não funciona corretamente, ocasionando constantemente o acúmulo de antígenos e formação de autoanticorpos que pode perdurar por anos, antes mesmo do aparecimento dos primeiros sintomas da doença (Tiffin et al. 2013).

A pesquisa do fator antinuclear (FAN) é importante para confirmar a suspeita clínica da doença. No LES, a presença elevada dos ANA é considerada alicerce básico para o desenvolvimento da doença. O FAN positivo é considerado um marcador no diagnóstico dessa doença e possui um papel patogênico efetivo, já que o dano causado ao tecido é promovido ou por complexos imunes depositados ou por anticorpos citotóxicos que tem uma reatividade antinuclear (Vargas and Romano, 2009).

O anticorpo mais frequente nos pacientes com LES é o anti dsDNA. Este pode atingir a dupla fita de DNA ou agir contra a fita simples. Além deste, existem ainda os anticorpos antinucleossomos que tem por finalidade atacar proteínas que fazem parte da constituição do nucleossomo (Vargas and Romano, 2009). Os complexos eventos imunológicos que levam ao aparecimento de autoanticorpos ainda hoje não é completamente compreendida (Costenbader et al, 2012).

## 2.4 CRITÉRIOS PARA CLASSIFICAÇÃO DO LESJ

O LES é visto como “grande imitador” pelo fato de se assemelhar sintomaticamente com outras doenças. Um diagnóstico adequado de LES requer que quatro parâmetros ligados a estes fenótipos sejam satisfeitos, em que pelo menos um é clínico (por exemplo, a presença de uma erupção malar) e um é imunológico (por exemplo, positividade para anticorpos antinucleares do soro) (Crampton, S. P., Morawski, P. A., & Bolland, S., 2014). Por esse motivo, a fim de ter um diagnóstico preciso, o Colégio Americano de Reumatologia (ACR) desenvolveu em 1971 um modelo que se baseasse tanto em critérios clínicos como laboratoriais para o diagnóstico da doença, sendo revisado em 1982 e novamente em 2002 para uma melhor adequação (Stichweh and Pascual, 2005).

Os critérios que foram gerados são divididos em onze, dos quais, no mínimo quatro precisam estar evidentes no paciente, e dentre estes é necessário que se tenha pelo menos um critério clínico e um imunológico envolvidos, ou ainda, apresentar biópsia que comprove a nefrite lúpica na presença de anticorpos antinuclear (ANA) ou anti-dsDNA, pois são estes considerados marcadores do LES (Quadro 1) (Tan et al, 1982; Hochberg, 1997; Petri et al, 2012).

Durante o curso do LES, os pacientes podem passar por períodos de atividade e inatividade da doença.. Para se estabelecer esses períodos de atividade/inatividade da doença são utilizados alguns índices como o SLEDAI (Systemic Lupus Erythematosus Disease Activite Index). Este avalia o curso da doença e inclui 24 itens, entre os quais 16 são destinados a parâmetros clínicos e 8 para parâmetros laboratoriais. Tais itens englobam manifestações que acometem o sistema neurológico, esquelético, renal, cardíaco, respiratório,

vascular, hematológico e muco cutâneo, atribuindo a cada um uma pontuação de 1 a 8 pontos a depender do sintoma. Este método foi validado também para uso em pacientes com LESj e é sensível a fatores clinicamente importante como, por exemplo, mudanças na atividade dessa enfermidade (Brunner et al,2002).

<b>Crítérios</b>	<b>Especificações</b>
<b>1. Rash malar</b>	Eritema fixo, plano ou levantado, proeminência malar, sem afetar as dobras nasolabial
<b>2. Rash discoide</b>	Placas eritematosas elevadas, descamação queratótica aderente; cicatriz atrófica pode ocorrer em lesões antigas
<b>3. Fotossensibilidade</b>	Erupção cutânea como resultado da reação incomum à luz solar, pela história ou observação médica
<b>4. Úlceras orais/nasofaríngeas</b>	Normalmente indolor, observado pelo médico
<b>5. Artrite não erosiva</b>	Envolvendo duas ou mais articulações periféricas, caracterizada por dor, inchaço ou derrame.
<b>6. Serosite</b>	Pleurite ou pericardite
<b>7. Alterações renais</b>	Proteinúria $\geq 0,5g/24h$ , cilindros celulares com glóbulos vermelhos, hemoglobina, granular, tubular ou misto.
<b>8. Alterações neurológicas</b>	Convulsões ou psicose (na ausência de medicamentos ofensivos ou alterações metabólicas)
<b>9. Alterações hematológicas</b>	Anemia hemolítica ou leucopenia $< 4.000/mm^3$ em duas ou mais ocasiões ou linfopenia $< 1.500/mm^3$ em duas ou mais ocasiões ou trombocitopenia $< 100.000/mm^3$ na ausência de outra causa.
<b>10. Alterações imunológicas:</b>	Anticorpos anti-DNA ou anti-Sm positivo ou presença de anticorpos antifosfolípidios com base em: a) níveis anormais de IgG ou IgM anticardiolipina; b) teste positivo para anticoagulante lúpico; ou c) teste falso-positivo para sífilis por, no mínimo, seis meses.
<b>11. Anticorpos antinucleares</b>	Valores elevados

**Quadro 1 Critérios revisados para a classificação do lúpus eritematoso sistêmico de acordo com a Colégio Americano de Reumatologia.** Fonte: HOCHBERG, 1997; STICHWEH and PASCUAL, 2005.

A somatória final resulta em um escore que pode corresponder de 0 a 105 pontos. Quando o valor do SLEDAI corresponde a 0 o paciente está inativo, de 1-5 pontos considera-se em uma atividade de nível leve, de 6-10 atividade

moderada, entre 11-19 alta atividade e uma atividade muito intensa são valores igual ou maiores que 20 (Abrahamowicz et al, 1998; Gladman et al, 2002; Castrejón et al, 2014)

## **2.5 TRATAMENTO PARA O LESJ**

Estudos sugerem que o diagnóstico e o tratamento precoce do LES podem aumentar a taxa de remissão da doença e ainda melhorar o prognóstico do paciente (Doria et al., 2010). Testes de anticorpos antinucleares tem se tornado uma prática rotineira em laboratórios e, dessa forma, o tempo de latência entre o início e o diagnóstico da doença tem diminuído. Entretanto, sabe-se que os anticorpos aparecem antes mesmo das manifestações clínicas da doença, assim não é possível ainda prever quais indivíduos serão positivos para o desenvolvimento dessa enfermidade (Doria et al., 2010).

Para um tratamento do LESj, é necessária uma equipe multidisciplinar que deva orientar na dieta da criança, no desenvolvimento de uma atividade física adequada, além de acompanhamento psicológico (Okuda and Santos, 2016). As recomendações gerais para todos os pacientes incluem proteção solar, dieta e nutrição adequada, não fumar, além de imunizações apropriadas. Em relação ao pacientes com LESj leve a moderado, agentes antimaláricos e corticosteróides são usados primeiramente a fim de tratar os sintomas e à medida que a doença se agrava. Doses maiores de corticosteroides e agentes imunossupressores, tais como azatioprina, metotrexato, ciclofosfamida, micofenolato mofetil e rituximabe, são usados de acordo com as manifestações clínicas com o objetivo de controlar os sintomas da doença (Levy and Kamphuis, 2012; Okuda and Santos, 2016; Maidhof and Hilas, 2012).

## 2.6 EPIGENÉTICA E ETIOPATOGENESE DO LES

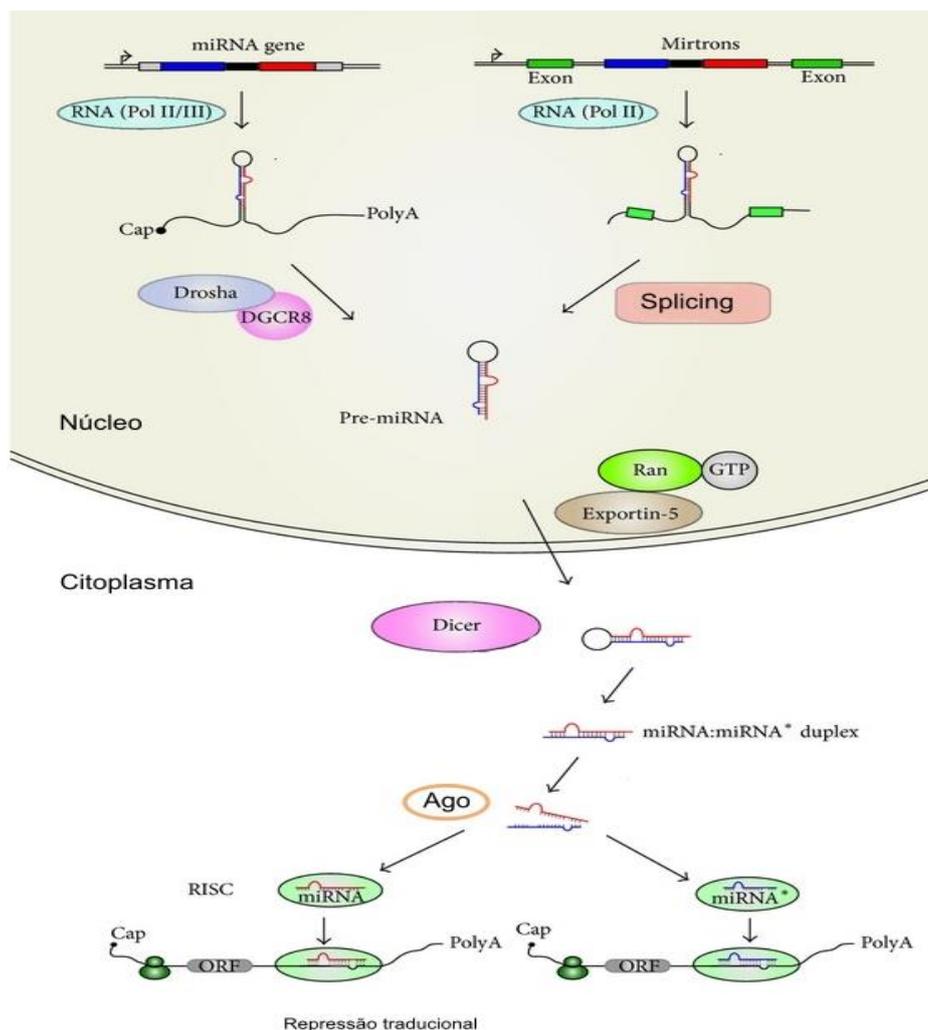
A patologia do LES é interligada com uma rede complexa de fatores ambientais e susceptibilidade genética. Essa interação conseqüentemente leva a perda da tolerância imunológica e como resultado ocorre a produção de autoanticorpos. Geneticamente, o LES decorre de polimorfismos que predispõem o indivíduo à susceptibilidade e diversos fatores auxiliam no desencadeamento dessa doença (Munoz, L. E., et al., 2010; Pinheiro, S. V. B., et al, 2018).

Recentemente, modificações epigenéticas tem tido destaque na compreensão dos mecanismos que podem ajudar no desencadeamento de doenças autoimunes (Hedrich and Tsokos, 2011). Essas modificações se referem a mudanças reversíveis e, por vezes hereditárias, sem alterações no código genético (Renaudineau and Youinou, 2011), podendo ser provocados, por exemplo, por fatores ambientais (Costenbader et al, 2012). Dentre os principais mecanismos de regulação gênica está a metilação do DNA e modificações das histonas (Ooi et al, 2010). Já foi demonstrado que ambos processos desempenham um papel importante na patogênese do LES (Miao et al, 2014; Zhu et al, 2016).

Além destes mecanismos, pequenos RNAs não codificantes, conhecidos como miRNAs, tem ganhado um destaque na literatura científica devido ao seu importante papel na regulação da expressão gênica (Husakova, 2016). Historicamente, os miRNAs foram descobertos na década de 90 quando Victor Ambros e seu grupo de estudo descobriu que um gene regulador do desenvolvimento do nematóide *C. elegans*, denominado de Lin-4 não codificava proteína, entretanto expressava um pequeno RNA de aproximadamente 22 nucleotídeos. Mediante esse estudo, um novo mecanismo de regulação gênica foi

caracterizado, na qual a tradução do RNA mensageiro lin-14 foi inibida devido a ligação de uma pequena molécula de RNA no sítio 3'UTR do RNAm de lin-14 (Lee and Ambros, 1993). Assim, é visto que os miRNAs se tratavam de RNAs não codificantes formados por cerca de 21 a 25 nucleotídeos (Lashine et al., 2011) e sua principal função é a regulação pós-transcricional de RNAs mensageiros ligando-se a região 3' não traduzida (UTR) degradando-o ou ainda bloqueando a tradução da proteína (Pauley et al, 2009; Hedrich and Tosokos, 2011, Bartel, 2004).

Os genes que codificam os miRNAs estão localizados em regiões intrônicas, intergênica e dentro dos éxons, em humanos, especificamente a maioria está localizado em regiões intrônicas, apesar de existir exceções (Schmittgen, 2008). O processo de biogênese do miRNA é dividido em várias etapas que se inicia no núcleo e termina no citoplasma da célula como ilustrado na Figura 3.



**Figura 3. Biogênese do miRNAs e os mecanismos de inibição da síntese proteica.** Os genes de miRNA são transcritos pela RNA polimerase II (Pol II) ou RNA polimerase III (Pol III) para produzir os transcritos primários de miRNA (pri-miRNA). A clivagem de pri-miRNAs é mediado pelo complexo Drosha-DGCR8 que gera miRNAs precusores de 60-70 nt (pré-miRNAs). Depois de exportados pela exportina-5 a partir do núcleo para o citoplasma, os pré-miRNAs são processados em ~ 22 nt miRNA/ miRNA\* pelo complexo Dicer. Finalmente, os miRNAs maduros são carregados em proteínas Argonata, levando à clivagem ou degradação dos genes alvo. No caminho do mirtron, os introns contendo miRNA, chamados de mirtrons, são ligados e desmembrados em pré-miRNAs que contornam o processamento da enzima Drosha. Posteriormente, os pré-miRNAs derivados do íntron entram a via do miRNA canônico durante a exportação nuclear e, em seguida, são processados pelo Dicer e carregados nas proteínas Argonata. O miRNA maduro ligado ao RISC reprime ou inibe a síntese de proteínas pela clivagem (quebra) de RNAs mensageiros (RNAm) ou pode impedir a leitura do RNAm (impedir a tradução) inibindo a produção de proteínas. Adaptado GAO et al., (2014).

Primeiramente, no núcleo é realizada a transcrição por meio da RNA polimerase II, raramente pela RNA polimerase III e assim é formado o miRNA primário (pri-miRNA). É no pri-miRNA que se encontra a sequência do miRNA maduro e este pode ser formado por vários pares de bases de comprimento

apresentando suas estruturas formadas pela CAP 5' 7-metilguanossina e na 3' a cauda poliadenilato (cauda poli-A) e pode sofrer splicing, semelhante a um RNA mensageiro. Este frequentemente contém sequências para vários miRNAs diferentes (Filipowicz et al, 2008).

O pri-miRNA exibe uma estrutura secundária complexa, em forma de grampo que é constituído por uma fita dupla com bases complementares, conhecida como região *stem* e uma alça com bases não complementares, chamada de região *loop* além das sequências flanqueadoras (Bartel, 2004). Posteriormente, o pri-miRNA será processado, ainda no núcleo, por um complexo nuclear chamado de ribonuclease III Drosha que juntamente com seu cofator, DGCR8, proteína de domínio de ligação ao RNA de dupla fita, produzem o pré-miRNA (Hedrich and Tsokos, 2011). O pré-miRNA, agora contendo cerca de 70 nucleotídeos e com estrutura de dupla fita é exportado para o citoplasma por meio da exportina-5 e a Ran-GTP (Singh et al., 2008).

Uma vez no citoplasma, o pré-miRNA é processado por uma segunda ribonuclease, a enzima *Dicer*, também participante da família das RNases II, na qual remove a estrutura *stem-loop* e forma um dúplex de RNA contendo cerca de 20 a 22 pares de bases (Filipowicz et al, 2008). O duplex formado segue para ser incorporado ao complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC) e uma vez ligada a esse complexo, apenas uma destas fitas permanece no complexo tornando-se um miRNA maduro e a outra fita, denominada de miRNA\* normalmente degradada (Schmittgen, 2008; Singh, et al. 2008; Amaral et al., 2010). Pesquisas revelaram que os miRNAs\*, também estão presentes em um nível relativo e também podem ter a capacidade de silenciar alvos antes de serem degradados (Okamura et al., 2008).

Antes dele atuar sobre o alvo, o miRNA maduro será incorporada a proteína Ago, participante da subfamília Argonauta, por meio de processo dependente de ATP e com ajuda de duas chaperonas Hsc70 e Hsp90. A partir disso, o miRNA poderá se ligar a região 3' UTR do mRNA alvo havendo um pareamento de bases imperfeito e conseqüentemente acarreta na degradação do alvo, terminação prematura da tradução ou inibição do início da tradução (Gu et al., 2009; Pauley et al., 2009; Gao et al., 2014).

Desde que os miRNAs foram descritos em 1993, estes passaram a ser identificados como contribuintes na regulação de inúmeros processos celulares, como por exemplo, diferenciação celular, proliferação, apoptose e homeostase metabólica (SUN et al., 2012; CHEN, 2014). Os miRNAs também são conhecidos por desempenhar um papel importante na regulação das funções imunológicas, assim como na prevenção de autoimunidade (Teruel and Alarcón-Riquelme, 2016). Porém, níveis desregulados de miRNAs vêm sendo associado a uma lista crescente de doenças, tais como as doenças autoimunes (Zhou, 2008; Zhao, et al., 2010; Teruel and Alarcón-Riquelme, 2016).

Muitos estudos têm também demonstrado que a inflamação e a desregulação imunológica, presente em doenças autoimunes, têm sido associadas a alteração a expressão de miRNAs (Ceribelli et al., 2011; O'connell et al., 2012; Dai and Ahmed, 2011; Husakova, 2016; Heegaard et al., 2015). Estes pequenos RNAs podem ser expressos de forma exacerbada mesmo em diferentes estágios da doença e assim esses pequenos RNAs são considerados importantes biomarcadores que podem ajudar a entender a patologia, monitorar a atividade e os efeitos do tratamento da doença, como por exemplo o LES (Ceribelli et al., 2011).

### **2.6.1 miRNA e o LES**

Os miRNAs contribuem significativamente para a regulação da resposta imune tanto inata quanto adaptativa. Por esse motivo, estudos foram realizados a fim de verificar possíveis participações em processos imunes anormais como, por exemplo, no LES (Pekow and Kwon, 2011; Abulaban and Brunner, 2015; Husakova, 2016; SU et al., 2018) e em outras doenças reumáticas (Ceribelli et al., 2011). De fato, o potencial uso de miRNAs como biomarcadores em doenças reumáticas tornou-se um alvo de estudos nessa área de pesquisa, uma vez que, ao identificar os miRNAs que tem por alvo genes envolvidos em doenças reumáticas é possível avaliar suas consequências e compreender melhor os mecanismos moleculares responsáveis por essas doenças (Chen et al, 2014; Tili et al., 2008; Pauley et al, 2009; Alevizos, 2010).

Estudos posteriores foram sendo realizados para demonstrar a participação dos miRNAs na patologia do LES, avaliando a expressão dos miRNA em tecidos e/ou células mononucleadas do sangue periférico (PBMC) de pacientes e verificando quais possíveis miRNAs poderiam ser candidatos a biomarcadores candidatos (Liu et al., 2014; Husakova, 2016; Xu et al., 2017). No estudo de Liu e colaboradores (2013) cinco miRNAs foram relatados como sendo biomarcadores úteis para o LES, sendo eles: miR-146a, miR-21, miR-148a, miR-125a, miR-126, Tais miRNAs foram analisados em PBMC ou células T CD4<sup>+</sup> e o mais recente estudo foi desenvolvido por Su e colaboradores (2018), em que foi o pioneiro a mostrar que o miR-146a-5p é um biomarcador intracelular especificamente útil para o NL, independente dos níveis séricos de albumina e relação proteína / creatinina.

Em relação às pesquisas voltadas para a expressão de miRNAs no LESj, estas são mais escassas. Lashine e colaboradores (2011) analisaram por meio do método de PCR em tempo real a expressão do miR-181-a em 20 pacientes com LESj. Pela primeira vez, o miR181a foi analisado no LESj e teve sua expressão significativamente reprimida em comparação com os controles ( $p=0.0004$ ). Além disso, avaliaram o perfil de expressão desse miRNA em pacientes que apresentavam SLEDAI com escore maior que 10 com indivíduos saudáveis dando uma expressão reduzida nos pacientes ( $p=0,0026$ ) e da mesma forma entre pacientes com SLEDAI menor que 10 e indivíduos saudáveis, resultando na expressão reduzida do miR-181a também nos pacientes ( $p=0,188$ ). Posteriormente os mesmos pacientes foram comparados entre si, sendo um grupo composto por pacientes em atividade (SLEDAI  $>10$ ) e outro grupo com pacientes em remissão (SLEDAI  $<10$ ), chegando a verificar que a expressão do miR-181a foi reduzida nos pacientes em atividade ( $p=0,444$ ). Com essas descobertas, o miR-181a foi considerado como um miRNA importante para contribuir na patologia do LESj (Lashine et al, 2011).

No estudo realizado por Zhu et al (2014) que analisaram o mirRNA-629, mirRNA-525-5p e o mirRNA-516a-3p em 12 pacientes LESj, o nível de expressão dos miRNAs citados foram significativamente maior em pacientes com LESj antes de receber tratamento da doença do que em crianças saudáveis, porém os níveis de expressão passaram a ser normais quando os pacientes foram submetidos a um tratamento eficaz. Os autores concluíram que os níveis de expressão aumentados destes miRNAs, miRNA-629 ( $r=0,809$ ,  $p=0,000$ ), miRNA525-5p ( $r=0,776$ ,  $p=0,001$ ) e miRNA-516a-3p ( $r=0,792$ ,  $p=0,000$ ) estavam correlacionados com o escore do SLEDAI, mostrando que quando o paciente está em atividade da

doença, a expressão desses miRNAs está aumentada e quando os pacientes são tratados e entram em inatividade, conseqüentemente a expressão destes tornavam-se normais. Assim, tais pesquisadores acreditam que o monitoramento da expressão desses miRNAs podem ser usados para determinar a atividade do LESj na área clínica e todos os três miRNAs podem ser considerados biomarcadores para a atividade ou inatividade do LESj.

No que diz respeito ao NL em LESj, ainda é preciso haver pesquisas que indiquem possíveis biomarcadores. Nessa abordagem, já foram analisados cinco miRNAs sendo eles o miR-125a, miR-127, miR-146a, miR-150 e o miR-155, desses apenas o miR-125a, miR-150, miR-155 tiveram associação com o NL e o miR-146a apresentou não associado ao NL. Porém é necessária uma maior investigação desses miRNAs e de demais que poderiam ser candidatos a biomarcadores do LESj (Abulaban et al, 2016).

Muitos miRNAs são alvos de pesquisas para melhor elucidar o LESj. No Quadro 2 encontra-se os principais miRNAs que já foram estudados no LES.

### **2.6.2 *MiR-125b***

Vários miRNAs diferencialmente expressos já foram associados ao LES, mostrando-se capazes de modular a susceptibilidade à doença, bem como início, diversidade clínica e progressão desta (Husakova, 2016). O miR-125 é uma molécula altamente conservada em diversas espécies e consiste em três homólogos em humanos: hsa-miR-125a, hsa-miR-125b-1 e hsa-miR-125b-2. Os membros dessa família possuem funções controversas em diferentes tipos de doenças podendo, por exemplo, exibir funções ativadoras ou protetoras de acordo com o gene alvo.

	Adulto	Juvenil	Adulto e juvenil	Origem
<b>Expressão Induzida</b>	miR-223, miR-142-3p, miR-21, miR-181-a, miR-126, miR-21, miR-451, miR-16, miR-189, miR-61, miR-78, miR-342, miR-142-3p, miR-299-3p, miR-21, miR-25, miR-148a, miR-214, miR-148b, miR-494, miR-198, miR-155, miR-324-3p, miR-342, miR-373, miR-106b, miR-544, miR-64, miR-147, miR-160, miR-65, miR-120, miR-100, miR-194, miR-217, miR-173, miR-157	miR-629, miR-525-5p, miR-516a-3p		Plasma PBMC
<b>Expressão reprimida</b>	miR-150, miR-106a, miR-17, miR-20a, miR-203, miR-92-a, miR-125a-3p, <b>miR-125b-5p</b> , miR-155, miR-146, miR-196a, miR-17-5p, miR-409-3p, miR-141, miR-383, miR-112, miR-127-3p, miR-1271-5p, miR-1301, miR-136-5p, miR-379-5p, miR-381-3p, miR-382-5p, miR-758-3p, miR-1466-5p, miR-154-3p, miR-154-5p, miR-31-5p, miR-409-5p, miR-410, miR-421, miR-543, miR431-5p, miR-432-5p, miR-654-3p, miR-181a-2-3p, miR-337-5p, miR-376-3p, miR-376b-3p, miR-376c-3p, miR-485-3p, miR-487b, miR-493-5p, miR-495-3p, miR-539-5p, miR-31, miR-95, miR-99a, miR-130b, miR-10a, miR-134, miR-146, miR-41, miR-42, miR-27, miR-8, miR-21, miR-3, miR-40, miR-28, <b>miR-9</b> , miR-49, miR-296, miR-196c, let-17-5p, let-16, let-15a, miR-383, miR-184, miR-379, miR-150, miR-7a, miR-7d, miR-7g, miR-98, miR-832		miR-155	Plasma PBMC

**Quadro 2. miRNAs regulados diferencialmente em fluidos corporais e células mononucleares periféricas do LES.** miR - microRNA, PBMC - células mononucleares periféricas. Fonte adaptado de Husakova, 2016 e do próprio autor

O miR-125b é transcrito em dois loci localizados um na região cromossômica 11q23 (hsa-miR-125b-1) e outro na região 21q21 (hsa-miR-125b-2) (Tili et al., 2012). Várias ferramentas de predição de alvo podem ser usadas para compreensão destes. A partir de informações cedidas no TargetScan, por exemplo, é possível verificar que o gene do miR-125b-5p é composto por 1034 locais conservados e 448 locais não conservados, possui como sequência

madura: 5'-UCCCUGAGACCCUAACUUGUGA-3' e está envolvido na regulação negativa da angiogênese, na regulação positiva da diferenciação de células musculares lisas vasculares, habilita o silenciamento gênico pós-transcrição, inibe a tradução.

O miR-125b-5p, também já foi associado a alterações renais em um estudo com pacientes que apresentavam lesão obstrutiva renal, segundo pesquisa realizada por Wang e seus colaboradores (2017). Neste trabalho foram analisados três miRNAs (miR-125b, miR-326 e miR-324p) em 91 pacientes com lesão renal. De todos os miRNAs, o miR-125b-5p foi o que mostrou uma expressão significativamente menor quando comparado aos controles saudáveis. Esses resultados indicaram que há uma correlação mais forte do miR-125b-5p com a ocorrência de obstrução ureteral, especialmente para o sexo feminino ( $p = 0,0171$ ) e para os idosos ( $p = 0,0142$ ), sendo que esse miRNA passou a ser considerado um biomarcador em potencial para lesão renal obstrutiva (Husakova, 2016), entre várias outras atividades regulatórias.

Devido a esses achados, têm-se visto que o miRNA 125b-5p pode então servir como biomarcador para o diagnóstico de doenças renais (Wang et al, 2017). As mais recentes pesquisas que envolvem o miR-125b-5p em doenças autoimunes são restritas. Algumas pesquisas foram realizadas com o miR-125b-5p em doenças autoimunes, sendo em LESa (Cao et al, 2018; LUO, X. et al. 2013), uma em pacientes com diabetes tipo I (Satake et al, 2018) e outra em pacientes com acometidos com artrite reumatóide (Balzano et al, 2017).

No estudo realizado por Cao et al (2018) a partir de PBMC de pacientes com LESa, foi visto que o miR-125b apresenta uma expressão reduzida em relação a indivíduos saudáveis. Foi analisada também em cultura de célula,

desses mesmos pacientes, a expressão desse miRNA quando submetidos a uma irradiação ultravioleta. O resultado obtido foi que a irradiação UVB diminuiu o nível de expressão do miR-125b em PBMC de pacientes com LES, ou seja, a UVB leva a mudanças na expressão de miRNA, e conseqüentemente, levou a superexpressão do seu alvo, o gene *UVRAG*, o que então poderia induzir a ativação da autofagia. A partir desse estudo então, foi possível concluir que o miR-125b-5p pode inibir a ativação da autofagia ao regular um gene associado à resistência à radiação UV (*UVRAG*) e a radiação UVB regula positivamente a expressão do *UVRAG*. Assim, o miR-125b controla a ativação da autofagia em PBMC de pacientes com LES e é considerado um alvo terapêutico potente para o LES.

Já Satake et al (2018) analisaram a expressão do miR-125b-5p no plasma de pacientes com diabetes tipo I a fim de saber sua possível correlação com a variação da hiperglicemia nestes indivíduos. Os autores verificaram que o miR-125b-5p possui uma correlação positiva mais forte com a hemoglobina e que a desregulação deste miRNA pode contribuir para o desenvolvimento de complicações do diabetes. Na pesquisa de Balzano et al (2017), 28 pacientes com artrite reumatóide foram analisados e não apresentaram diferença significativa nos níveis de expressão do miR-125b-5p quando comparados a indivíduos saudáveis, enquanto que outros miRNAs vistos nessa pesquisa (miR-425-5p, miR-21-5p e miR-212-3p) tiveram sua expressão reprimida nessa doença.

Porém é preciso uma exploração ainda maior no que se refere a sua atuação no desencadeamento no LESj, principalmente, pois ainda não fora encontrada até o presente momento uma pesquisa que abordasse tal aspecto.

### 2.6.3 *miR-9-5p*

O gene do miR-9 é conhecido por apresentar diversos efeitos autônomos em células em múltiplos processos biológicos (Yuva et al, 2011). Em humanos pode ser categorizado como: hsa-miR-9-1, hsa-miR-9-2, hsa-miR-9-3. Possui como sequência 5'-UCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGA-3' e apresenta ao total 1580 locais conservados e 525 não conservados segundo o banco de dados do TargetScan.

O miR-9 está envolvido em diversos processos e vias biológicas importantes. O miR-9 desempenha um papel crítico no controle da função secretora de células produtoras de insulina (Plaisance, V., et al 2006), além de se apresentar menos expresso nas células de Hodgkin / Reed-Sternberg, interferindo assim na diferenciação terminal normal das células B e contribuindo para a patogênese do linfoma de Hodgkin (Nie K., et al, 2008).

Ao verificar para o processo de resposta imune, as contribuições que o miR-9 apresentou foram sua identificação como miRNA responsivo a estímulo de LPS em monócitos e em neutrófilos polinucleares humanos e a partir daí suportando a ideia que este pequeno RNA não codificante é induzido por LPS através da via MyD88 / NF- $\kappa$ B-dependente (BAZZONI, Flavia et al., 2009).

Até o momento, a expressão do miR-9 tem se correlacionado com diversos tipos de tumores (Guo et al, 2009; Saito et al, 2014; Nowek et al, 2018). Quando se trata de LES, somente recentemente foi relatada a participação deste miRNA na NL, como descrito na pesquisa de Xu et al (2017). O objetivo dessa pesquisa era avaliar a expressão do miR-9 na patologia do LESa e o seu alvo STK3. Como resultado foi visto que o miR-9 está positivamente correlacionado com o NL e que este possui uma regulação negativa do miR-9 com o STK3.

Além do descrito anteriormente, Chen e colaboradores (2014) também analisaram o miR-9. Nessa pesquisa, os estudiosos utilizaram o sequenciamento de nova geração para identificar microRNAs em 20 pacientes com LESa e 20 indivíduos saudáveis como grupo controle. Como resultado, a expressão do miR-9 foi reduzida nos pacientes com LESa em relação aos pacientes controle (FC = -1,67, p value  $\leq$  0.01).

Entretanto, nenhum estudo foi realizado em LESj, sendo assim, é necessário aprofundar mais sobre sua relevância nesta doença autoimune. O que se sabe é que o miR-9-5p, em particular, regula negativamente a adesão celular, a proliferação e diferenciação de osteoblastos e possui ligação direta com o *NFKB1*, sendo o gene desse localizado no cromossomo 4 como descrito adiante.

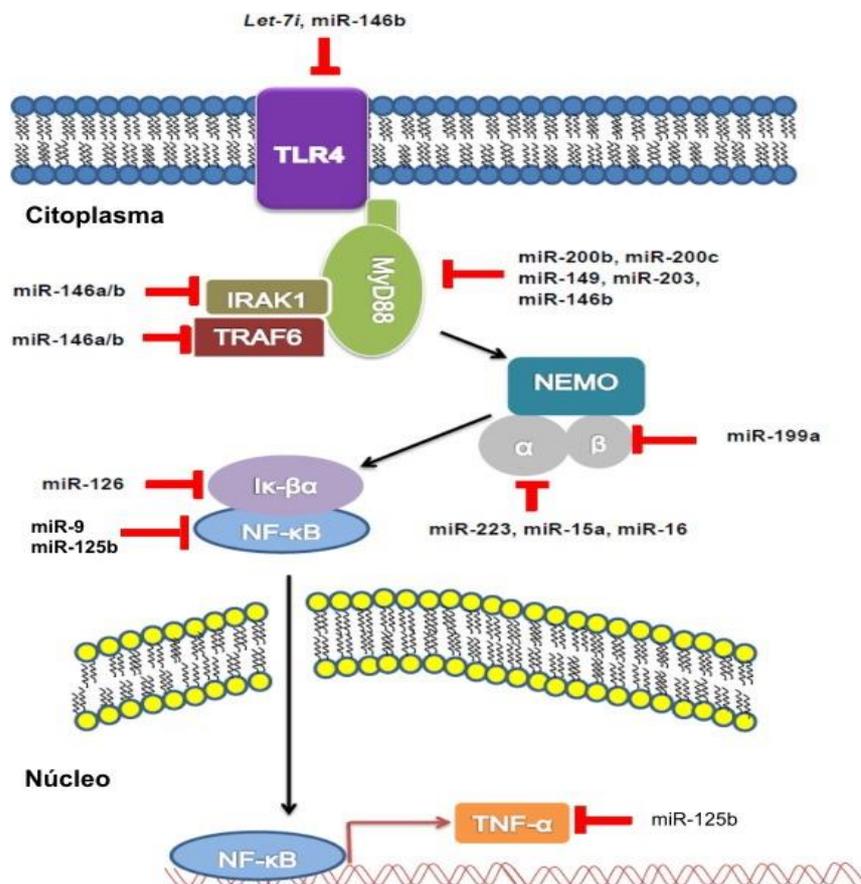
#### **2.6.4 Alvo NFKB1**

O NF- $\kappa$ B é um fator transcricional que é formado por dímeros proteicos de reticuloendoteliose (Rel), e assim, se liga a uma sequência de DNA conhecida como sítio  $\kappa$ B (Ma et al., 2011). A família proteica Rel é classificada em dois grupos na qual um requer processamento proteolítico, compreendendo *NFKB1* (p105 / p50) e o *NFKB2* (p100 / p52) e o outro não, que é compreendido pelo RelA, RelB e c-Rel. O *NFKB1* e *NFKB2* são processados para produzir as proteínas p50 e p52 (Ma et al., 2011; Cartwright et al, 2016). Estes são fundamentais para a ativação do NF- $\kappa$ B que está presente em quase todos os tipos celulares, sendo visto no ponto final de uma série de eventos de transdução de sinal que são então iniciados por uma variada quantidade de estímulos relacionadas a diversos processos biológicos (Murphy et al, 2010).

Tais processos compreendem desde crescimento e diferenciação celular, imunidade, inflamação a processos tumorais e apoptóticos. O NF- $\kappa$ B desempenha um papel importante na regulação da inflamação e a ativação desse alvo contribui para o aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, como por exemplo o TNF $\alpha$ , IL6 e IL12 (Murphy et al, 2010).

Pesquisas têm investigado e apoiado o papel dos miRNAs nas funções fisiológicas, tais como respostas inflamatórias, proliferação celular, morte celular e respostas imunes que também são conhecidas por serem reguladas pelo NF- $\kappa$ B como ilustrado na Figura 4 (Baud and Karin, 2009; Ma et al, 2011). Diversos miRNAs podem se ligar a ele e regular sua atividade ou participar indiretamente de suas vias, seja ativando ou inibindo-o (Boldin and Baltimore, 2012).





**Figura 5. Regulação da via do NF-κB pelos miRNAs confirmados no LES.** O TLR4 é regulado negativamente por *let-7i* e miR-146b. O MyD88 é regulado negativamente por miR-200b, miR-200c, miR-149 e miR-203 e miR-146b. IRAK1 e TRAF6 podem ser alvos da família miR-146. O IKK-α é regulado negativamente pelo miR-223, miR-15a e miR-16. O IKK-β é regulado negativamente pelo miR-199a. O IκBα é alvo do miR-126. A subunidade do NF-κB constituído pelo *NFKB1* é alvo do miR-9 e miR-125b. O TNFα é negativamente regulado pelo miR-125b. Fonte adaptado: Essandoh, and Fan, 2014.

### 2.6.5 Alvo TRAF6

O *TRAF6* é um membro da família do receptor de TNF (TRAF). As proteínas TRAF estão associadas ao processo de transdução de sinal por mediar as sinalizações dos membros dos receptores de TNF bem como a família Toll/ IL-1 (Walsh, M. C., Lee, J., & Choi, Y. 2015). Além disso, apresentam interação com várias outras proteínas quinases como IRAK1/IRAK que intimamente ligam vias de sinalização distintas e importantes para o funcionamento adequado do sistema

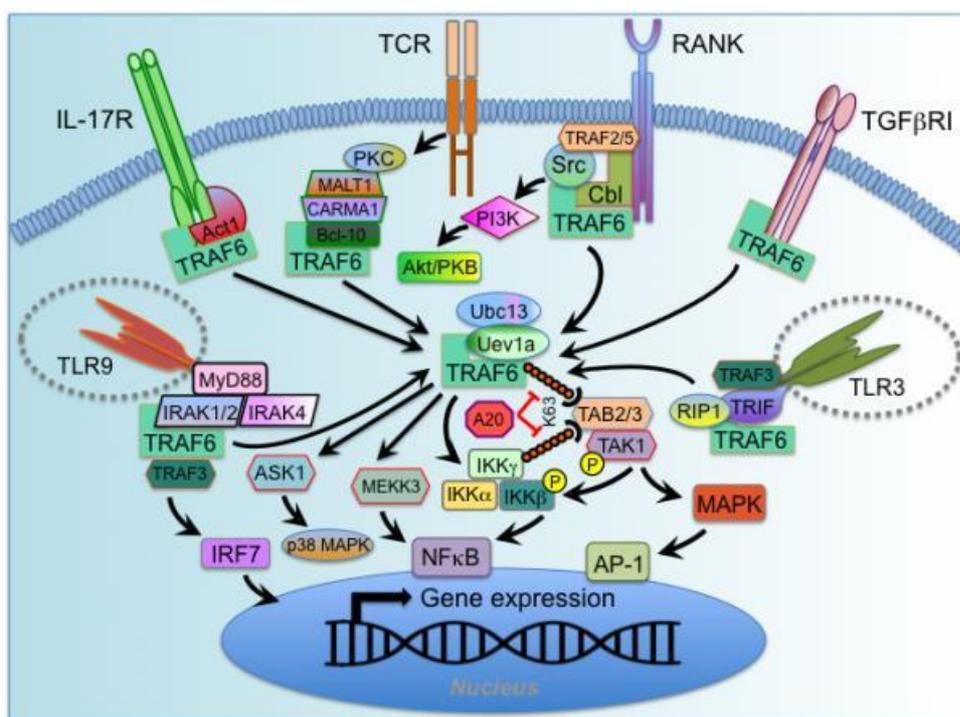
imune (Fu et al, 2018). O *TRAF6* é expresso em diversas células e contribui significativamente para o desencadeamento inflamatório dessas células especialmente em células T, macrófagos, células dendríticas (DCs), osteoclastos, mastócitos, células epiteliais, fibroblastos, micróglia, astrócitos e neurônios (Xie, P. 2013; Chung, J. Y., et al 2013).

É importante destacar que dentre as inúmeras interações que esse gene participa contribuindo com processo inflamatórios, uma delas é a via do NFκB que pode ativar as citocinas pró-inflamatórias (Morgan, J. J., McAvera, R. M., and Crawford, L. J. 2019). O *TRAF6* é ativado pelo receptor de ambas as vias canônicas e não-canônicas do NF-κB, bem como a ativação das MAPKs e IRFs (Xie, P. 2013; Lalani., et al, 2018). Na Figura 6 é possível observar as principais vias de atuação do *TRAF6*.

O *TRAF6* já teve sua participação confirmada em diversos tumores, entre eles o câncer do colo do útero. Em um estudo realizado por Li e colaboradores (2019), o miR-146a regulou a função da diferenciação de células Th17 para modular o crescimento e a apoptose das células cancerígenas do colo do útero através da sinalização de NF-κB, visando o *TRAF6*. Os autores observaram que quando o miR-146a foi encontrado menos expresso, o *TRAF6* teve sua expressão aumentada e conseqüentemente modulou as células Th17, impedindo a proliferação celular e estimulando a apoptose da célula. Quando o miR-146a teve um aumento de expressão, o *TRAF6* foi regulado negativamente e como resultado as células se proliferaram sem controle e houve redução na apoptose.

Dessa forma, os pesquisadores concluíram que ao focar no *TRAF6*, o miR-146a pode funcionar como um oncogene no câncer do colo do útero através da diferenciação de células Th17 (Li, T., et al, 2019).

Estudos realizados tanto em humanos quanto em camundongos relataram a importância do *TRAF6* nas doenças inflamatórias, diabetes, doenças neurodegenerativas, hepatite, artrite e também LES (Lalani, A. I., et al, 2018). No LES em específico, esses estudos mostraram que este gene se encontra altamente expresso em pacientes com a doença (Chung, J. Y., et al., 2013; Walsh, M. C., Lee, J., & Choi, Y. 2015).



**Figura 6. Mecanismos de sinalização TRAF6.** Um esquema generalizado para transdução de sinal TRAF6 a jusante de várias famílias de receptores é representada. Fonte: (Walsh, M. C., Lee, J., & Choi, Y. 2015).

Diante do exposto, e levando em consideração que a atuação de miRNAs em genes que participam do processo inflamatório podem contribuir para o desencadeamento do LES, nossa hipótese é que a expressão dos miRNAs, miR-125b-5p e miR-9-5p, e dos seus genes alvo *NFKB1* e *TRAF6* teriam um nível diferente de expressão entre pacientes que estejam na fase ativa e inativa do LESj.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 TIPO DE ESTUDO E GRUPO AMOSTRAL

Trata-se de um estudo transversal e do tipo caso-controle. O grupo amostral foi composto por pacientes portadores de LESj, sendo 24 pacientes em estado inativo da doença, estes sendo determinados como controle da pesquisa a partir do SLEDAI  $\leq 4$  e 35 pacientes em atividade, sendo determinados como grupo caso. As amostras são de ambos os gêneros, com idades entre 6 e 23 anos e foram atendidos no Ambulatório de reumatologia pediátrica do Hospital das clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo (FMRP/USP) e no Ambulatório de reumatologia pediátrica do Hospital das clínicas de Recife localizado na Universidade Federal de Pernambuco (UFPE/HC).

#### 3.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO E DEFINIÇÃO DE GRUPOS

Como forma de inclusão, os pacientes precisavam: 1) Atender aos critérios de classificação do ACR atualizados no momento da coleta; 2) Terem sido diagnosticados com a doença antes dos 18 anos de idade para estão serem classificados como LESj; 3) Terem sido acompanhados pelos médicos reumatologistas dos hospitais parceiros na pesquisa. Atendendo a esse primeiro critério, os pacientes em seguida foram divididos em dois grupos: aqueles em atividade da doença com SLEDAI  $\geq 4$  e aqueles em período de inatividade com SLEDAI  $\leq 4$ . Os pacientes que se encontravam inativos na doença foram usados como referência nos resultados dessa pesquisa e os pacientes em atividade definidos como o grupo caso. Foram excluídos: 1) Os indivíduos com LESj que apresentaram mais de um tipo de patologia confirmada; 2), Aqueles que não

tenham dados clínicos e laboratoriais suficientes para categorizá-lo no grupo de pesquisa, como o valor do SLEDAI indeterminado.

### 3.3 AMOSTRAS BIOLÓGICAS

No total, nossa amostra constou de 59 pacientes com LESj, sendo 28 pacientes provenientes dos ambulatórios de Pediatria do HC/UFPE e 31 pacientes do HC/FMRP/USP. As amostras foram obtidas após coleta de 8 ml de sangue periférico de cada paciente em tubo de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e mantidos sobre refrigeração até a utilização do material biológico.

### 3.4 ESCOLHA DOS MIRNAS E PREDIÇÃO DE ALVO

Foram feitas pesquisas na literatura em geral para obter os miRNAs que já analisados no LES em geral. Após organizar uma tabela com esses miRNAs foram determinados critérios para escolha dos alvos do estudo: miRNAs ainda não investigados no LESj, mas que já haviam sido avaliados no LES adulto e que estavam associados a regulação de vias que desencadeiam processos inflamatórios. Para confirmação dos alvos preditos na literatura, foram usadas ferramentas computacionais que expõem alvos específicos de miRNAs, sendo eles: miRDB, targetscanhuman, GeneCards, TarBase e GeneMania.

### 3.5 ISOLAMENTO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (PBMC)

A coleta de sangue dos pacientes foi realizada em tubo EDTA e armazenada até a realização da extração do RNA por um intervalo de no máximo 1 hora. Primeiramente o isolamento de PBMC foi realizado com Ficoll-Paque

PLUS (GE Healthcare), um polissacarídeo hidrofílico usado para separar os componentes do sangue por densidade de gradiente de centrifugação.

O anel leucocitário foi então retirado e adicionado 750  $\mu$ L de tiocianato-fenol-clorofórmio (TRIzol) da Thermo Fisher Scientific, USA, para que possibilite extração de RNA mais rápida que a dos protocolos convencionais e garantindo a integridade do material (Sambrook, 2002). Em seguida, as amostras foram armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Para a extração do RNA, as amostras foram retiradas e descongeladas e foi feita a lise das células e homogeneização da solução com intensa pipetagem. Após o período de 5 minutos de incubação à temperatura ambiente, foram adicionados 150  $\mu$ L de clorofórmio, na qual solubiliza os lipídios permitindo a sua remoção. Os tubos foram agitados vigorosamente durante 15 segundos e incubados em temperatura ambiente por 3 minutos. As amostras foram centrifugadas à 12000 g por 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Após a centrifugação, a solução apresentou-se separada em uma camada inferior vermelha (fase de fenol/clorofórmio), uma interface e uma fase aquosa incolor na porção superior.

A fase aquosa, na qual o RNA está presente, foi transferida para um microtubo de 1,5 mL sendo adicionado, posteriormente, 375  $\mu$ L de isopropanol a 100% para a precipitação do RNA e seguindo-se a homogeneização. As amostras foram incubadas em temperatura ambiente durante 10 minutos e então centrifugadas a 12000 g por 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$

Após a centrifugação, um *pellet* no fundo do tubo ficou visível e o sobrenadante foi descartado. Para limpeza do *pellet* foi adicionado 750  $\mu$ L de etanol a 75% e posteriormente submetidas a suave agitação, para promover a remoção de reagentes na molécula de RNA. Em seguida, uma centrifugação de 7500 g por 5 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  foi realizada em tais amostras. Ao passar por essa

etapa, um sobrenadante foi visivelmente formado e descartado, deixando apenas as amostras abertas e invertidas para baixo em temperatura ambiente no decorrer de 10 minutos, a fim de permitir a evaporação de demais reagentes presentes. A seguir, as amostras foram hidratadas com 35  $\mu$ L de água livre de RNase e incubadas a 55 °C por 10 a 15 minutos no monobloco, e posteriormente congeladas a -20°C para serem usadas em tempo oportuno.

### 3.6 QUANTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS

A quantificação das amostras foi feita por meio da leitura em espectrofotômetro da Thermo Scientific (NanoDrop 2000 Spectrophotometer, Life Technologies) nos comprimentos de onda ( $\lambda$ ) de 260 e 280 nm. Trata-se de um espectrofotômetro UV-Vis de espectro total usado para quantificar e avaliar a pureza do material em estudo, utilizando 1 $\mu$ l de material para análise. O equipamento cede informações importantes quanto as razões que representam aquela amostra, além de apontar a concentração de ácido nucléico. As razões recomendadas devem estar entre 1.8 e 2.0. A razão 260/280 tem por finalidade apontar a taxa de contaminação por proteína em cada amostra. Os valores da razão 260/230 detecta a presença de reagentes tais como fenólicos, álcool, isopropanol, clorofórmio que de certa forma ocasionaram contaminação durante a extração.

### 3.7 SÍNTESE DE cDNA

Com o RNA extraído e quantificado, o passo seguinte foi a síntese de cDNA. Entretanto, para que essa etapa fosse realizada as amostras antes armazenadas agora precisavam ser diluídas para o uso, pois a concentração recomendada para a conversão em cDNA é de apenas 5 a 10 nanogramas/ $\mu$ l de RNA por amostra.

As amostras foram diluídas com proporções diferentes a depender da sua concentração inicial.

Foi utilizado o kit TaqMan™ MicroRNA Reverse Transcription (Thermo Fisher Scientific, USA) para a síntese de cDNA. Tal kit é composto por *Nuclease-Free water*, inibidor de RNase, tampão 10X, adicionado para garantir o pH e as concentrações iônicas adequadas da reação, além disso tem os nucleotídeos (dNTP) e a enzima transcriptase reversa (RT), esta responsável pela conversão de RNA para cDNA.

Os reagentes acima descritos foram adicionados com volumes adaptados a partir do descrito pelo fabricante, sendo 2,08 µl de água, 0,075 µl de dNTP, 0,75 µl de tampão [10X], 0,5 µl da enzima RT, 0,095 µl de inibidor de RNase e posteriormente adicionado 1,5 µl da sonda [5X] específica do miRNA. Assim foi realizado o mix de tais reagentes sendo ao fim distribuídos 3,5 µl para cada amostra além de 2,5 µl do RNA. Concluído esse processo, as amostras seguiram para o termociclador a fim de passar pela etapa de desfazer estruturas secundárias do RNA, em seguida anelamento e pôr fim a extensão, formando o cDNA, realizada pela enzima RT. Sendo as etapas ocorridas inicialmente em 30 minutos a 16°C, anelamento em 30 minutos a 42°C e a extensão ocorrida em 5 minutos submetida a 85°C. Todas essas etapas foram realizadas em apenas um ciclo. Retirando as amostras do termociclador, estas foram armazenadas em freezer a -20 °C.

### 3.8 PREPARO DA PCR EM TEMPO REAL

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica utilizada na amplificação de amostra de ácidos nucléicos *in vitro*. Essa técnica apresenta uma extensão ainda maior denominada de PCR em tempo real quantitativa (qPCR), na

qual permite que os processos de amplificação, detecção e quantificação do ácido nucleico produzido seja realizado em uma única etapa, ocasionando maior agilidade na obtenção de resultados, diminuição no risco de contaminação da amostra e conseqüentemente uma maior precisão (Nascimento, et al, 2010).

Tal método de elevada sensibilidade e especificidade de fluorescência possibilita a análise da expressão gênica e neste estudo fora realizada no equipamento *Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System*, utilizando o kit *TaqMan® Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems). As sondas dos miRNAs miR-125b-5p e o miR-9-5p foram submetidas a essa etapa e como controles endógenos, foram utilizadas as sondas TaqMan RNU48, RNU44 e o RNU6B, sendo estes pequenos RNAs nucleolares (snoRNAs) identificados como snoRNAs intrônicos com aproximadamente 70 nucleotídeos de comprimento (Gee, H. E., et al., 2011). Para os genes alvo *TRAF6* e *NFKB1* foram usados o *ACTB* e *GAPDH* como genes endógenos.

Para a preparação da placa de expressão foram utilizados em cada poço 3,83 µl de água ultra pura, 5 µl de 56áster mix universal, 0,5 µl de sonda 20X e 0,07 µl de cDNA. As reações foram feitas em triplicata técnica em uma placa de 96 poços. Posteriormente, as reações foram submetidas ao equipamento seguindo as seguintes condições: 50°C durante 2 minutos, 95°C por 10 minutos, seguido de 45 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. As leituras de fluorescência foram realizadas pelo equipamento a cada ciclo de amplificação e, posteriormente, analisados pelo *Sequence Detection Software* (SDS) v1.3 (Applied Biosystems).

### 3.9 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA E TESTES ESTATÍSTICOS

Logo após os procedimentos de laboratório terem sido concluídos, foram iniciadas as análises dos dados. Primeiramente, foi averiguado a qualidade das amostras submetidas ao termociclador da qPCR. Este equipamento possui uma fonte de iluminação ultra-violeta e um detector de fluorescência acoplado a um computador com o *Sequence Detection Software* (SDS) v1.3 (Applied Biosystems) para aquisição de dados referente a corrida. Os dados para análise foram expostos por esse software dando então os valores de Ct (do inglês Cycle Threshold) e juntamente aos dados foram observadas as curvas de amplificação de cada amostra. Foram excluídas da análise as amostras que alcançaram medidas com uma diferença superior a 0,5 nos valores de Ct.

Para realizar a análise dos dados de expressão gênica foi utilizado o método  $\Delta\Delta CT$  comparativo e a partir dos valores de CT gerados pelo equipamento foi possível calcular o valor do  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . Tais dados foram organizados e calculados pelo software Microsoft® Excel® 2016.

Este é um método de quantificação relativa dos dados, na qual compara mudanças na expressão de genes. Para isso foram vistos a amplificação dos gene de referência (*RNU6B*, *RNU48*, *RNU44*, *ACTB* e *GAPDH*) e dos miRNA (*miR-9-5p* e *miR-125b-5p*). Nesse caso, a expressão dos *RNU6B*, *RNU48*, *RNU44* foram comparados individualmente como valor de expressão de cada miRNA pelo método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  para no fim ser obtido a ordem de grandeza, ou seja, quantas vezes um determinado gene estará mais expresso/reprimido.

Em seguida foi realizado o teste de normalidade no software GraphPad Prism versão 5.0. A distribuição normal foi calculada usando o teste Shapiro-Wilk. Em seguida os dados foram submetidos ao teste T student para testes de

distribuição. Como valor de significância aplicado a todas as amostras foi determinado um valor menor ou igual a 0,05.

### 3.10 ANÁLISE DE CORRELAÇÃO

A correlação de Pearson foi feita entre os miRNAs e os genes alvo. O dado foi realizado no programa do software GraphPad Prism versão 5.0.

### 3.11 APROVAÇÃO DA PESQUISA

O projeto possui autorização pelo comitê de ética do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco para inclusão dos pacientes no presente estudo sob o número CAAE 50139415.8.0000.5208 (apêndice A). Todos os indivíduos que aceitaram participar da pesquisa tiveram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (apêndice B) preenchido e assinado por um responsável maior de 18 anos.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 ALVO DOS MIRNAS

Como cumprimento de um dos objetivos da pesquisa, a escolha dos miRNAs para o estudo foi realizada a partir da busca em banco de dados e de softwares que predizem os alvos de tais miRNAs. Os resultados desta busca estão expostos na tabela 2 abaixo.

**Tabela 2.** Programas utilizados para a escolha dos miRNAs e a quantidade de alvos que estes regulam.

PROGRAMAS	miRNAs	
	miR 9-5p	miR-125b-5p
MiRDB	1236	925
Targetscan	1594	1038
TarBase	1878	1138
GeneCards	352	437

Ao estudar os bancos de dados, foi possível escolher o miR-125b-5p e miR-9-5p para esse estudo, visto que estão presentes em todos os softwares escolhidos e com importantes alvos regulatórios que podem estar interligados com as alterações inflamatórias da doença. Para verificação dessas alterações foram escolhidos como alvos os genes *NFKB1* e *TRAF6*, os quais participam de uma variedade de processos e ativam a produção das citocinas pró-inflamatórias. Dessa forma, suas atividades são essenciais para manter um equilíbrio imunológico e inflamatório, capaz de auxiliar nas respostas e escolha de terapias eficazes que controlem melhor a inflamação dos indivíduos acometidos por LES.

## 5.2 ANÁLISE GERAIS DOS GRUPOS

Os pacientes foram divididos em dois grupos para haver a comparação entre eles, sendo o grupo controle composto por pacientes inativos com SLEDAI  $\leq 4$  no momento da coleta e o grupo caso composto por pacientes em atividade com SLEDAI  $\geq 4$ , totalizando 35 pacientes em atividade e 24 pacientes em estado inativo. As manifestações clínicas observadas nos pacientes dessa pesquisa no momento da coleta estão descritas na Tabela 3 abaixo.

**Tabela 3** Manifestações clínicas apresentadas pelos pacientes participantes do grupo de pesquisa.

<b>Manifestação clínica</b>	<b>Presente (%)</b>	<b>Ausente (%)</b>
Lúpus cutâneo agudo	35,6%	64,4%
Lúpus cutâneo crônico	3,4%	96,6%
Lúpus discoide	1,7%	98,3%
Rash malar	37,3%	62,7%
Fotossensibilidade	32,2%	67,8%
Úlcera oral	15,3%	84,7%
Alopecia	22%	78%
Artrite	33,9%	66,1%
Serosite	17%	83%
Alteração renal*	45,7%	54,3%
Alteração neurológica**	17%	83%
Alteração hematológica***	30,5%	69,5%
Anemia hemolítica	23,7%	76,3%
Leucopenia <4000	8,4%	91,6%
Trombocito <100	15,2%	84,8%

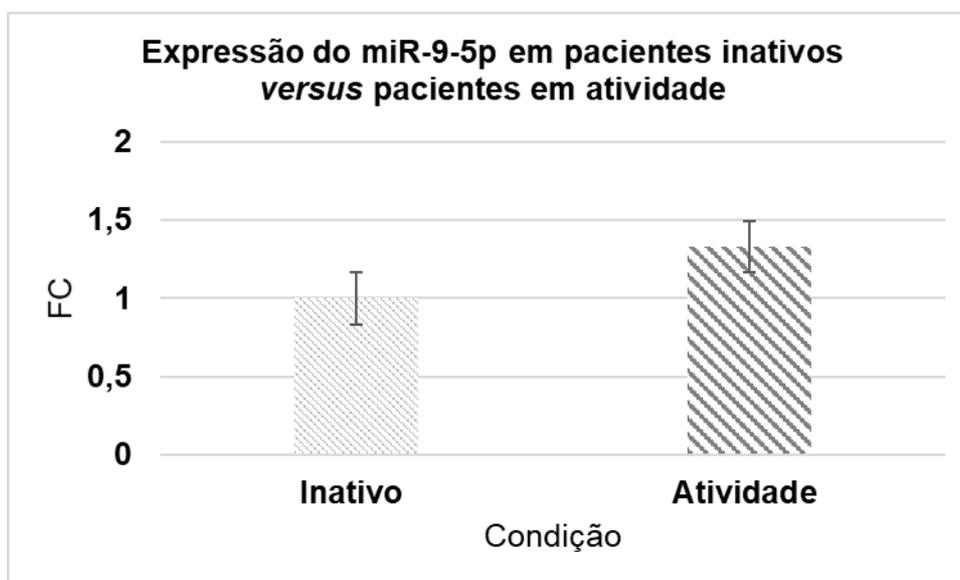
\*Alteração renal: nível de proteinúria ( $> 0,5\text{g} / 24\text{h}$ ). \*\*Alteração neurológica: convulsão, psicose, mielite, mononeurite, neuropatia craniana ou periférica. \*\*\*Alteração hematológica: trombocitopenia ( $<150.000$  plaquetas /  $\text{mm}^3$ ), leucopenia ( $<3.000$  leucócitos /  $\text{mm}^3$ ).

Ao todo, nosso grupo amostral foi composto por 83% de meninas e 17% de meninos com média de idade equivalente a  $14,71 \pm 3,53$ . Todos os meninos

estavam em atividade no momento da coleta e entre as meninas, 51% se encontravam em atividade e 49% se encontravam em inatividade da doença. A manifestação clínica mais prevalente nesses pacientes foi a alteração renal com 45,7% e o rash malar com 37,3%.

### 5.3 ANÁLISE DE EXPRESSÃO DO MIR-9-5P EM LESJ

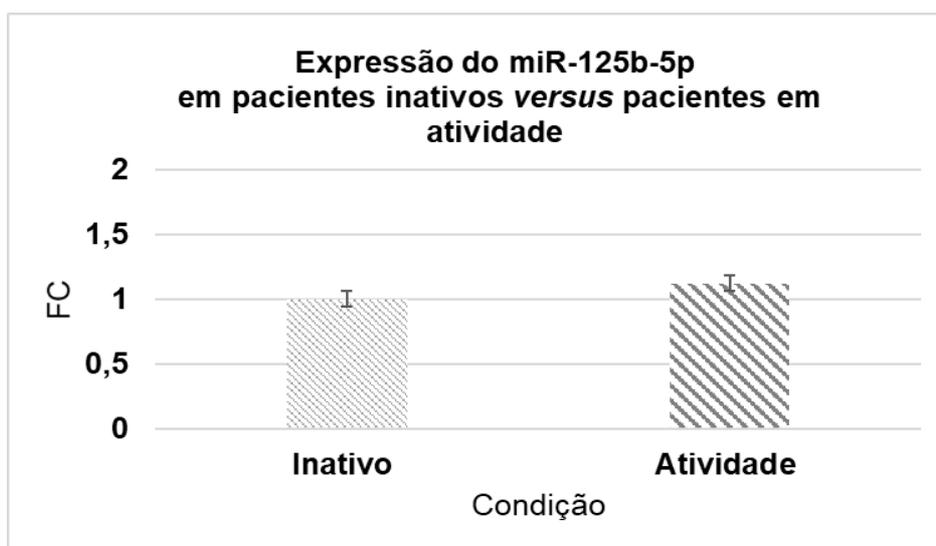
Ao analisarmos o miR-9-5p não houve diferença no nível de expressão entre os pacientes dos grupos testados. O Gráfico 1 mostra a expressão relativa encontrada para os pacientes em atividade da doença (Fold Change [FC] = 1,33) comparados com os pacientes inativos (FC= 1), usados como referência para o perfil de expressão desse estudo. Os resultados normalizados não apresentaram diferença estatisticamente significativa nos níveis do miR-9-5p ( $p=0,81$ ).



**Gráfico 9** Expressão relativa do miR-9-5p entre pacientes inativos (Média= 32,58, SD= 1,52) e pacientes em atividade (Média= 32,40, SD= 1,90). Pacientes em atividade não apresentaram diferença na expressão (FC= 1,33) quando comparado aos pacientes inativos. Valores mostrados e obtidos a partir do método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . Os valores do gráfico são expressos em FC (Fold Change).

#### 5.4 ANÁLISE DE EXPRESSÃO DO MIR-125B-5P EM LESJ

Ao verificar a expressão do miR-125b-5p, os dois grupos de pacientes não apresentaram diferença significativa. Os indivíduos em atividade apresentaram o perfil de expressão (FC =1,11) equivalente aos pacientes inativos (FC =1), este último sendo usado como referência na expressão desse estudo. Os dados ilustrados no Gráfico 2, estão normalizados e não foram estatisticamente significativas nos níveis do miR-125b-5p ( $p=0,08$ )

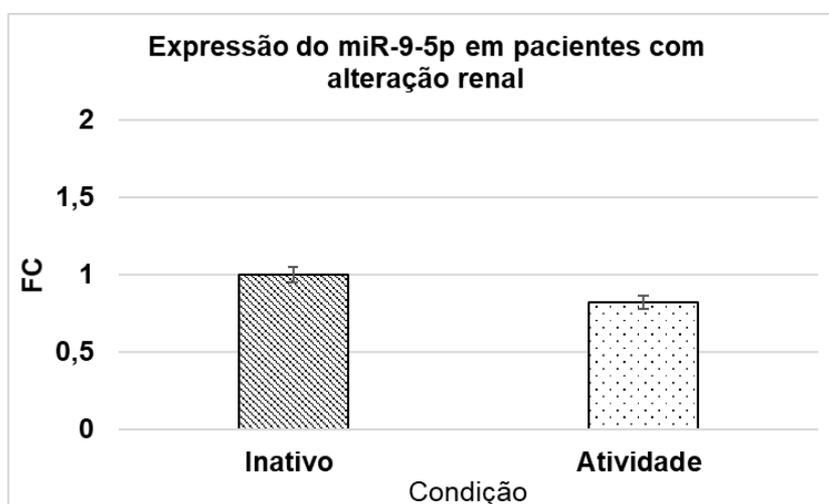


**Gráfico 10** Comparação da expressão do miR-125-5p entre pacientes inativos (Média= 30,12, SD= 1,14) e pacientes em atividade (Média=30,19, SD= 1,22). Pacientes em atividade não apresentaram diferença na expressão (FC= 1,11) quando comparado aos pacientes inativos. Valores mostrados e obtidos a partir do método 2- $\Delta\Delta$ CT. Os valores do gráfico são expressos em FC (Fold Change).

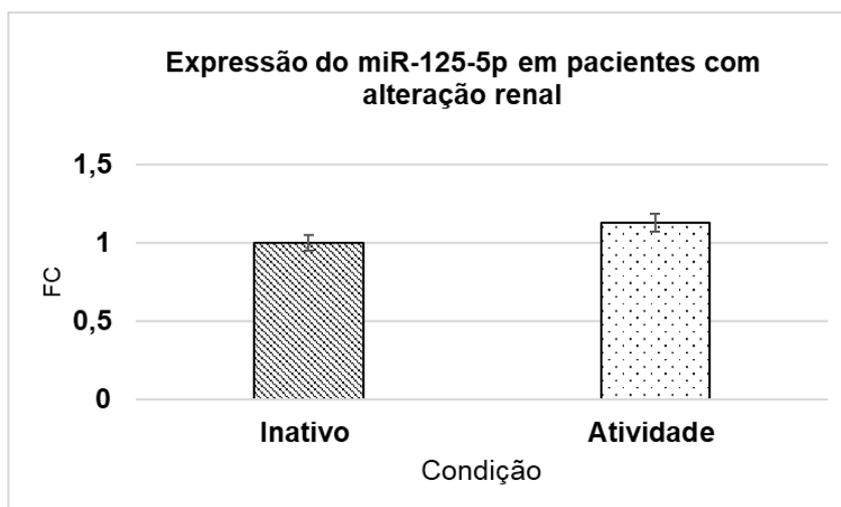
#### 5.5 EXPRESSÃO DOS MIR-125B-5P E MIR-9-5P EM PACIENTES COM ALTERAÇÃO RENAL E RASH MALAR

Ao analisar as manifestações clínicas dos pacientes dessa pesquisa, observamos que a alteração renal e rash malar foram as manifestações clínicas mais predominantes, sendo ao todo 27 pacientes com manifestações renais e 22 com rash malar.

Em relação à alteração renal, 8 pacientes encontram-se em inatividade, usados como controle para essa análise e 19 em atividade, grupo caso. Como resultado encontramos que o miR-9-5p está 1,20 vezes menos expresso em pacientes com atividade da doença quando comparados ao grupo de pacientes inativos, ambos com a alteração renal. Já o miR-125b manteve-se sem diferença de expressão entre os grupos (FC=1,13). Os dados são ilustrados no Gráfico 3 e 4 abaixo e não apresentaram significância estatística ( $p=0,44$ ;  $p=0,97$ ).

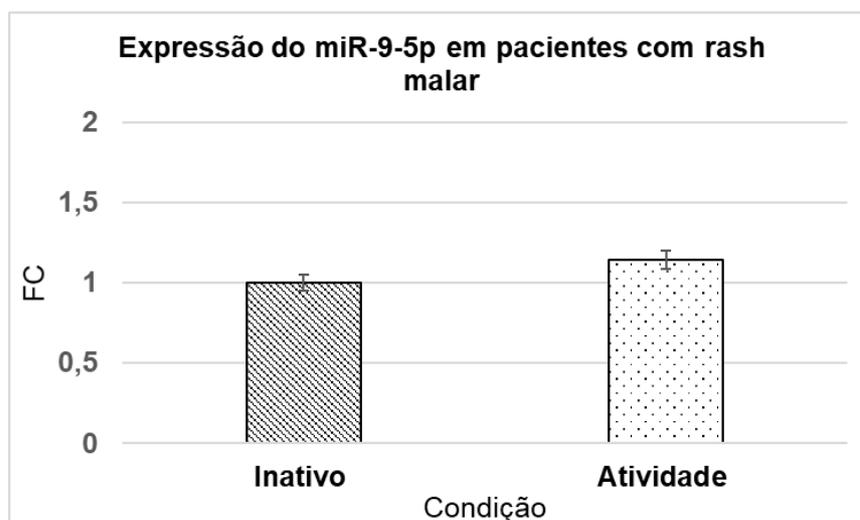


**Gráfico 11** Comparação da expressão do miR-9-5p entre pacientes inativos (Média= 31,63 SD= 1,24) e pacientes em atividade (Média=32,39 SD= 1,97) que apresentavam alterações renais como manifestação clínica. O miR-9-5p está 1,20 menos expresso em pacientes em atividade com alteração renal quando comparados com pacientes inativos. Valores mostrados e obtidos a partir do método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . Os valores do gráfico são expressos em FC (Fold Change).

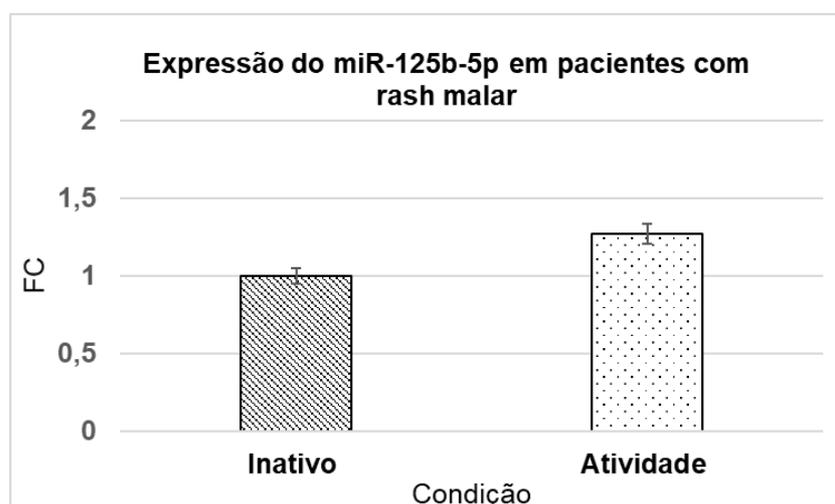


**Gráfico 12** Comparação da expressão do miR-125-5p entre pacientes inativos (Média= 30,00 SD= 1,34) e pacientes em atividade (Média=30,31 SD= 1,11) que apresentavam alterações renais como manifestação clínica. Pacientes em atividade com alteração renal não apresentou diferença na expressão do miR-125b-5p (FC=1,13). Valores mostrados e obtidos a partir do método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . Os valores do gráfico são expressos em FC (Fold Change).

Quando se trata dos pacientes acometidos por rash malar, encontramos ao todo 22 pacientes, sendo 6 deles em condição inativa e 16 em atividade da doença. Como resultado encontramos que tanto o miR-125b (FC=1,27) quanto o miR-9 (FC=1,14) não apresentaram alteração na expressão entre os grupos, sendo todos com o mesmo padrão de expressão tanto em pacientes em atividade quanto os inativos. Os dados estão representados nos Gráficos 5 e 6 abaixo. Os resultados não foram estatisticamente significativos (miR-9-5p:  $p=0,37$ ; miR-125b-5p:  $p=0,19$ ).



**Gráfico 13** Comparação da expressão do miR-9-5p entre pacientes inativos (Média= 31,85 SD= 1,53) e pacientes em atividade (Média= 32,18 SD= 1,64) que apresentavam rash malar como manifestação clínica. Pacientes em atividade não apresentaram diferença na expressão do miRNA em comparação com os pacientes inativos (FC=1,14). Valores mostrados e obtidos a partir do método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . Os valores do gráfico são expressos em FC (Fold Change).

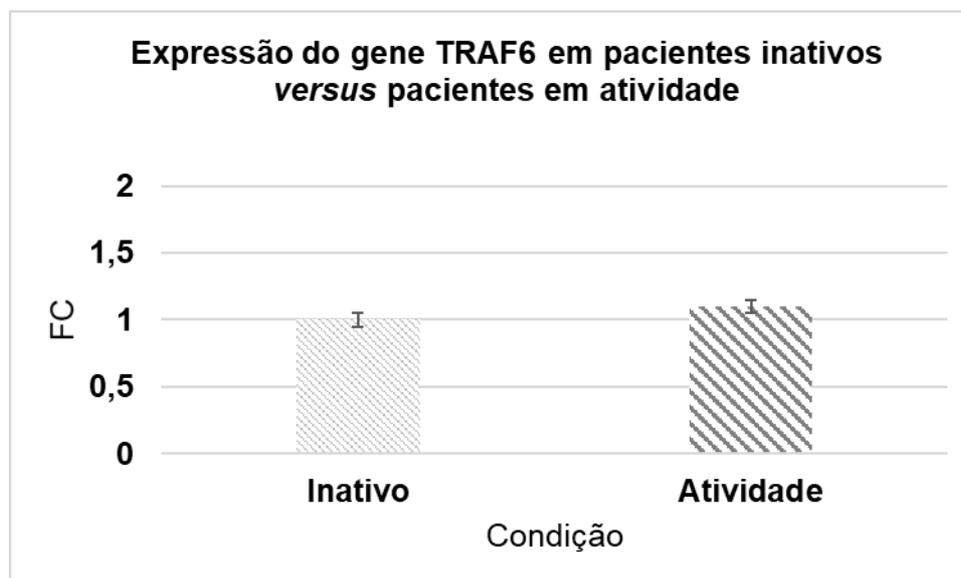


**Gráfico 14** Comparação da expressão do miR-125b-5p entre pacientes inativos (Média= 29,96 SD= 1,89) e pacientes em atividade (Média= 30,13 SD= 0,81) que apresentavam rash malar como manifestação clínica. Pacientes em atividade não apresentaram diferença na expressão do miRNA em comparação com os pacientes inativos (FC=1,27). Valores mostrados e obtidos a partir do método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . Os valores do gráfico são expressos em FC (Fold Change).

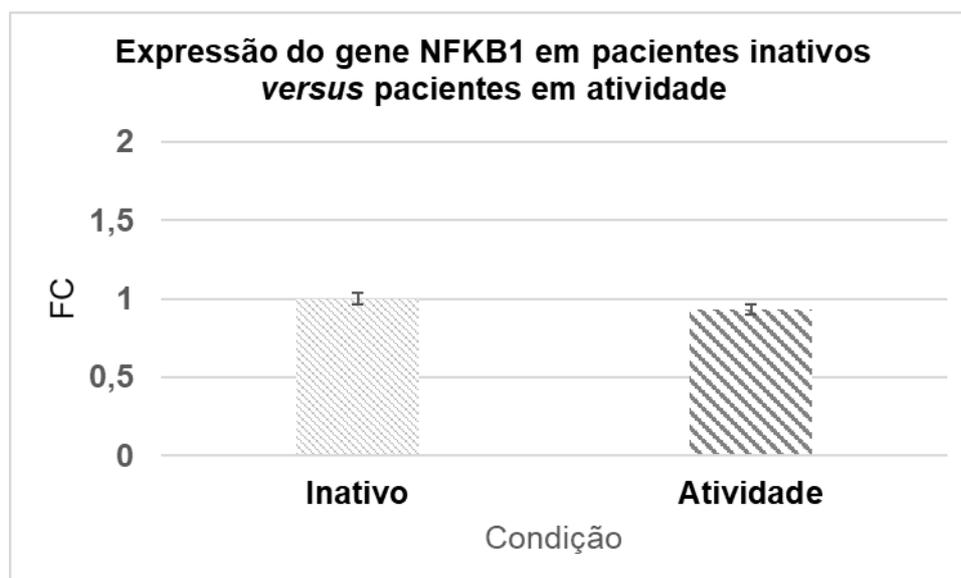
## 5.6 EXPRESSÃO DOS GENES ALVOS *TRAF6* E *NFKB1*

Na análise de expressão do *TRAF6* foi possível identificar que os dois grupos de pacientes não apresentam diferença no comportamento da expressão, como exposto no Gráfico 7 abaixo, sendo pacientes em atividade com FC=1,15. Os dados estão normalizados e não deram significância estatística ( $p=0,09$ ).

O mesmo resultado foi observado quando analisada a expressão do gene *NFKB1*, onde pacientes em atividade não foram diferencialmente expressos quando comparado aos indivíduos inativos (Gráfico 8). O resultado da expressão foi dado em FC sendo FC=0,93 para pacientes em atividade e FC=1 em pacientes inativos. O dado normalizado não foi estatisticamente significativo ( $p=0,73$ ).



**Gráfico 15** Comparação da expressão do gene *TRAF6* entre pacientes inativos (Média= 30,01, SD= 1,20) e pacientes em atividade (Média= 29,54, SD= 1,26). Pacientes em atividade não apresentaram diferença na expressão do gene *TRAF6* em comparação com os pacientes inativos (FC=1,15). Valores mostrados e obtidos a partir do método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . Os valores do gráfico são expressos em FC (Fold Change).



**Gráfico 16. Comparação da expressão do gene *NFKB1* entre pacientes inativos (Média= 26,38, SD= 0,66) e pacientes em atividade (Média=26,21, SD= 0,51).** Pacientes em atividade não apresentaram diferença na expressão do gene *NFKB1* em comparação com os pacientes inativos (FC=0,93). Valores mostrados e obtidos a partir do método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . Os valores do gráfico são expressos em FC (Fold Change).

## 5.7 CORRELAÇÃO ENTRE MIRNAS E GENES ALVOS

Para verificar a existência de interação entre os miR-125b-5p e o miR-9-5p e os os genes *NFKB1* e *TRAF6* foi realizado uma análise de correlação, onde encontramos que não somente o miR-9-5p como descrito na literatura, mas também o miR-125b-5p está correlacionado negativamente com o *TRAF6* ( $r=0,37$ ;  $p=0,02$ ). Resultado ilustrado na Figura 7 abaixo. Não foi encontrado correlação entre o miR-9-5p e o *NFKB1*.

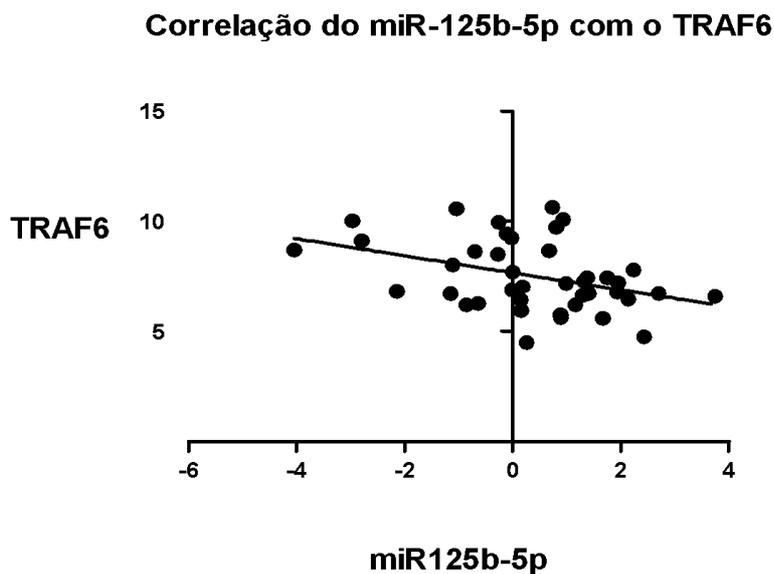


Figura 7 Correlação entre o miRNA 125b-5p e o *TRAF6* em pacientes com LESj ( $r=0,50$ ;  $p=0,05$ ).

Ao aprofundar mais a análise de correlação, encontramos que pacientes em atividade da doença apresentam correlação negativa mais forte entre o miR-125b-5p e o gene *TRAF6* em relação a pacientes em condição inativa da doença, demonstrado na Figura 8 abaixo ( $r=0,50$ ;  $p=0,05$ ). Não foi encontrado correlação entre miR-9-5p e o *TRAF6* nas nossas análises.

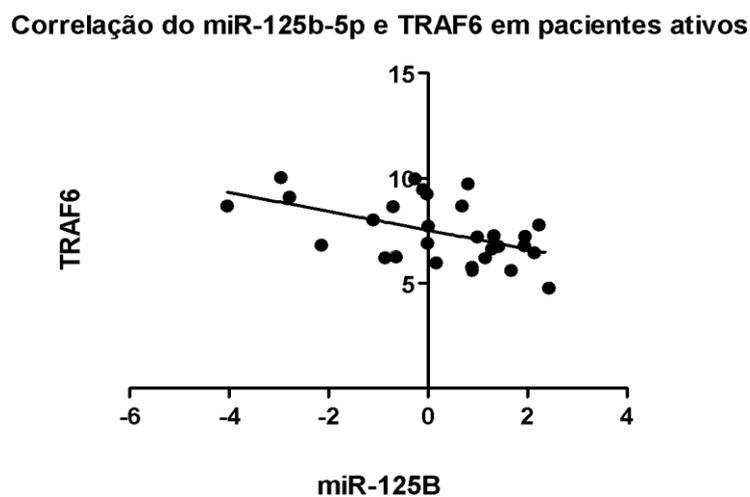


Figura 8 Correlação entre o miRNA 125b-5p e o *TRAF6* em pacientes com condição de atividade do LESj.

## 6. DISCUSSÃO

Neste estudo investigamos dois miRNAs que até o momento só haviam sido avaliados em pacientes com LESa, mesmo assim com informações escassas na literatura. Nossos dados mostraram que os miR-9-5p e miR125b-5p não estão diferencialmente expressos quando levamos em consideração a condição ativa e inativa do paciente com LESj. No entanto, podemos observar uma correlação entre os níveis de expressão do miR-125b-5p e o *TRAF6*, levantando a hipótese do controle desse alvo nos processos inflamatórios no LESj, em especial para o grupo classificado como inativo da doença baseado no SLEDAI.

Supostamente não é preciso o indivíduo estar em atividade elevada da doença para apresentar alterações visíveis e significativas no aspecto inflamatório. Estes podem ser encontrados em condições diferentes da doença (atividade x inatividade), porém podem permanecer com condições inflamatórias e seus alvos genéticos também podem estar sofrendo influência dessa expressão, como visto neste trabalho. Vale ressaltar que tais pacientes são portadores de uma doença inflamatória que afeta a imunidade e que possivelmente estão com vários componentes e vias celulares em desequilíbrio que estariam influenciando no desenvolvimento da patologia de modo geral, e não especificamente na atividade ou não da doença.

Vemos essa afirmação se confirmar quando analisamos a expressão do miR-9-5p e do miR-125b-5p nas manifestações clínicas mais prevalentes nos pacientes. O rash malar e as alterações renais, que segundo a literatura são as alterações mais comuns encontradas no LESj (Mina and Brunner, 2010; Szymanik-Grzelak et al., 2016), tiveram diferenças de expressão, sendo o miR-9-5p menos expresso em pacientes na condição ativa da doença e acometidos por

alterações renais e quando este mesmo miRNA foi analisado em pacientes com rash malar, não foi encontrada diferença de expressão entre o grupo dos pacientes ativos ou inativos. Sendo assim, observamos que existe alterações na expressão desse miRNA de acordo com a manifestação clínica observada, e para isso é preciso levar em consideração a manifestação clínica do paciente e não apenas a condição de atividade ou inatividade no âmbito geral.

O primeiro estudo que associou o miR-9 a alterações renais no lúpus, foi Xu e colaboradores (2017). Estes pesquisadores observaram que o miR-9 está positivamente correlacionado com a nefrite lúpica e quando menos expresso é capaz de diminuir a viabilidade celular e induzir a apoptose em células nefríticas. Estes analisaram amostras tanto de sangue quanto de células mesangiais renais humanas de 20 pacientes com LES. Entretanto, a expressão do miR-125b-5p quando analisado em relação as manifestações clínicas permaneceu uniforme entre os dois grupos de pacientes. Podemos sugerir então que o miR-125b pode ter sua expressão influenciada por alterações renais diferentes.

No grupo dos nossos pacientes levamos em consideração não somente a nefrite lúpica como alteração renal, mas todos os aspectos clínicos que englobassem essa manifestação, como descrito na Tabela 2. Quando observamos na literatura, o miR-125b está associado a lúpus nefrite, como estudado por Luo e colaboradores (2013), mas não nas demais manifestações do LES, como por exemplo, o rash malar.

É importante lembrar que o foco deste trabalho foi avaliar os miRNAs envolvidos na inflamação dos pacientes com LESj. Para que essa inflamação ocorra, existe uma sequência coordenada e autolimitante de eventos que recebe a influência direta de mecanismos reguladores positivos e negativos, neste caso

os miRNAs, segundo Bazzoni e colaboradores (2009). O estudo citado ressalta que o miR-9 tem sua importância nesse processo, pois foi o único miRNA relevante e que merece mais atenção entre 365 outros miRNAs analisados nesse estudo. Bazzoni e colaboradores (2009) realizaram o estudo em monócitos e neutrófilos polimorfonucleares e mostraram que o miR-9 é diretamente induzido pelo LPS através da via MyD88 / NF- $\kappa$ B, sendo este um regulador chave na resposta inflamatória. Ainda segundo os autores, os monócitos que supressaram o miR-9, mostraram uma expressão reduzida da proteína *NFKB1* / p105 e dessa forma, esse miRNA contribui para a regulação da inflamação, reprimindo a expressão gênica em nível pós-transcricional. Foi a partir daí então que esse pequeno RNA não codificante teve sua contribuição confirmada na resposta imune inata.

Ainda mencionando a importância de avaliar a expressão do miR-9, encontramos um estudo onde o mesmo foi avaliado em câncer do ovário (Guo et al., 2009). Nesse estudo, os pesquisadores encontraram que a região 3'-UTR do mRNA de *NFKB1* é regulada diretamente pelo miR-9, onde a expressão desse regula o seu alvo e inibe a proliferação celular desse tipo de câncer. Diante do exposto, vemos que não refutamos esses dados, pois pacientes com LESj podem estar com os miRNAs de modo semelhante interferindo nessas vias e dessa maneira gerarem uma inflamação exacerbada independente do indivíduo estar com a doença em fase ativa ou não.

Diferente do miR-9, o miR-125b já foi mais estudado e, um desses estudos foi realizado em pacientes com LESa por Cao e colaboradores (2018). Os autores analisaram a expressão do miR-125b em PBMC de pacientes com LES na faixa

etária adulta e puderam observar um baixo nível de expressão nos pacientes em comparação aos indivíduos sem a doença.

Outro relevante estudo, Luo e colaboradores (2013) analisaram a expressão do miR-125b em 50 pacientes com LESa em atividade e 26 indivíduos saudáveis. Os autores observaram que o miR-125b-5p foi encontrado menos expresso nos pacientes em atividade quando comparados aos indivíduos controles, e além disso, os autores encontraram uma correlação negativa entre o miR-125b e a nefrite lúpica desses pacientes, surgindo dessa maneira que este miRNA exerce um importante papel no processo inflamatório, pois sua expressão sendo reduzida, conseqüentemente um dos seus alvos da família do *NFκB* em específico, é desregulado e desencadeia a inflamação no paciente.

Não somente é importante compreender a regulação desses alvos já descritos na literatura como também o fato de descobrir que novos genes reguladores poderão auxiliar ainda mais na compreensão dessa doença. Nesse contexto, pudemos demonstrar na segunda fase desse trabalho, na qual exploramos os alvos regulatórios do miR-125b e miR-9, e observamos uma correlação do *TRAF6* com o miR-125b como novidade para as pesquisas em LESj.

Um estudo recente, realizado por Rasheed e colaboradores (2019), retratou essa correlação ao analisar pacientes acometidos por condrócitos osteoartríticos. Os pesquisadores observaram que a partir do isolamento da cartilagem lisa e também da cartilagem lesada de pacientes com osteoartrite, o miR-125b-5p atuava como um co-regulador de genes inflamatórios da via *TRAF6/NF-κB* em condrócitos osteoartrítico humanos. Nesse estudo também observamos essa correlação nos pacientes com LESj.

Como último resultado do nosso trabalho, observamos que pacientes em atividade apresentaram uma correlação negativa ainda maior com o alvo *TRAF6* quando comparado com pacientes em inatividade. Mesmo observando estatisticamente que não existe diferenças significativas na expressão desses miRNAs com relação a fase ativa ou não da doença no paciente, percebemos que a condição do paciente em atividade está sendo intensificada e refletida também nessa interação. Possivelmente, as alterações nos processos inflamatórios sejam mais agudos nesses indivíduos e por estarem em atividade, a expressão dos miRNAs esteja sendo reprimida mais acentuadamente, mas não nitidamente diferente dos pacientes inativos com a mesma doença. Até o momento, não existem pesquisas analisando o miR-125b-5p nesse âmbito, sendo que o nosso resultado é pioneiro.

Hruskova e colaboradores (2016) realizaram uma análise semelhante a nossa em 58 pacientes com artrite reumatoide inicial. Dos 58 pacientes, 37 estavam em atividade da doença, 15 pacientes estavam com atividade moderada e 6 não estavam em atividade. Para o grupo controle, 54 indivíduos saudáveis foram pareados por sexo e idade. Foi feito um estudo prospectivo em que os pacientes foram acompanhados desde o início da doença e depois de três meses de tratamento, dividindo em grupos respondedores (pacientes que tinham alcançado uma baixa na atividade da doença ou entrado no estado inativo da doença) e não respondedores ao tratamento. Inicialmente, os autores compararam os pacientes com indivíduos saudáveis e encontraram uma expressão reduzida do miR-125b. Entretanto, quando a comparação foi feita entre os diferentes estágios de atividade ou não da doença dos pacientes foi observado que a expressão do miR-125b foi maior em pacientes respondedores do que em

não respondedores após três meses de tratamento ( $p = 0,042$ ). Assim, os autores sugeriram que a resposta ao tratamento após três meses prediz o comportamento expressivo do miR-125b.

Dessa forma, os resultados que apresentamos vem para trazer informações importantes acerca da expressão dos miRNAs e seus genes alvos entre pacientes com a mesma doença e observar uma possível explicação para o processo inflamatório na qual os pacientes com LESj são acometidos. Apesar da expressão não ter sido alterada entre os grupos, sugerimos que eles permanecem em estado inflamatório alterado.

As correlações observadas colaboram com nossa hipótese que os miRNAs podem contribuir com a regulação de vias inflamatórias. Como os níveis de expressão foram mostrados sem diferença significativa entre os grupos, consequentemente seus alvos estão regulados igualmente entre pacientes em atividade ou não da doença.

## 7. CONCLUSÃO:

1. Os miRNAs 125b-5p e miR-9-5p tem como alvo em comum o *NFKB1* e o *TRAF6* e este é de significativa importância no estudo por contribuir com o processo inflamatório no LES;
2. Foi observado que tanto o miR-9-5p quanto o miR-125b-5p não apresentaram diferenças na expressão, o que indica que os pacientes estando ou não em atividade podem apresentar quadros inflamatórios, não podendo observar diferenças na expressão gênica entre os pacientes;
3. O miR-9-5p foi menos expresso em pacientes em atividade com alteração renal em comparação com pacientes inativos com a mesma manifestação, demonstrando assim que não somente se ativo ou inativo, as alterações clínicas do paciente devem ser consideradas nas análises de expressão.
4. O miR-125b-5p apresenta correlação moderada negativamente com o *TRAF6* e sua expressão pode alterar esse alvo quando desregulado e assim contribuir para desencadear um processo inflamatório característico do LESj. O miR-9-5p não apresentou correlação com o gene *NFKB1* e os dados não foram estatisticamente significativo;
5. Pacientes em atividade apresentaram uma correlação negativa ainda maior entre o *TRAF6* e o miR-125b-5p em relação aos pacientes sem atividade, podendo estar relacionada as alterações inflamatórias mais acentuadas nesses indivíduos no momento de crise, porém sem diferença nítida entre os indivíduos com a condição inativa da doença.

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, Abul K.; LICHTMAN, Andrew H.; PILLAI, Shiv. **Imunologia celular e molecular**. Elsevier Brasil, 2008.
- ABULABAN, Khalid M. et al. Relationship of cell-free urine MicroRNA with lupus nephritis in children. **Pediatric Rheumatology**, v. 14, n. 1, p. 1-7, 2016.
- ABULABAN, Khalid M.; BRUNNER, Hermine I. Biomarkers for childhood-onset systemic lupus erythematosus. **Current rheumatology reports**, v. 17, n. 1, p. 1-8, 2015.
- ALEVIZOS, Ilias; ILLEI, Gabor G. MicroRNAs as biomarkers in rheumatic diseases. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 6, n. 7, p. 391-398, 2010.
- Amaral, B. A. D., Nonaka, C. F. W., Freitas, R. D. A., Souza, L. B. D., & Pinto, L. P. (2010). MicroRNAs-biogênese, funções e seu papel potencial na carcinogênese oral. ASSIS, M. R. de; BAAKLINI, César Emile. **Lúpus eritematoso sistêmico**. RBM rev. bras. med, v. 66, n. 9, p. 274-285, 2009.
- BAE, S. C. et al. Reliability and validity of systemic lupus activity measure-revised (SLAM-R) for measuring clinical disease activity in systemic lupus erythematosus. **Lupus**, v. 10, n. 6, p. 405-409, 2001.
- BALZANO, Francesca et al. MicroRNA expression analysis of centenarians and rheumatoid arthritis patients reveals a common expression pattern. **International journal of medical sciences**, v. 14, n. 7, p. 622, 2017.
- BARTEL, David P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. **cell**, v. 116, n. 2, p. 281-297, 2004.
- BAZZONI, Flavia et al. Induction and regulatory function of miR-9 in human monocytes and neutrophils exposed to proinflammatory signals. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 13, p. 5282-5287, 2009.
- BERTSIAS, George K. et al. Joint European League Against Rheumatism and European Renal Association–European Dialysis and Transplant Association (EULAR/ERA-EDTA) recommendations for the management of adult and paediatric lupus nephritis. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 71, n. 11, p. 1771-1782, 2012.
- BOGDANOVIĆ, Radovan et al. Lupus nephritis in childhood: a review of 53 patients followed at a single center. **Pediatric Nephrology**, v. 19, n. 1, p. 36-44, 2004.
- BOLDIN, Mark P.; BALTIMORE, David. MicroRNAs, new effectors and regulators of NF-κB. **Immunological reviews**, v. 246, n. 1, p. 205-220, 2012.
- BRUNNER, Hermine I. et al. Sensitivity of the systemic lupus erythematosus disease activity index, British Isles lupus assessment group index, and systemic lupus activity measure in the evaluation of clinical change in childhood-onset systemic lupus erythematosus. **Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology**, v. 42, n. 7, p. 1354-1360, 1999.
- BRUNNER, Hermine I. et al. Risk factors for damage in childhood-onset systemic lupus erythematosus: cumulative disease activity and medication use predict disease damage. **Arthritis & Rheumatism**, v. 46, n. 2, p. 436-444, 2002.
- CAMERON, J. Stewart. Lupus nephritis. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 10, n. 2, p. 413-424, 1999.
- CAO, Wenting et al. miR-125b is downregulated in systemic lupus erythematosus patients and inhibits autophagy by targeting UVRAG. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 99, p. 791-797, 2018.

- CARTWRIGHT, Tyrell; PERKINS, Neil D.; L. WILSON, Caroline. NFKB1: a suppressor of inflammation, ageing and cancer. **The FEBS journal**, v. 283, n. 10, p. 1812-1822, 2016.
- CAZNOCH, Claudine Juliana et al. Padrão de comprometimento articular em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e sua associação com presença de fator reumatóide e hiperelasticidade. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 46, n. 4, p. 261-265, 2006.
- CERIBELLI, Angela et al. MicroRNAs in rheumatoid arthritis. **FEBS letters**, v. 585, n. 23, p. 3667-3674, 2011.
- CERIBELLI, Angela et al. MicroRNAs in systemic rheumatic diseases. **Arthritis research & therapy**, v. 13, n. 4, p. 1-10, 2011.
- CHAN, Tak Mao. Treatment of severe lupus nephritis: the new horizon. **Nature Reviews Nephrology**, v. 11, n. 1, p. 46-61, 2015.
- CHEN, Wenbiao et al. Analysis of microRNAs in patients with systemic lupus erythematosus, using Solexa deep sequencing. **Connective tissue research**, v. 55, n. 3, p. 187-196, 2014.
- CHUNG, Ji-Yun et al. Elevated TRAF2/6 expression in Parkinson's disease is caused by the loss of Parkin E3 ligase activity. **Laboratory investigation**, v. 93, n. 6, p. 663-676, 2013.
- COJOCARU, Manole et al. Manifestations of systemic lupus erythematosus. **Maedica**, v. 6, n. 4, p. 330, 2011.
- COOLEN, Marion; KATZ, Shauna; BALLY-CUIF, Laure. miR-9: a versatile regulator of neurogenesis. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 7, p. 220, 2013.
- COSTENBADER, Karen H. et al. Genes, epigenetic regulation and environmental factors: which is the most relevant in developing autoimmune diseases?. **Autoimmunity reviews**, v. 11, n. 8, p. 604-609, 2012.
- CRAMPTON, Steve P.; MORAWSKI, Peter A.; BOLLAND, Silvia. Linking susceptibility genes and pathogenesis mechanisms using mouse models of systemic lupus erythematosus. **Disease Models & Mechanisms**, v. 7, n. 9, p. 1033-1046, 2014.
- DAI, Rujuan; AHMED, S. Ansar. MicroRNA, a new paradigm for understanding immunoregulation, inflammation, and autoimmune diseases. **Translational Research**, v. 157, n. 4, p. 163-179, 2011.
- DAI, Y. et al. Microarray analysis of microRNA expression in peripheral blood cells of systemic lupus erythematosus patients. **Lupus**, v. 16, n. 12, p. 939-946, 2007.
- DAI, Yong et al. Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in renal biopsies of lupus nephritis patients. **Rheumatology international**, v. 29, n. 7, p. 749-754, 2009.
- DENLI, Ahmet M. et al. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. **Nature**, v. 432, n. 7014, p. 231-235, 2004.
- DIDONATO, Joseph A.; MERCURIO, Frank; KARIN, Michael. NF- $\kappa$ B and the link between inflammation and cancer. **Immunological reviews**, v. 246, n. 1, p. 379-400, 2012.
- DORIA, Andrea et al. SLE diagnosis and treatment: when early is early. **Autoimmunity reviews**, v. 10, n. 1, p. 55-60, 2010..
- DRAKOULOGLONA, O. et al. The outcome of patients with lupus nephritis and the impact of cardiovascular risk factors. **Current health sciences journal**, v. 37, n. 2, p. 70, 2011.
- DRENKARD, Cristina; ALARCÓN-SEGOVIA, Donato. The new prognosis of systemic lupus erythematosus: treatment-free remission and decreased mortality

- and morbidity. **The Israel Medical Association journal: IMAJ**, v. 2, n. 5, p. 382-387, 2000.
- ESSANDOH, Kobina; FAN, Guo-Chang. Role of extracellular and intracellular microRNAs in sepsis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1842, n. 11, p. 2155-2162, 2014.
- FAURSCHOU, Mikkel et al. Prognostic factors in lupus nephritis: diagnostic and therapeutic delay increases the risk of terminal renal failure. **The Journal of rheumatology**, v. 33, n. 8, p. 1563-1569, 2006.
- FERNANDES, Helena; BRITO, Iva. Juvenile systemic lupus erythematosus: neuropsychiatric manifestations. **Acta Reumatol Port**, v. 37, n. 2, p. 117-125, 2012.
- FILIPOWICZ, Witold; BHATTACHARYYA, Suvendra N.; SONENBERG, Nahum. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?. **Nature reviews genetics**, v. 9, n. 2, p. 102-114, 2008.
- FU, Tian-Min et al. Mechanism of ubiquitin transfer promoted by TRAF6. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 8, p. 1783-1788, 2018.
- GAO, Zeqian et al. MicroRNA roles in the NF- $\kappa$ B signaling pathway during viral infections. **BioMed research international**, v. 2014, 2014.
- GEE, H. E. et al. The small-nucleolar RNAs commonly used for microRNA normalisation correlate with tumour pathology and prognosis. **British journal of cancer**, v. 104, n. 7, p. 1168-1177, 2011.
- GERGIANAKI, Irini; BERTSIAS, George. Systemic lupus erythematosus in primary care: an update and practical messages for the general practitioner. **Frontiers in medicine**, v. 5, p. 161, 2018.
- GHEITH, Rasha E. et al. Juvenile and juvenile-onset systemic lupus erythematosus patients: clinical characteristics, disease activity and damage. **Egyptian Pediatric Association Gazette**, v. 65, n. 2, p. 49-53, 2017.
- GIANNOULI, Stavroula et al. Anaemia in systemic lupus erythematosus: from pathophysiology to clinical assessment. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 65, n. 2, p. 144-148, 2006.
- GRIMALDI, Christine M. Sex and systemic lupus erythematosus: the role of the sex hormones estrogen and prolactin on the regulation of autoreactive B cells. **Current opinion in rheumatology**, v. 18, n. 5, p. 456-461, 2006.
- GU, Ling; WANG, Qiang; SUN, Qing-Yuan. Histone modifications during mammalian oocyte maturation: dynamics, regulation and functions. **Cell cycle**, v. 9, n. 10, p. 1942-1950, 2010.
- Gu, Shuo et al. Biological basis for restriction of microRNA targets to the 3' untranslated region in mammalian mRNAs. **Nature structural & molecular biology**, v. 16, n. 2, p. 144, 2009.
- GURURAJAN, Murali et al. MicroRNA 125b inhibition of B cell differentiation in germinal centers. **International immunology**, v. 22, n. 7, p. 583-592, 2010.
- HAHN, Bevra H. et al. American College of Rheumatology guidelines for screening, treatment, and management of lupus nephritis. **Arthritis care & research**, v. 64, n. 6, p. 797-808, 2012.
- HAHN, Bevra Hannahs. Systemic lupus erythematosus and accelerated atherosclerosis. **New England Journal of Medicine**, v. 349, n. 25, p. 2379-2380, 2003.
- HAN, Jinju et al. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. **Genes & development**, v. 18, n. 24, p. 3016-3027, 2004.

- HEDRICH, Christian M.; TSOKOS, George C. Epigenetic mechanisms in systemic lupus erythematosus and other autoimmune diseases. **Trends in molecular medicine**, v. 17, n. 12, p. 714-724, 2011.
- HEEGAARD, Niels HH et al. Circulating extracellular microRNA in systemic autoimmunity. In: **Circulating microRNAs in Disease Diagnostics and their Potential Biological Relevance**. Springer, Basel, 2015. p. 171-195.
- HOCHBERG, Marc C. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. **Arthritis and rheumatism**, v. 40, n. 9, p. 1725-1725, 1997.
- HRUSKOVA, Veronika et al. MicroRNA-125b: association with disease activity and the treatment response of patients with early rheumatoid arthritis. **Arthritis research & therapy**, v. 18, n. 1, p. 1-8, 2016.
- HUSAKOVA, Marketa. MicroRNAs in the key events of systemic lupus erythematosus pathogenesis. **Biomedical Papers of the Medical Faculty of Palacky University in Olomouc**, v. 160, n. 3, 2016.
- ILLEI, G. G. et al. Renal flares are common in patients with severe proliferative lupus nephritis treated with pulse immunosuppressive therapy: long-term followup of a cohort of 145 patients participating in randomized controlled studies. **Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology**, v. 46, n. 4, p. 995-1002, 2002.
- JAYBHAYE, Amol P. et al. Juvenile systemic lupus erythematosus: A diagnostic dilemma. **Journal of natural science, biology, and medicine**, v. 2, n. 2, p. 229, 2011.
- KHAJEZADEH, Mohammad-Amin et al. Neuropsychiatric involvement in juvenile-onset systemic lupus erythematosus. **Neurology research international**, v. 2018, 2018.
- KIM, Sang-Woo et al. MicroRNAs miR-125a and miR-125b constitutively activate the NF- $\kappa$ B pathway by targeting the tumor necrosis factor alpha-induced protein 3 (TNFAIP3, A20). **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 20, p. 7865-7870, 2012.
- KUHN, Annegret; LANDMANN, Aysche. The classification and diagnosis of cutaneous lupus erythematosus. **Journal of autoimmunity**, v. 48, p. 14-19, 2014.
- LALANI, Almin I. et al. TRAF molecules in inflammation and inflammatory diseases. **Current pharmacology reports**, v. 4, n. 1, p. 64-90, 2018.
- LASHINE, Y. A. et al. Paediatric rheumatology. **Clinical and experimental rheumatology**, v. 29, p. 351-357, 2011.
- LEE, Rosalind C.; FEINBAUM, Rhonda L.; AMBROS, Victor. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. **cell**, v. 75, n. 5, p. 843-854, 1993.
- LEUNG, Patrick SC et al. Development and validation of gene therapies in autoimmune diseases: epidemiology to animal models. **Autoimmunity reviews**, v. 9, n. 5, p. A400-A405, 2010.
- LEUNG, Patrick SC et al. Gene therapy in autoimmune diseases: challenges and opportunities. **Autoimmunity reviews**, v. 9, n. 3, p. 170-174, 2010.
- LI, Tian et al. miR-146a regulates the function of Th17 cell differentiation to modulate cervical cancer cell growth and apoptosis through NF- $\kappa$ B signaling by targeting TRAF6. **Oncology reports**, v. 41, n. 5, p. 2897-2908, 2019.
- LIANG, Matthew H. et al. Reliability and validity of six systems for the clinical assessment of disease activity in systemic lupus erythematosus. **Arthritis &**

- Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology**, v. 32, n. 9, p. 1107-1118, 1989.
- LIU, Chau-Ching et al. Biomarkers in systemic lupus erythematosus: challenges and prospects for the future. **Therapeutic advances in musculoskeletal disease**, v. 5, n. 4, p. 210-233, 2013.
- LIU, Dongmei et al. MicroRNA expression profiles of peripheral blood mononuclear cells in patients with systemic lupus erythematosus. **Acta histochemica**, v. 116, n. 5, p. 891-897, 2014.
- LUO, Xiaofang et al. The role of miR-125b in T lymphocytes in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. **Clin Exp Rheumatol**, v. 31, n. 2, p. 263-71, 2013.
- MA, Xiaodong et al. MicroRNAs in NF- $\kappa$ B signaling. **Journal of molecular cell biology**, v. 3, n. 3, p. 159-166, 2011.
- MACK, George S. MicroRNA gets down to business. **Nature biotechnology**, v. 25, n. 6, p. 631-638, 2007.
- MAIDHOF, William; HILAS, Olga. Lupus: an overview of the disease and management options. **Pharmacy and Therapeutics**, v. 37, n. 4, p. 240, 2012.
- MALATTIA, Clara; MARTINI, Alberto. Paediatric-onset systemic lupus erythematosus. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**, v. 27, n. 3, p. 351-362, 2013.
- MARKS, S. D. et al. The use of the British Isles Lupus Assessment Group (BILAG) index as a valid tool in assessing disease activity in childhood-onset systemic lupus erythematosus. **Rheumatology**, v. 43, n. 9, p. 1186-1189, 2004.
- MESQUITA JÚNIOR, Danilo et al. Sistema imunitário-parte II: fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. *Revista Brasileira de Reumatologia*, v. 50, p. 552-580, 2010.
- MINA, Rina; BRUNNER, Hermine I. Pediatric lupus—are there differences in presentation, genetics, response to therapy, and damage accrual compared with adult lupus?. **Rheumatic Disease Clinics**, v. 36, n. 1, p. 53-80, 2010.
- MINA, Rina; BRUNNER, Hermine I. Update on differences between childhood-onset and adult-onset systemic lupus erythematosus. **Arthritis research & therapy**, v. 15, n. 4, p. 1-9, 2013.
- MORGAN, Jonathan J.; MCAVERA, Roisin M.; CRAWFORD, Lisa J. TRAF6 silencing attenuates multiple myeloma cell adhesion to bone marrow stromal cells. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 3, p. 702, 2019.
- MUDD, P. A.; TEAGUE, B. N.; FARRIS, A. D. Regulatory T cells and systemic lupus erythematosus. **Scandinavian journal of immunology**, v. 64, n. 3, p. 211-218, 2006.
- MUNOZ, Luis E. et al. The role of defective clearance of apoptotic cells in systemic autoimmunity. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 6, n. 5, p. 280-289, 2010.
- MURASHIMA, A. et al. Long term prognosis of children born to lupus patients. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 63, n. 1, p. 50-53, 2004.
- MURPHY, Amy J.; GUYRE, Paul M.; PIOLI, Patricia A. Estradiol suppresses NF- $\kappa$ B activation through coordinated regulation of let-7a and miR-125b in primary human macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 184, n. 9, p. 5029-5037, 2010.
- NAKASHIMA, Carlos Alberto Kenji et al. Incidence and clinical-laboratory aspects of systemic lupus erythematosus in a Southern Brazilian city. **Revista brasileira de reumatologia**, v. 51, p. 235-239, 2011.
- NASCIMENTO, Sabrina; SUAREZ, Eloah Rabello; PINHAL, Maria Aparecida da Silva. Tecnologia de PCR e RT-PCR em tempo real e suas aplicações na área médica. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 67, p. 7-19, 2010.

- Sabrina; Suarez, Eloah Rabello; Pinhal, Maria Aparecida da Silva (2010). Tecnologia de PCR e RT-PCR em tempo real e suas aplicações na área médica. *Revista Brasileira de Medicina*, v. 67, p. 7-19.
- NIE, Kui et al. MicroRNA-mediated down-regulation of PRDM1/Blimp-1 in Hodgkin/Reed-Sternberg cells: a potential pathogenetic lesion in Hodgkin lymphomas. **The American journal of pathology**, v. 173, n. 1, p. 242-252, 2008.
- O'CONNELL, Ryan M.; RAO, Dinesh S.; BALTIMORE, David. microRNA regulation of inflammatory responses. **Annual review of immunology**, v. 30, p. 295-312, 2012.
- OKAMURA, Katsutomo et al. The regulatory activity of microRNA\* species has substantial influence on microRNA and 3' UTR evolution. **Nature structural & molecular biology**, v. 15, n. 4, p. 354-363, 2008.
- OLOWU, Wasiu. Childhood-onset systemic lupus erythematosus. **Journal of the national medical association**, v. 99, n. 7, p. 777, 2007.
- OOI, Steen KT et al. Dynamic instability of genomic methylation patterns in pluripotent stem cells. **Epigenetics & chromatin**, v. 3, n. 1, p. 1-10, 2010.
- PATEL, Raksha M.; MARFATIA, Y. S. Lupus panniculitis as an initial manifestation of systemic lupus erythematosus. **Indian journal of dermatology**, v. 55, n. 1, p. 99, 2010.
- PATHAK, Simanta; MOHAN, Chandra. Cellular and molecular pathogenesis of systemic lupus erythematosus: lessons from animal models. **Arthritis research & therapy**, v. 13, n. 5, p. 1-9, 2011.
- PAULEY, Kaleb M.; CHA, Seunghee; CHAN, Edward KL. MicroRNA in autoimmunity and autoimmune diseases. **Journal of autoimmunity**, v. 32, n. 3-4, p. 189-194, 2009.
- PEKOW, Joel R.; KWON, John H. MicroRNAs in inflammatory bowel disease. **Inflammatory bowel diseases**, v. 18, n. 1, p. 187-193, 2012.
- PETRI, Michelle et al. Derivation and validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. **Arthritis & Rheumatism**, v. 64, n. 8, p. 2677-2686, 2012.
- PINHEIRO, S. V. B., et al. Pediatric lupus nephritis. **Brazilian Journal of Nephrology**, (AHEAD), 2018.
- PLAISANCE, Valérie et al. MicroRNA-9 controls the expression of Granuphilin/Slp4 and the secretory response of insulin-producing cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 37, p. 26932-26942, 2006.
- RAJASEKHAR, Liza. Neurolupus: still an enigma?. **Indian Journal of Rheumatology**, v. 2, n. 5, p. 57-58, 2010.
- RASHEED, Zafar et al. MicroRNA-125b-5p regulates IL-1 $\beta$  induced inflammatory genes via targeting TRAF6-mediated MAPKs and NF- $\kappa$ B signaling in human osteoarthritic chondrocytes. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-13, 2019.
- ROBINSON, Marcia; SHEETS COOK, Sarah; CURRIE, Leanne M. Systemic lupus erythematosus: a genetic review for advanced practice nurses. **Journal of the American Academy of Nurse Practitioners**, v. 23, n. 12, p. 629-637, 2011.
- SANTOS-ARAÚJO, Carla; PESTANA, Manuel. Lupus nephritis treatment. **Acta medica portuguesa**, v. 21, n. 3, p. 259-272, 2008.
- SASIDHARAN, P. K.; BINDYA, M.; SAJEETH KUMAR, K. G. Hematological manifestations of SLE at initial presentation: is it underestimated?. **International Scholarly Research Notices**, v. 2012, 2012.
- SATAKE, Eiichiro et al. Circulating miRNA profiles associated with hyperglycemia in patients with type 1 diabetes. **Diabetes**, v. 67, n. 5, p. 1013-1023, 2018.

- SCHMITTGEN, Thomas D. Regulation of microRNA processing in development, differentiation and cancer. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 12, n. 5b, p. 1811-1819, 2008.
- SCHMUGGE, Markus et al. Thrombocytopenia and thromboembolism in pediatric systemic lupus erythematosus. **The Journal of pediatrics**, v. 143, n. 5, p. 666-669, 2003.
- SCOFIELD, R. Hal et al. Klinefelter's syndrome (47, XXY) in male systemic lupus erythematosus patients: support for the notion of a gene-dose effect from the X chromosome. **Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology**, v. 58, n. 8, p. 2511-2517, 2008.
- SELMI, Carlo; TSUNEYAMA, Koichi. Nutrition, geoepidemiology, and autoimmunity. **Autoimmunity reviews**, v. 9, n. 5, p. A267-A270, 2010.
- SILVA, Helker Albuquerque Macedo da. Polimorfismos de base única em genes de interleucinas no lúpus eritematoso. 2014.
- SINGH, Sunit K. et al. MicroRNAs—micro in size but macro in function. **The FEBS journal**, v. 275, n. 20, p. 4929-4944, 2008.
- SONKOLY, E.; PIVARCSI, A. Advances in microRNAs: implications for immunity and inflammatory diseases. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 13, n. 1, p. 24-38, 2009.
- STICHWEH, D.; PASCUAL, V. Lupus eritematoso sistémico pediátrico. In: **Anales de pediatria**. Elsevier Doyma, 2005. p. 321-329.
- SU, Yu-Jih et al. Next generation sequencing identifies miRNA-based biomarker panel for lupus nephritis. **Oncotarget**, v. 9, n. 46, p. 27911, 2018.
- SULTAN, S. M.; BEGUM, S.; ISENBERG, D. A. Prevalence, patterns of disease and outcome in patients with systemic lupus erythematosus who develop severe haematological problems. **Rheumatology**, v. 42, n. 2, p. 230-234, 2003.
- SUN, Ying et al. A novel mechanism of control of NFκB activation and inflammation involving A2B adenosine receptors. **Journal of cell science**, v. 125, n. 19, p. 4507-4517, 2012.
- SUN, Yu-Meng; LIN, Kang-Yu; CHEN, Yue-Qin. Diverse functions of miR-125 family in different cell contexts. **Journal of hematology & oncology**, v. 6, n. 1, p. 1-8, 2013.
- SZYMANIK-GRZELAK, Hanna et al. Lupus nephritis in children—10 years' experience. **Central-European journal of immunology**, v. 41, n. 3, p. 248, 2016.
- TERUEL, Maria; ALARCÓN-RIQUELME, Marta E. The genetic basis of systemic lupus erythematosus: what are the risk factors and what have we learned. **Journal of autoimmunity**, v. 74, p. 161-175, 2016.
- TIFFIN, Nicki; ADEYEMO, Adebowale; OKPECHI, Ikechi. A diverse array of genetic factors contribute to the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. **Orphanet journal of rare diseases**, v. 8, n. 1, p. 1-8, 2013.
- TILI, Esmerina et al. MicroRNAs, the immune system and rheumatic disease. **Nature clinical practice Rheumatology**, v. 4, n. 10, p. 534-541, 2008.
- TILI, Esmerina et al. The down-regulation of miR-125b in chronic lymphocytic leukemias leads to metabolic adaptation of cells to a transformed state. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 120, n. 13, p. 2631-2638, 2012.
- TOBÓN, Gabriel J. et al. Are autoimmune diseases predictable?. **Autoimmunity reviews**, v. 11, n. 4, p. 259-266, 2012.
- VARGAS, Karinna Soares; ROMANO, Marco Aurélio. Lúpus eritematoso sistémico: aspectos epidemiológicos e diagnóstico. **Revista Salus**, v. 3, n. 1, p. 79-94, 2009.

- VILAR, MJ Pereira; SATO, E. I. Estimating the incidence of systemic lupus erythematosus in a tropical region (Natal, Brazil). **Lupus**, v. 11, n. 8, p. 528-532, 2002.
- VINUESA, Carola G.; RIGBY, Robert J.; YU, Di. Logic and extent of miRNA-mediated control of autoimmune gene expression. **International reviews of immunology**, v. 28, n. 3-4, p. 112-138, 2009.
- WALSH, Matthew C.; LEE, JangEun; CHOI, Yongwon. Tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF 6) regulation of development, function, and homeostasis of the immune system. **Immunological reviews**, v. 266, n. 1, p. 72-92, 2015.
- WANG, Dandan et al. Umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation in active and refractory systemic lupus erythematosus: a multicenter clinical study. **Arthritis research & therapy**, v. 16, n. 2, p. 1-14, 2014.
- WANG, Silu et al. Reduction in miRNA-125b-5p levels is associated with obstructive renal injury. **Biomedical reports**, v. 6, n. 4, p. 449-454, 2017.
- WEBB, Ryan et al. Early disease onset is predicted by a higher genetic risk for lupus and is associated with a more severe phenotype in lupus patients. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 70, n. 1, p. 151-156, 2011.
- WERTH, Victoria P. Clinical manifestations of cutaneous lupus erythematosus. **Autoimmunity reviews**, v. 4, n. 5, p. 296-302, 2005.
- WILLIMOTT, Shaun; WAGNER, Simon D. miR-125b and miR-155 contribute to BCL2 repression and proliferation in response to CD40 ligand (CD154) in human leukemic B-cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 4, p. 2608-2617, 2012.
- XIE, Ping. TRAF molecules in cell signaling and in human diseases. **Journal of molecular signaling**, v. 8, n. 1, p. 1-31, 2013.
- XU, Liang et al. MicroRNA-9 influence lupus nephritis by targeting STK3 related MAPK signaling transduction pathway. **Int J Clin Exp Pathol**, v. 10, n. 3, p. 2784-2793, 2017.
- YU, H.-H. et al. Lymphopenia is associated with neuropsychiatric manifestations and disease activity in paediatric systemic lupus erythematosus patients. **Rheumatology**, v. 46, n. 9, p. 1492-1494, 2007.
- Yun, D., & Stein, S. L. Review of the cutaneous manifestations of autoimmune connective tissue diseases in pediatric patients. **World Journal of Dermatology**, 4(2), 80-94, 2015.
- YUVA-AYDEMIR, Yeliz et al. MicroRNA-9: functional evolution of a conserved small regulatory RNA. **RNA biology**, v. 8, n. 4, p. 557-564, 2011.
- ZHOU, Xuyu et al. Selective miRNA disruption in T reg cells leads to uncontrolled autoimmunity. **The Journal of experimental medicine**, v. 205, n. 9, p. 1983-1991, 2008.
- ZHU, Jia; WU, Fengqi; HUANG, Xiaolan. Age-related differences in the clinical characteristics of systemic lupus erythematosus in children. **Rheumatology international**, v. 33, n. 1, p. 111-115, 2013.
- ZHU, Jia et al. High expression levels of microRNA-629, microRNA-525-5p and microRNA-516a-3p in paediatric systemic lupus erythematosus. **Clinical rheumatology**, v. 33, n. 6, p. 807-815, 2014.
- ZIMMERMANN, Adriana Fontes. Lupus eritematoso sistêmico: perfil demográfico, clínico e auto-imune de 90 pacientes do Sul do Brasil, 1997.

# APÊNDICE A: COMITÊ DE ÉTICA DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO



UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
PERNAMBUCO CENTRO DE  
CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE



## DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** "COMPARAÇÃO DO PERFIL GENÔMICO DE  
PACIENTES BRASILEIROS COM LÚPUS ERITEMATOSO  
SISTÊMICO JUVENIL E ADULTO"

**Pesquisador:** PAULA SANDRIN GARCIA

Área Temática:

Versão: 1

**CAAE:** 50139415.8.0000.5208

**Instituição Proponente:** Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

## DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.348.987

### **Apresentação do Projeto:**

Projeto da área de Genética Humana, buscando identificar fatores hereditários de risco para Lúpus, através de estudos familiares e de associação.

### **Objetivo da Pesquisa:**

Caracterizar o perfil de variações genéticas de risco para Lúpus em pacientes e em controles.

### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Risco pequeno referente à coleta de amostra para extração de DNA.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trabalho relevante na área e importante para o melhor entendimento do perfil molecular de pacientes locais.

### **Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Todos os documentos em ordem.

### **Recomendações:**

Aprovação

**Endereço:** Av. da Engenharia S/Nº - 1º andar, sala 4, Prédio CCS

**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600

**UF:** PE **Município:** Recife **E-mail:** cepccs@ufpe.br

**Telefone:** (81) 2126-8588



UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
PERNAMBUCO CENTRO DE  
CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE



Continuação do Parecer: 1.348.987

### **Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Aprovação

### **Considerações Finais a critério do CEP:**

O Protocolo foi avaliado na reunião do CEP e está APROVADO para iniciar a coleta de dados. Informamos que a APROVAÇÃO DEFINITIVA do projeto só será dada após o envio do Relatório Final da pesquisa. O pesquisador deverá fazer o download do modelo de Relatório Final para enviá-lo via “Notificação”, pela Plataforma Brasil. Siga as instruções do link “Para enviar Relatório Final”, disponível no site do CEP/CCS/UFPE. Após apreciação desse relatório, o CEP emitirá novo Parecer Consubstanciado definitivo pelo sistema Plataforma Brasil.

Informamos, ainda, que o (a) pesquisador (a) deve desenvolver a pesquisa conforme delineada neste protocolo aprovado, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao voluntário participante (item V.3., da Resolução CNS/MS Nº 466/12).

Eventuais modificações nesta pesquisa devem ser solicitadas através de EMENDA ao projeto, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

Para projetos com mais de um ano de execução, é obrigatório que o pesquisador responsável pelo Protocolo de Pesquisa apresente a este Comitê de Ética relatórios parciais das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação (item X.1.3.b., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). O CEP/CCS/UFPE deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (item V.5., da Resolução CNS/MS Nº 466/12)

Continuação do Parecer: 1.348.987

É papel do/a pesquisador/a assegurar todas as medidas imediatas e adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e ainda, enviar notificação à ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, junto com seu posicionamento.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_585607.pdf	16/10/2015 12:20:48		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Lupus_Juvenil.docx	16/10/2015 12:20:30	PAULA SANDRIN GARCIA	Aceito
Outros	Virginia_Paes_Leme_Ferriani.docx	08/10/2015 13:35:10	PAULA SANDRIN GARCIA	Aceito
Outros	Sergio_Crovella.docx	08/10/2015 13:34:53	PAULA SANDRIN GARCIA	Aceito

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Outros	Ronald_Rodrigues_Moura.docx	13:33:26	GARCIA	Aceito
Outros	Paula_Sandrin_Garcia.docx	08/10/2015 13:33:13	PAULA SANDRIN GARCIA	Aceito
Outros	Jaqueline_Azevedo_Silva.docx	08/10/2015 13:32:56	PAULA SANDRIN GARCIA	Aceito
Outros	Eduardo_Antonio_Donadi.docx	08/10/2015 13:32:27	PAULA SANDRIN GARCIA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TALE.docx	08/10/2015 13:25:09	PAULA SANDRIN GARCIA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_menores_18anos.docx	08/10/2015 13:16:57	PAULA SANDRIN GARCIA	Aceito
Outros	Anuencia_FMRP.pdf	08/10/2015 13:12:31	PAULA SANDRIN GARCIA	Aceito
Outros	Anuencia_LIKA.pdf	08/10/2015 13:12:02	PAULA SANDRIN GARCIA	Aceito
Folha de Rosto	FOLHA_ROSTO.pdf	08/10/2015 13:11:42	PAULA SANDRIN GARCIA	Aceito



UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
PERNAMBUCO CENTRO DE  
CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE



Continuação do Parecer: 1.348.987

**Situação do Parecer:**

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RECIFE, 03 de Dezembro de 2015.

---

**LUCIANO TAVARES MONTENEGRO**  
(Coordenador)

**Endereço:** Av. da Engenharia S/Nº - 1º andar, sala 4, Prédio CCS

**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600

**UF:** PE **Município:** Recife **E-mail:** cepccs@ufpe.br

**Telefone:** (81) 2126-8588

## APÊNDICE B: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(PARA RESPONSÁVEL LEGAL PELO MENOR DE 18 ANOS - Resolução 466/12)

Solicitamos a sua autorização para convidar o (a) seu/sua filho (a) \_\_\_\_\_ ou menor que está sob sua responsabilidade} para participar, como voluntário (a), da pesquisa **"COMPARAÇÃO DO PERFIL GENÔMICO DE PACIENTES BRASILEIROS COM LÚPUS**

**ERITEMATOSO SISTÊMICO JUVENIL E ADULTO"**. Esta pesquisa é da responsabilidade da pesquisadora Paula Sandrin Garcia, do Departamento de Genética da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av Moraes Rego 1235, Cidade Universitária, Recife, Brasil. Também participam desta pesquisa a médica pesquisadora: Virgínia Paes Leme Ferriani; Telefones para contato: (016) 3602 2479; e-mail: vplferri@fmrp.usp.br.

Caso este Termo de Consentimento contenha informações que não lhe sejam compreensíveis, as dúvidas podem ser tiradas com a pessoa que está lhe entrevistando e apenas ao final, quando todos os esclarecimentos forem dados, caso concorde que o (a) menor faça parte do estudo pedimos que rubriche as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias, uma via lhe será entregue e a outra ficará com o pesquisador responsável.

Caso não concorde, não haverá penalização nem para o (a) Sr.(a) nem para o/a voluntário/a que está sob sua responsabilidade, bem como será possível ao/a Sr. (a) retirar o consentimento a qualquer momento, também sem nenhuma penalidade.

**Riscos:** Os possíveis riscos que este tipo de estudo pode trazer são: constrangimento (durante as respostas das questões da entrevista) e desconforto (devido a duração das perguntas e coleta de 5ml sangue). As coletas serão feitas por profissionais competentes e devidamente treinados para reduzir os riscos para o paciente. Porém, as perguntas poderão ser interrompidas no momento em que o (a) senhor (a) desejar.

**Benefícios:** Este estudo proporcionará grandes benefícios aos seus participantes, pois através das fichas de avaliação e resultados do estudo genético, o (a) paciente poderá ser beneficiado (a) com um diagnóstico mais detalhado da Doença AR e o esclarecimento da existência ou não do envolvimento genético da doença, o que permite aconselhamento genético.

**Participação Voluntária:** A participação é voluntária, ou seja, o(a) senhor(a) não receberá nenhum tipo de pagamento para participar desta pesquisa.

Todas as informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. Os dados coletados nesta pesquisa como as fotos ficarão armazenados em pastas de arquivo, sob responsabilidade dos médicos pesquisadores.

Se o(a) senhor(a) concordar em colaborar voluntariamente com a pesquisa e se não tiver nenhuma dúvida, gostaríamos que assinasse este termo. Mesmo assinando, o (a) senhor (a) poderá recusar e/ou retirar o consentimento de participar da pesquisa a qualquer momento sem prejuízo para ambas as partes.

Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: (Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: [cepccs@ufpe.br](mailto:cepccs@ufpe.br)).

Endereço do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP: Campus Universitário Bairro: Monte Alegre CEP:14048-900 Ribeirão Preto- SP. Fone: 016 3602 2228 Fax: 016 3633 1144 E-mail: [cep@hcrp.usp.br](mailto:cep@hcrp.usp.br)

\_\_\_\_\_  
Dra. Virgínia Paes Leme Ferriani

### CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO (A)

Eu, \_\_\_\_\_, CPF \_\_\_\_\_, abaixo assinado, responsável por \_\_\_\_\_, autorizo a sua participação no estudo "**COMPARAÇÃO DO PERFIL GENÔMICO DE PACIENTES BRASILEIROS COM LÚPUS**

**ERITEMATOSO SISTÊMICO JUVENIL E ADULTO**", como voluntário(a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pelo (a) pesquisador (a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes da participação dele (a). Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade (ou interrupção de seu acompanhamento/ assistência/tratamento) para mim ou para o (a) menor em questão.

Local e data \_\_\_\_\_

Assinatura do (da) responsável: \_\_\_\_\_

Local e data \_\_\_\_\_

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e o aceite do voluntário em participar. (02 testemunhas não ligadas à equipe de pesquisadores):

Testemunhas: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Pesquisador: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_