

**Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Genética**

Diego Santana Jerônimo da Silva

**Perfil de Expressão dos genes da Via WNT de Sinalização
em indivíduos com Nefrite Lúpica sob tratamento com
imunossupressores: Estudo Prospectivo**

**Recife
2023**

Diego Santana Jerônimo da Silva

**Perfil de Expressão dos genes da Via WNT de Sinalização
em indivíduos com Nefrite Lúpica sob tratamento com
imunossupressores: Estudo Prospectivo**

Dissertação 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.

Orientador: Paula Sandrin Garcia

Coorientador: Camilla Albertina Dantas de Lima

Recife

2023

Catálogo na Fonte
Bibliotecário: Marcos Antonio Soares da Silva
CRB4/1381

Silva, Diego Santana Jerônimo da

Perfil de expressão dos genes da via WNT de sinalização em indivíduos com nefrite lúpica sobre tratamento com imunossupressores: estudo prospectivo. / Diego Santana Jerônimo da Silva. – 2023.

81 f. : il., fig.; tab.

Orientadora: Paula Sandrin Garcia.

Coorientadora: Camilla Albertina Dantas de Lima.

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco, 2023.

Inclui referências e anexos.

1. Autoimunidade. 2. β catenina. 3. DKK1. 4. Glomerulopatias. 5. Lúpus eritematoso sistêmico. I. Garcia, Paula Sandrin (Orient.). II. Lima, Camilla Albertina Dantas de (Coorient.). III. Título.

576.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2024-099

Diego Santana Jerônimo da Silva

Perfil de Expressão dos genes da Via WNT de Sinalização em indivíduos com Nefrite Lúpica sob tratamento com imunossupressores: Estudo Prospectivo

Aprovado em 28/02/2023

Banca Examinadora:

Dra. Paula Sandrin Garcia

Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Rafael Lima Guimarães

Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Ronaldo Celerino

Instituto Aggeu Magalhães, FIOCRUZ-PE

Dra. Denise Maria do Nascimento Costa

Universidade Federal de Pernambuco

Recife

2023

Agradecimentos

Agradeço a **Deus**, primeiramente, por ter me dado toda força e determinação para vencer cada desafio diário, por me proporcionar chegar até aqui e pela sabedoria e saúde a mim concedidas.

Aos meus pais, **Josefa Eunice** e **Ivanido Jerônimo**, por todo carinho e apoio dado, nos momentos tristes e felizes do percurso, seja me escutando, consolando, incentivando ou comemorando comigo; Me ajudando sempre que possível, eles fizeram mais do que o seu limite para que eu chegasse até aqui. Agradeço também a todos os meus **irmãos**, em especial a **Iranilda Maria**, que me auxiliaram e me incentivaram a todo momento. Agradeço a toda minha **família** pelo carinho e esforço compartilhado.

Às minhas orientadoras **Prof. Dra. Paula Sandrin Garcia** e **Dra. Camilla Albertina Dantas de Lima** por acreditarem em mim, por ter investido tempo e dedicação para me orientar e colaborar no desenvolvimento das diversas atividades laboratoriais, nas quais desenvolvi minhas habilidades científicas.

Além disso, agradeço à toda equipe do grupo **PATGEN** e do **LIKA** pelo respeito no trabalho, dedicação e empenho nas atividades, além das colaborações. Gostaria de agradecer especialmente a **Jessyca Kalynne**, uma grande amiga, que me deu auxílio em muitos momentos difíceis nessa caminhada do mestrado.

Agradeço também a todas as pessoas que eu consegui conhecer no ambiente formativo da pós-graduação, durante as aulas e em discussões. Essas pessoas com certeza ampliaram a minha visão de mundo e contribuíram no meu processo formativo.

Gostaria de agradecer também a meus amigos que compartilharam momentos muito importantes durante essa caminhada na pós-graduação, dentre esses: **Leandro de Lima, Ingrid Florêncio, Thaís Emmanuely, Everton da Mata, Ana Carolina, Luana Calado, Lívia Claudino, Tayná Lima, Lethicia Aguiar e Renata Lima.**

Agradeço a todos os **pacientes voluntários** desta pesquisa, pois sem eles não haveria pesquisa alguma. É por saber de sua luta diária contra uma doença tão complexa como é o Lúpus Nefrite que nós nos empenhamos para entender cada dia mais os seus mecanismos.

E, por fim, Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por financiar uma bolsa para auxiliar no meu processo de formação durante o período.

Resumo

A Nefrite Lúpica (NL) é uma das características clínicas mais comuns do Lúpus Eritematoso Sistêmico atingindo até 70% dos pacientes. Além disso, é o sintoma que mais provoca morbimortalidade nesses indivíduos. A busca por um biomarcador específico que consiga prever a resposta e o direcionamento do tratamento da NL é um desafio para a clínica. Entre os propostos, fatores genéticos associados a resposta inflamatória têm sido amplamente estudados. Nesse contexto, a Via WNT β catenina tem sido apontada com papel importante nas doenças inflamatórias e autoimunes. Desse modo, o presente trabalho analisou o perfil de expressão gênica de genes da via WNT de sinalização em quatro diferentes momentos durante o primeiro ano de tratamento da NL, em um estudo prospectivo. Para isso, foi selecionada uma coorte de 14 pacientes, de acordo com os critérios metodológicos de seleção. A população foi caracterizada por critérios clínico-laboratoriais e realizadas análises de expressão gênica do sangue periférico. Nossos resultados demonstraram que a dosagem de C3 ($p=0,0119$) e C4 ($p=0,0117$) apresentaram aumento significativo após seis meses de tratamento ($p=0,0466$) e o SLEDAI, redução significativa após nove ($p=0,0191$). Nas análises de expressão gênica, apenas o *WNT16* aumentou significativamente entre o diagnóstico e 3 meses após o segmento da terapia ($p=0,0078$). A partir das análises, o estudo indica que o gene *WNT16* pode ser um indicador de resposta ao tratamento, participando principalmente no momento de indução à terapia.

Palavras-chave: Autoimunidade; β catenina; DKKI; Glomerulopatias; Lúpus Eritematoso sistêmico.

Abstract

Lupus nephritis (LN) is one of the most common clinical features of Systemic Lupus Erythematosus and affects up to 70% of patients. In addition, it is one of the symptoms that most cause morbidity and mortality in patients with the disease. The search for a specific biomarker that can predict the response and direction of LN treatment is a challenge for the clinic. Among the proposed biomarkers, genetic factors associated with inflammatory and immunological responses have been widely studied. In this context, the WNT β catenin pathway has been identified with an important role in inflammatory and autoimmune diseases. In this sense, the present study evaluated the gene expression profile of WNT signaling pathway genes at different times during the treatment of LN, through a prospective study. For this, a cohort of 14 patients was selected, according to the methodological selection criteria. The population was characterized by clinical-laboratory criteria and peripheral blood samples were collected for subsequent analysis of gene expression. The collections were performed at diagnosis and at four different moments of the treatment segment. Our results showed that the C3 ($p=0.0119$) and C4 ($p=0.0117$) dosages had a significant increase after 6 months of treatment ($p=0.0466$), and SLEDAI a significant reduction after nine months ($p=0.0119$). Furthermore, *WNT16* gene expression was significantly increased between diagnosis and 3 months after therapy segment ($p=0.0078$). No alterations were observed in the expressions of the others genes evaluated in the study in therapy segment. From the analyses, the study indicates that the *WNT16* gene can be an indicator of response to treatment, participating mainly in the moment of induction to therapy.

Key words: Autoimmunity; β catenin; DKK1; Glomerulopathies; Systemic lupus erythematosus.

Lista de Ilustrações

Figura 1 - Órgãos que podem ser afetados pelo LES.....	16
Figura 2 - Lesões de pele observadas no LES.....	17
Figura 3 - Classificação Histopatológica da Nefrite Lúpica. Classes I - VI e seus achados histopatológicos.	20
Figura 4 - Incidência e prevalência do Lúpus eritematoso sistêmico.....	22
Quadro 1 - Critérios de classificação para o LES segundo o Colégio Americano de Reumatologia.....	26
Quadro 2 - Principais exames que auxiliam no diagnóstico e acompanhamento do paciente com Lúpus.	27
Quadro 3 - Critérios SLEDAI (Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index).....	28
Figura 5 - Falhas no “ <i>clearance</i> ” dos corpos apoptóticos em indivíduos lúpicos promove liberação de auto-antígenos formando imunocomplexos que estimulam a produção de interferons. Os interferons por sua vez promovem o processo inflamatório crônico no LES.....	33
Figura 6 - Inativação e ativação da via Wnt.....	36
Figura 7 - O papel da WNT β catenina na regulação da interação entre células epiteliais tubulares, fibroblastos e macrófagos.....	38
Figura 8 - Via canônica de sinalização WNT β catenina e sua regulação extracelular.....	41
Figura 9 - Expressão Gênica dos genes da WNT β catenina. a - Expressão relativa do DKK1 (Foldchange). b - Expressão relativa do LRP5 (Foldchange).c- Expressão relativa do WNT16 (Foldchange). d - Expressão relativa do BMP2 (Foldchange). Os níveis de expressão dos grupos por tempo de tratamento estão representados. Os níveis de mRNA foram normalizados usando os genes de referência EFIA e RPLP0.....	58
Figura 10 - Expressão relativa do WNT16 (Foldchange) no T=0M e T=3M	59

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Genes relacionados ao LES na literatura e vias imunológicas.....	35
Tabela 2 - Sequências dos primers utilizados nas análises de expressão gênica do estudo	50
Tabela 3 - Caracterização epidemiológica e clínica dos pacientes da coorte de estudo	52
Tabela 4 - Características Histopatológicas das Biópsias Renais da Coorte	53
Tabela 5 - Dados clínicos da coorte.....	56

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

Item	Definição
AINES	-Anti-inflamatórios não esteroidais
BMPs	- Proteínas morfogenéticas ósseas
CL	- Classe histológica
DKK	- Dickkopf
DKK1	- Dickkopf-1
DRC	- Doença Renal Crônica
DRCT	- Doença Renal Crônica Terminal
EULAR	-European Alliance of Associations for Rheumatology
EULAR/ACR	- European Alliance of Associations for Rheumatology/American College of Rheumatology
eTGF	- Taxa de filtração glomerular estimada
FAN	- Fator Antinuclear
GN	- Glomerulonefrite
GP	- Glomerulopatias
HLA	- Complexo de Histocompatibilidade Humana
HPCS	- Células progenitoras hematopoiéticas
HSCS	- Células-tronco hematopoiéticas
IA	- Índice de Atividade
IC	- Índice de Cronicidade
IMC	- Índice de Massa Corpórea
KDIGO	- Kidney Disease Improving Global Outcomes

LDRL	- Receptor de lipoproteína de baixa densidade
LEF1	- Fator intensificador linfóide
LES	- Lúpus Eritematoso Sistêmico
LRP	- Lipoproteína de baixa densidade
MMF	- Micofenolato de mofetila
NL	- Nefrite Lúpica
PTN 24H	- Proteinúria 24 horas
RR	- Risco Relativo
SBN	- Sociedade Brasileira de Nefrologia
SLEDAI	- Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index
SLICC	- Systemic Lupus International Collaborating Clinics
SOST	- Esclerostina
TCF 1	- Família do Fator de Células T 1
UV	- Ultravioleta

Sumário

1. Introdução	13
2. Revisão da Literatura	15
2.1 Lúpus Eritematoso Sistêmico	15
2.2 Glomerulopatias e Nefrite Lúpica	18
2.3 Epidemiologia do LES e da NL	21
2.4 Diagnóstico do LES e da Nefrite Lúpica	25
2.5 Tratamento do LES e da Nefrite Lúpica	29
2.6 Imunopatogênese do LES e da Nefrite Lúpica	31
2.7 Genética do LES e da Nefrite Lúpica	33
2.8 Via WNT βcatenina e Nefrite Lúpica	35
2.8.1 O papel das proteínas antagonistas da Via WNT βcatenina na Nefrite Lúpica: DKK1 e SOST1	39
2.8.2 O receptor LRP5 da via WNT e sua sua relação com a lesão renal	41
2.8.3 WNT2 e WNT16	43
2.8.4 A função do BMP2 como mediador nas doenças autoimunes	44
2.9 Relação da via WNT com células imunes do tecido sanguíneo na resposta autoimune e inflamatória	45
3. Objetivos	47

3.1 Objetivo geral	47
3.2 Objetivos específicos	47
4. Material e Métodos	48
4.1 Local de Estudo, pacientes e amostra	48
4.2 Extração de RNA e síntese de cDNA	49
4.3 Ensaaios de expressão gênica	49
4.4 Análises estatísticas	50
4.5 Comitê/ comissão de ética	51
5. Resultados	52
5.1 Caracterização da coorte estudada	52
5.2 Análise de expressão Gênica	58
6. Discussão	60
7. Conclusões	70
8. Referências Bibliográficas	71
9. Anexos	80
9.1 Anexo I – Comitê de Ética em Pesquisa	80

1. Introdução

O Lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença autoimune de etiologia complexa, que se caracteriza pela produção de autoanticorpos contra tecidos saudáveis. A sua sintomatologia é bem difusa, pois os sintomas são relacionados aos tecidos lesionados. A nefrite lúpica (NL) é uma das características clínicas mais comuns da doença e que atinge até 70% dos pacientes, além disso é uma das complicações que mais provoca morbidade e mortalidade nesse grupo. Um dos desafios na clínica para o tratamento da NL é a heterogeneidade da resposta dos pacientes aos medicamentos disponíveis e indisponibilidade de marcadores que indiquem a melhor terapia a seguir. Atualmente, o padrão ouro para o diagnóstico e acompanhamento da NL é a biópsia renal, porém esse procedimento é invasivo, além de apresentar diversas limitações, como não indicar a predição de resposta ou a direção terapêutica que deve ser utilizada. Diversos estudos estão em busca de biomarcadores mais específicos para o acompanhamento da lesão renal e predição de resposta na NL, mas até o momento nenhum apresentou aplicabilidade clínica satisfatória.

Entre os marcadores mais pesquisados para a NL, os biomarcadores genéticos associados à função linfocitária têm ganhado destaque, visto que estão relacionados com a alteração da atividade dessas células que podem levar a padrões de lesões renais, por meio da produção de autoanticorpos dirigidos para o tecido ou pelo acúmulo de imunocomplexos.

Nesse contexto, a via de sinalização WNT é uma antiga e conservada via evolutiva que foi identificada em animais metazoários e tem sido bem caracterizada por desempenhar diversos papéis fundamentais no sistema imunológico, como no processo de manutenção, proliferação, diferenciação e

auto-renovação das HScs. Além de apresentar papel regulador e sinalizatório no amadurecimento, sobrevivência e atividade das células B e T. Por fim, existem evidências crescentes que alterações da expressão desta via estão envolvidas na patogênese de alguns tipos de doenças autoimunes, como o Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) e glomerulopatias autoimunes.

A partir do panorama apresentado, o presente estudo se propôs a avaliar o perfil de expressão de genes da via de sinalização WNT de sinalização em uma coorte prospectiva de pacientes com NL sob tratamento com imunossupressores.

2. Revisão da Literatura

2.1 Lúpus Eritematoso Sistêmico

As doenças autoimunes são caracterizadas pelo aumento da reatividade do sistema imunológico por auto-antígenos, causando danos aos tecidos normais. Embora sua etiologia ainda não esteja totalmente elucidada, fatores genéticos, imunológicos e ambientais são reconhecidos como elementos contribuintes. O lúpus eritematoso sistêmico (LES) se destaca por ser o protótipo das doenças autoimunes, uma vez que é caracterizado pela produção de auto-anticorpos contra os componentes celulares levando à um diversificado leque de manifestações clínicas (KARAGIANNI et al, 2019).

As manifestações clínicas do LES são variadas, podendo envolver qualquer órgão ou sistema, isolada ou simultaneamente, em qualquer período da doença, sendo mais acentuada no período de atividade. O LES acomete de um modo geral as articulações, pele, células sanguíneas, membranas serosas, pericárdio, rins e cérebro (Figura 1) (TAN et al., 1982; MAGALHÃES et al., 2003). Essas manifestações estão ligadas principalmente a dois fatores: a produção de auto-anticorpos dirigidos principalmente contra antígenos nucleares em tecidos normais e a formação de imunocomplexos que promovem lesão tecidual imunologicamente mediada, como consequência da apoptose das células nos tecidos e formação dos corpos apoptóticos (GILES & BOACKLE, 2013; LIMA, 2018).

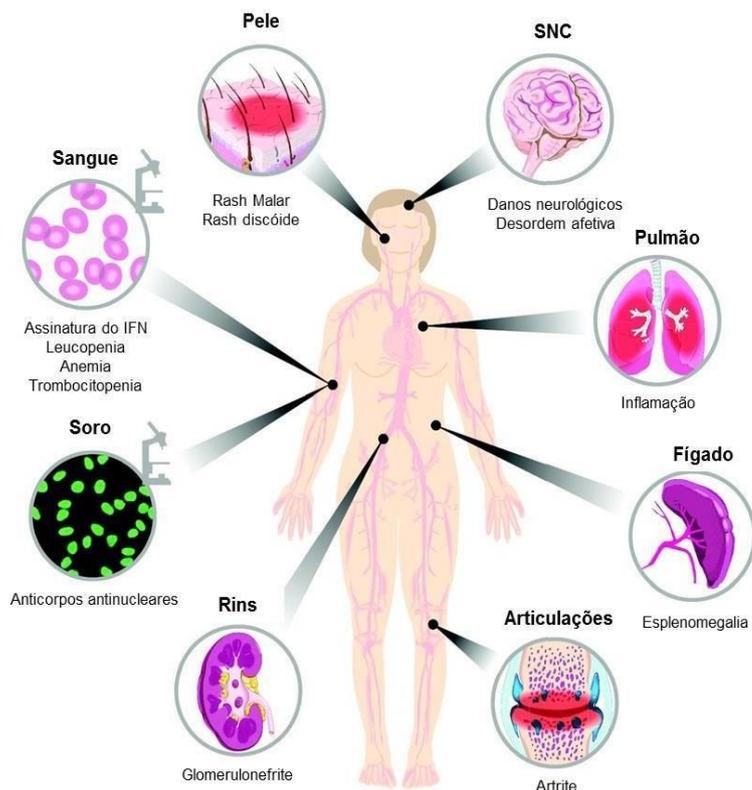


Figura 1- Órgãos que podem ser afetados pelo LES.
Fonte: LIMA, 2018.

As lesões de pele ocorrem em cerca de 80% dos pacientes, sendo as mais características: manchas avermelhadas na região malar da face e dorso do nariz, denominadas como rash malar e as lesões discóides, que também ocorrem mais frequentemente em áreas expostas à luz e se caracterizam por serem bem delimitadas e que, normalmente, regredem sem deixar sequelas; porém, em alguns casos, podem deixar cicatrizes com atrofia e alterações na cor da pele, seja ela por hipopigmentação ou hiperpigmentação (figura 2).

Além disso, outras alterações comuns que também podem ser encontradas são: a vasculite, principalmente nas pontas dos dedos das mãos ou dos pés; e a fotossensibilidade e alopecia, que pode ser difusa, focal ou circunscrita. As alterações articulares também são comuns nesses pacientes e ocorrem em cerca de 90% dos indivíduos no percurso da doença, caracterizando-se por dor com ou

sem edema nas articulações, envolvendo principalmente as articulações das mãos, punhos, joelhos e pés (MAGALHÃES et al., 2003; SACK & FYE, 2004; VIANA et al., 2010; MAGALHÃES JUNIOR, 2013).

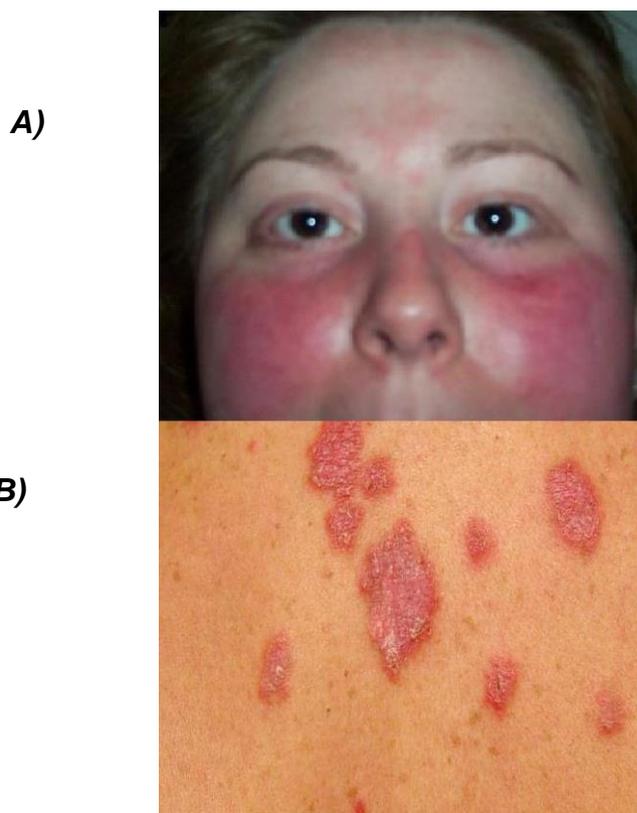


Figura 2 - Lesões de pele observadas no LES. A - Rash malar. B- Lesão discóide.
Fontes: OLIVEIRA, et al., 2016. ATLAS DA SAÚDE, 2019.

Alterações hematológicas também são comuns na doença, devido aos auto-anticorpos produzidos contra células desse sistema, causando sua destruição. Podem ser encontradas alterações em linhagens específicas, como anemia, plaquetopenia ou leucopenia; ou alterações em todas as linhagens, levando a pancitopenia. Dependendo do(s) tipo(s) de célula(s) afetado(s), a sintomatologia pode variar, por exemplo: se relacionado apenas aos glóbulos vermelhos, pode levar a palidez de pele e mucosa, fraqueza e cansaço, já as

alterações plaquetárias podem levar a sangramentos e hematomas. A queda dos glóbulos brancos no LES geralmente é assintomático, porém torna o indivíduo mais vulnerável a infecções (ASSIS & BAAKLINI, 2009).

Manifestações menos frequentes mas ainda importantes são as neuropsiquiátricas que podem levar a convulsões, alterações de humor e comportamento, além de depressão e alterações dos nervos periféricos e da medula espinhal (BORBA & BONFÁ, 2006).

2.2 Glomerulopatias e Nefrite Lúpica

As glomerulopatias (GP) são um grupo de doenças que se caracterizam pela disfunção do glomérulo (estrutura formada por um complexo conjunto de capilares sanguíneos delimitados por uma cápsula). O glomérulo renal em conjunto com os túbulos e o ducto coletor, forma o néfron, a unidade morfofuncional do rim, responsável pela ultrafiltração do plasma. As GP são doenças muito variadas, algumas de natureza aguda, outras crônicas. Podem ter origem nos rins e acometer apenas esses órgãos, sendo chamadas de primárias ou podem ser secundárias a outras doenças, como diabetes e doenças autoimunes (RIBEIRO ALVES, 2012).

As glomerulonefrites (GN) secundárias, como a NL, são um importante causa de Doença Renal Crônica Terminal (DRCT). Segundo dados do US RENAL DATA SYSTEM, 14% das DRCT nos Estados Unidos são provocadas pelas GN. No Brasil, segundo à Sociedade Brasileira de Nefrologia (SBN), a hipertensão, o diabetes e as GN são as principais causas de terapia renal substitutiva no país e entre esses processos patológicos, o único com tratamentos específicos e potencialmente reversíveis são as GN (USRDS ANNUAL DATA REPORT, 2012; SESSO et al., 2013). Entre as doenças sistêmicas autoimunes, a mais

frequentemente associadas a GN é o LES com até 70% dos portadores apresentado a NL (RIBEIRO ALVES, 2012).

Nesse aspecto, a NL é um evento inflamatório e um dos sintomas mais preocupantes da doença, ocorrendo em cerca de 40%-70% dos pacientes, além de ser uma das alterações mais relacionadas com óbitos na doença (PONS-ESTEL., 2013). Pacientes com formas proliferativas podem apresentar hematúria, cilindrúria anormal e proteinúria microscópica; metade desses manifestam síndrome nefrótica. O início da NL pode ser assintomático, acompanhado apenas por alterações nos exames de sangue e/ou urina. Podendo agravar-se e surgir sintomas clínicos como hipertensão, edema, oligúria, entre outros. Quando não tratada rapidamente e de forma adequada, o paciente pode apresentar um quadro de insuficiência renal podendo precisar de terapias substitutivas da função renal, como a diálise (MAGALHÃES et al., 2003; HAHN, 2006).

Embora não se conheça por completo a patogenia da NL, sabe-se que antígenos intrínsecos como componentes da matriz extracelular ou glicoproteínas da superfície da membrana basal glomerular podem servir de alvo para a ligação de autoanticorpos. Além disso, a lesão renal pode envolver a deposição de imunocomplexos. Os imunocomplexos consistem em antígenos nucleares (especialmente DNA), anticorpos antinucleares IgG de alta afinidade que fixam complemento e auto-anticorpos anti-DNA e também podem incluir compostos nucleossomos, cromatina, C1q, Ro (SS-A) e ribossomos. Esses complexos imunes promovem a ligação do complemento a Fc do receptor, iniciando uma reação inflamatória e citotóxica. Os depósitos subendoteliais, intramembranosos e subepiteliais caracterizam a doença. Sempre que ocorre a deposição de

imunocomplexos, a imunofluorescência é positiva para complemento, IgG, IgA e IgM em proporções variadas (WEENING JJ et al., 2004).

A classificação da NL baseia-se nos achados histológicos e é subdividida em seis subtipos histológicos (Figura 3): as classes I e II são consideradas de menor severidade; a classe III (proliferativa focal), IV (proliferativa difusa) e a V (membranosa) apresentam potencial para provocar dano permanente renal, enquanto que a classe VI (nefrite esclerosante avançada) já representa DRCT (WEENING JJ et al., 2004). Apesar da classificação histológica informar estadiamento das lesões e índices de atividade e cronicidade que são relevantes para decisão terapêutica, ela não prediz quem responderá ao tratamento. Quando não tratada adequadamente, a NL pode levar a falência renal e torna-se necessário terapias substitutivas, como o transplante ou a diálise (DAVIDSON, 2015; ROVIN; PARIKH; ALVARADO, 2014).

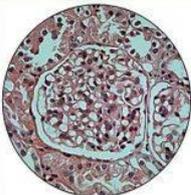
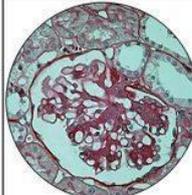
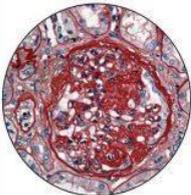
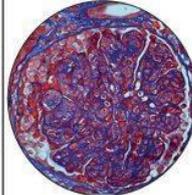
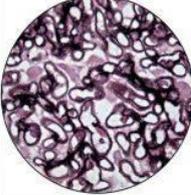
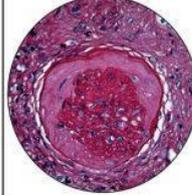
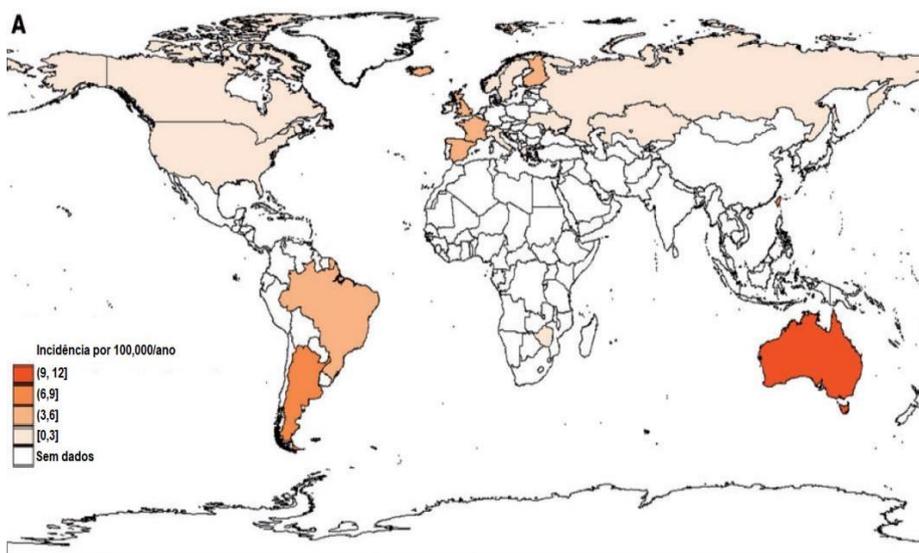
CLASSIFICAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DA NEFRITE LÚPICA	
 <p>Classe I <u>NL mesangial mínima</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Deposição de complexos imunes no tecido mesangial detectáveis por técnicas de IF. 	 <p>Classe II <u>NL mesangial proliferativa</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Deposição de complexos imunes no tecido mesangial detectáveis por técnicas de IF. • Hiperplasia mesangial de qualquer ordem ou expansão da matriz mesangial com imunodeposição detectável por MO.
 <p>Classe III <u>NL focal</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Glomerulonefrite endo/extracapilar, focal ativa ou inativa, segmentar ou global, que acometa < 50% do tecido glomerular. • Pode apresentar lesões ativas (A), lesões inativas crônicas acompanhadas de cicatrizes glomerulares (C) ou ambas (A/C). 	 <p>Classe IV <u>NL segmentar difusa ou global difusa</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Glomerulonefrite endo ou extracapilar, difusa ativa ou inativa, segmentar ou global que acometa ≥ 50% do tecido glomerular. Depósitos imunes subendoteliais difusos, com ou sem alterações mesangiais, são comuns. • Esta categoria é dividida em: segmentar difusa (IV-S), quando houver lesões segmentares em ≥ 50% do tecido glomerular, e global difusa (IV-G), quando houver lesões globais em ≥ 50% do tecido glomerular. • Pode apresentar lesões A, C ou A/C.
 <p>Classe V <u>NL membranosa</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Deposição imune subepitelial segmentar/global ou suas sequelas morfológicas, com ou sem alterações mesangiais. Detectável por MO, IF, e ME. • Pode ocorrer em combinação com as classes III ou IV e pode apresentar esclerose avançada. 	 <p>Classe VI <u>NL esclerótica avançada</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Nefrite Lúpica terminal. • 90% em glomeruloesclerose global.

Figura 3 - Classificação Histopatológica da Nefrite Lúpica. Classes I - VI e seus achados histopatológicos.

Fonte: PINHEIRO, 2019.

2.3 Epidemiologia do LES e da NL

O LES é mais prevalente em mulheres do que homens, em todas as faixas etárias e nacionalidades, sendo que a proporção de mulheres para homens é mais alta na idade reprodutiva, variando entre 8:1 e 15:1, e mais baixa em crianças pré-púberes, com cerca de 4:3, indicando, dessa forma, a influência dos fatores hormonais no desenvolvimento da doença. Além disso, existe uma variação mundial na incidência relatada e prevalência do LES (Figura 4A e 4B), demonstrando importância do background genético e de fatores ambientais (KYTTARIS et al., 2010; ALMAANI, MEARA & ROVIN, 2016; REES et al., 2017).



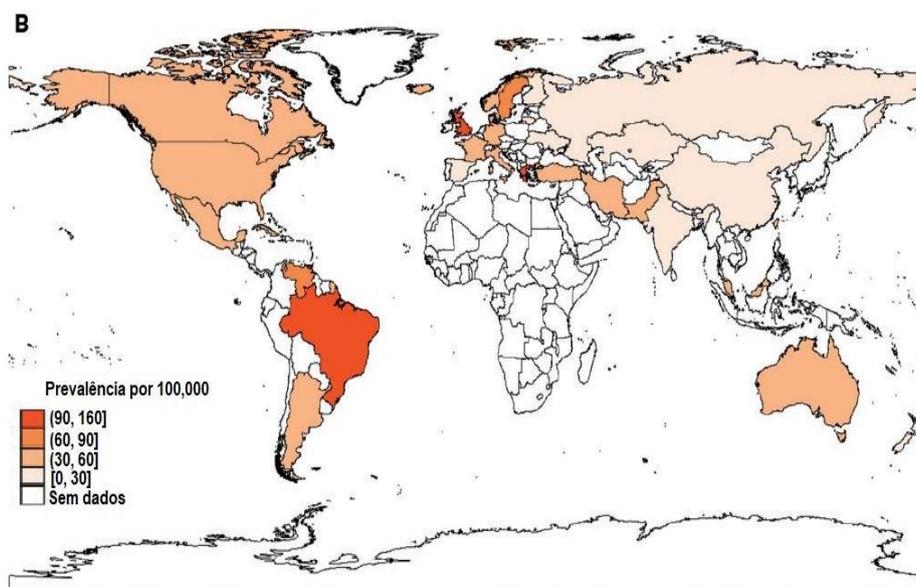


Figura 4 - Incidência e prevalência do Lúpus eritematoso sistêmico. A – Taxa de incidência mundial do Lúpus Eritematoso Sistêmico; B - Taxa de prevalência mundial do Lúpus Eritematoso Sistêmico

Fonte - Adaptado REES et al., 2017.

Estudos evidenciam um pico da idade de incidência, que ocorre em adultos de meia idade, além disso, o grupo étnico negro tem maior incidência e prevalência que a etnia branca (URAMOTO et al., 1999; REES et al., 2017; KNOW et al., 2019).

A prevalência de LES e as chances de desenvolver NL variam consideravelmente entre diferentes regiões do mundo e diferentes raças e etnias. Alguns grupos, incluindo mestiços (indivíduos nascidos na América Latina com ancestralidade ameríndia ou caucasiana), afro-americanos, hispânicos e asiáticos quando comparados com caucasianos, apresentam maiores riscos de apresentar a NL, desenvolvê-la mais precocemente, além de terem um pior prognóstico, incluindo evolução para DRCT e morte (PONS-ESTEL., 2013; REES et al., 2017).

Um estudo no sul da Flórida avaliando 213 casos com biópsias comprovando a NL, avaliou pacientes de três diferentes grupos étnicos (caucasianos, hispânicos e afro-americanos) e encontrou resultados menos

favoráveis nos afro-americanos e hispânicos, observando que complicações renais como duplicação do nível de creatinina sérica, DRCT e até a morte ocorreu com uma frequência três vezes maior em afro-americanos e duas vezes maior em hispânicos em comparação com os caucasianos (CONTRERAS et al., 2006) .

Além disso, ainda comparando aos indivíduos de origem caucasiana, o curso da doença tende a ser mais agressivo em indivíduos afrodescendentes, sendo observado uma maior incidência de NL proliferativa difusa ou a presença de características de maior risco na mesma classe histológica do NL. Essas diferenças podem surgir devido à predisposição genética, pois alguns genótipos e autoanticorpos associados ao alto risco para a doença são mais frequentes em pacientes afrodescendentes (ALMAANI, MEARA & ROVIN, 2016).

As populações afrodescendentes têm uma frequência mais alta do alelo Fcγ RIIA-R131, que está envolvido na mediação da fagocitose dos complexos imunes à IgG2. Admite-se também que as variantes de risco para nefropatia, G1 e G2, do gene *APOL1* parecem ter sido selecionadas na África Subsaariana nos últimos 10 mil anos. A presença dessas variantes confere proteção contra a infecção parasitária através da lise do *Trypanosoma bruceirhodesiense*, agente etiológico da doença do sono Africano, e estão praticamente ausentes em populações de descendência europeia e asiática, entretanto, conferem risco de nefropatias em afro-americanos com formas comprovadas por biópsia (GENOVESE et al.,2010; VAGJEL et al., 2021). Somado a isso, um subtipo HLA-DR2 (HLA-DRB181503) característico de populações negras foi associado ao agravamento de proteinúria (ALMAANI, MEARA& ROVIN, 2016).

Além disso, as áreas com menor desenvolvimento socioeconômico também apresentam maior prevalência e gravidade do LES e NL, o que gera

confusão com o fator racial. Um estudo demonstrou que o fator socioeconômico também é determinante para influenciar uma pior evolução de pacientes afro-americanos em comparação aos caucasianos. Após o ajuste para o nível de pobreza e cobertura de seguro-saúde, o risco relativo (RR) para progressão da NL em Afro-Americanos foi reduzido de 3,5 para 2,7 ($p=0,1$) e não foi estatisticamente significativa. No entanto, para a raça hispânica, houve redução após ajuste para o fator RR de 5,5 para 3,6 ($p=0,03$) relacionado ao desenvolvimento econômico, porém houve manutenção da força estatística para a questão racial (BARR et al., 2003).

No Brasil, trabalhos sobre a epidemiologia do LES ainda são escassos. Cabe destaque para dois estudos. O primeiro estudo, realizado por Vilar & Sato, em 2002, na cidade de Natal (Rio Grande do Norte) registrou uma incidência anual de 8,7/100.000 pessoas, com maior frequência em mulheres (14,1:2,2). No segundo estudo, realizado em Cascavel (Paraná) Nakashima e colaboradores, em 2011, verificaram uma incidência de 4,8 casos por 100.000 habitantes/ano. O que se observa é que, possivelmente, a diversidade étnica das regiões e a ação de diferentes fatores ambientais podem explicar as diferenças de incidências entre as cidades. Um dos fatores pode ser a disparidade da taxa de exposição aos raios ultravioletas (UV), entre as duas regiões (VILAR & SATO, 2002; NAKASHIMA et al., 2011). Em relação as diferenças étnicas observada nos dois estudos, a cidade de Natal apresenta maior percentual de pardos e negros comparado a Cascavel (NAKASHIMA et al., 2011), o que também pode ter contribuído para a diferença de incidência observada nos estudos.

2.4 Diagnóstico do LES e da Nefrite Lúpica

O diagnóstico do LES se baseia na avaliação clínica pelo perfil de manifestações apresentadas pelo paciente, segundo os critérios do European Alliance of Associations for Rheumatology/American College of Rheumatology (EULAR/ACR), que é estruturado em onze características clínicas (Quadro 1). A presença de quatro das onze características são necessárias para o diagnóstico, somado a isso, deve haver pelo menos um critério clínico e um imunológico presentes. Além disso, houve atualizações em 2019 relacionados ao diagnóstico, o FAN positivo se tornou um critério obrigatório de entrada, pois estudos epidemiológicos demonstraram que 99,5% dos pacientes apresentam FAN positivo e a febre inexplicável também tornou-se um critério clínico por ser comum e notavelmente característico para o LES, entretanto, as infecções devem ser a primeira via de suspeita para essa última característica clínica. Além dos critérios da ACR, existe os critérios SLICC e exames laboratoriais que também são utilizados para auxiliar no diagnóstico. Os principais exames laboratoriais que podem auxiliar no diagnóstico e acompanhamento do paciente se encontram na Quadro 2 (SATO, 2008; BORBA et al., 2008).

Critérios de classificação para o Lupus Eritematoso Sistêmico	
Característica clínica	Descrição
1. Eritema Malar	Lesão eritematosa fixa em região malar, plana ou em relevo.
2. Lesão discóide	Lesão eritematosa, infiltrada, com escamas queratóticas aderidas e tampões foliculares, que evolui com cicatriz atrófica e discromia.
3. Fotossensibilidade	Exantema cutâneo como reação não usual à exposição à luz solar, de acordo com a história do paciente ou observado pelo médico.
4. Úlceras Orais/Nasais	Úlceras orais ou nasofaríngeas, usualmente indolores, observadas pelo médico.
5. Artrite	Não erosiva envolvendo duas ou mais articulações periféricas, caracterizadas por dor e edema ou derrame articular.
6. Serosite	Pleuris (caracterizada por história convincente de dor pleurítica, atrito auscultado pelo médico ou evidência de derrame pleural) ou pericardite (documentado por eletrocardiograma, atrito ou evidência de derrame pericárdico).
7. Comprometimento Renal	Proteinúria persistente (> 0,5 g/dia ou 3+) ou cilindúria anormal.
8. Alterações neurológicas	Convulsão (na ausência de outra causa) ou psicose (na ausência de outra causa).
9. Alterações hematológicas	Anemia hemolítica ou leucopenia (menor que 4.000/mm ³ em duas ou mais ocasiões), linfopenia (menor que 1.500/mm ³ em duas ou mais ocasiões) ou plaquetopenia (menor que 100.000/mm ³ na ausência de outra causa).
10. Alterações imunológicas	Anticorpo anti-DNA nativo ou anti-Sm ou presença de anticorpo antifosfolípide 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.
11. Anticorpos antinucleares	Título anormal de anticorpo antinuclear por imunofluorescência indireta ou método equivalente, em qualquer época, e na ausência de drogas conhecidas por estarem associadas à síndrome do lúpus induzido por drogas.

Quadro 1 - Critérios de classificação para o LES segundo o Colégio Americano de Reumatologia
Fonte: (TAN et al., 1982; HOCHBERG, 1997).

Exame	Principais referências associadas
1 - Velocidade de hemossedimentação e proteína C reativa	PRINTO, 2012
2 - Hemograma Completo	SACK; FYE, 2004
Uréia, Creatinina e Proteinúria 24 horas	PRINTO, 2012
URINA I	SATO et al., 2006
Dosagem do complemento sérico para dosar C3 e C4	HAUBRICHT; TSCHURTSCHENTHALER, 2009
Teste de pesquisa de anticorpos antinucleares	VAZ et al., 2007

Quadro 2- Principais exames que auxiliam no diagnóstico e acompanhamento do paciente com Lúpus. **Fonte:** adaptado de OLIVEIRA et al., 2016.

Para a evolução do quadro do paciente lúpico é utilizado o SLEDAI (Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index). O SLEDAI é um índice de atividade que tem sido utilizado para avaliação, acompanhamento e análise da gravidade do quadro clínico dos pacientes com LES. Este índice, desenvolvido em 1986, demonstra até hoje, bons resultados quanto à validade e reprodutibilidade. O SLEDAI apresenta 24 itens, dos quais 16 estão relacionados a parâmetros clínicos e 8 a parâmetros laboratoriais (Quadro 3). Sua análise se baseia na atribuição de pontos a partir de cada manifestação apresentada pelo paciente. Cada alteração possui uma pontuação que varia de 1 até 8 e, dependendo do somatório de pontos o paciente pode ser classificado em 4 graus de atividade: discreta (1-5), moderada (6-10) intensa(11-19) e muito intensa (≥ 20). (SATO et al., 2008; CASTREJÓN et al., 2014).

ESCORE	DESCRIÇÃO	DEFINIÇÃO
8	Convulsão	Instalação recente excluindo causa metabólica, infecciosa ou causada por drogas
8	Psicose	Alteração da função mental normal devido a alterações graves da percepção da realidade. Inclui alucinações, incoerência, associações livres, empobrecimento do conteúdo do pensamento, pensamento marcadamente ilógico, comportamento bizarro/desorganizado ou catatônico. Excluir uremia e causas farmacológicas/drogas
8	Síndrome órgão-cerebral	Função mental alterada com alteração da orientação, memória ou outra função intelectual com rápida instalação e flutuação dos achados clínicos incluindo diminuição da consciência com diminuição da capacidade de concentração e incapacidade de manter a atenção ao ambiente envolvente, mais pelo menos duas das seguintes: distúrbios da percepção, discurso incoerente, insônia ou sonolência diurna, aumento ou decréscimo da atividade psicomotora Excluir causa metabólica, infecciosa ou causada por drogas
8	Distúrbios visuais	Alterações da retina ligados ao LES, incluindo corpos coróides, hemorragias retinianas, exsudado seroso ou hemorragia no coróide ou nevríte óptica Excluir HTA ou causa infecciosa ou causada por drogas
8	Distúrbios nos pares cranianos	Instalação recente de neuropatia sensitiva ou motora atingindo os pares cranianos
8	Cefaleia lúpica	Cefaleia severa, persistente; pode ser tipo migranoso mas deve ser resistente à terapêutica narcótica
8	AVC	Instalação recente de AVC; Excluir arteriosclerose
8	Vasculite	Ulceração, gangrena, nódulos digitais dolorosos, infarto periungueal, hemorragias sub-ungueais, ou biópsia ou angiograma compatíveis com vasculite
4	Artrite	Mais de duas articulações com dor e sinais inflamatórios
4	Miosite	Dor/fraqueza muscular proximal, associado com elevação da CK/aldolase ou eletromiografia ou biópsia compatível com miosite
4	Cilindros urinários	Cilindros de Eritrócitos ou de granuloses
4	Hematúria	>5 células por campo. Excluir litíase, infecção ou outra causa
4	Proteinúria	>0.5g/24h. Instalação recente ou aumento >0.5g/24h
4	Piúria	>5 leucócitos por campo. Excluir, infecção
2	Novo rash	Instalação recente ou recorrência de rash tipo inflamatório
2	Alopécia	Instalação recente ou recorrência de perda anormal difusa ou localizada de cabelo
2	Ulcerações nasais	Instalação recente ou recorrência de ulcerações nasais
2	Pleurisia	Dor torácica pleurítica com atrito pleural/derrame ou espessamento pleural
2	Pericardite	Dor pericárdica mais pelo menos um dos seguintes: atrito, derrame, ou confirmação eletrocardiográfica ou por ecocardiograma
2	Hipocomplementemia	C3, C4 ou CH50 abaixo dos valores de referência do laboratório
2	Aumento do DNA	>25 % no ligando pelo ensaio de Farr ou acima dos valores de referência do laboratório
1	Trombocitopénia	<100.000 plaquetas/mm ³
1	Leucopénia	<3.000 leucócitos/mm ³ Excluir causas farmacológicas
1	Febre	>38° C excluir causa infecciosa

Quadro 3 - Critérios SLEDAI (Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index) apresentando 16 parâmetros clínicos e 8 laboratoriais.

2.5 Tratamento do LES e da Nefrite Lúpica

O tratamento do LES geralmente depende da gravidade e das manifestações da doença. São utilizados fármacos que modulam o sistema imunológico e incluem corticoides, antimaláricos e imunossupressores. Em geral, manifestações cutâneas, manifestações musculoesqueléticas e serosites representam sintomas mais leves, que podem aumentar e diminuir com a atividade da doença. Estas são frequentemente controladas com anti-inflamatórios não esteróides (AINEs) ou medicamentos de imunossupressão de baixa potência, além da hidroxicloroquina e/ou cursos curtos de corticosteróides dependendo da gravidade apresentada (SATO et al., 2002; MAGALHÃES et al., 2003; HAHN, 2006).

Segundo A EULAR, alguns grupos de fármaco ou fármacos isolados tem papel importante no tratamento do LES, com suas indicações e doses estabelecidas. Entre eles, a hidroxicloroquina é recomendada a todos os pacientes com LES, sugerindo a dose de 5mg/kg/dia devido ao risco de retinopatia ser menor nessa dose, mas considera que a dose bem estabelecida para LES é de 6,5mg/kg/dia e que ainda não há estudos comparando desfecho com ambas as doses. O rastreio de lesão retiniana, provocada pelo uso crônico, deve ser feito no início do tratamento, após cinco anos e anualmente por meio de exame de campo visual e/ou tomografia de coerência óptica. Os glicocorticoides também são fármacos fundamentais no tratamento do LES e suas complicações, pois apresentam ação rápida mas podem causar efeitos colaterais acumulados no médio-longo prazo, sendo ideal a suspensão quando esses surgem; quando não for possível, é sugerido a redução para $\leq 7,5$ mg/dia. A pulsoterapia com metilprednisolona, por exemplo, é utilizada em situações agudas e acometimento

orgânico grave (nefrite ou neurolúpus) (ARINGER, et al., 2019).

Existe também a classe dos imunossupressores que são utilizados para facilitar o desmame de corticóides e prevenir flares. A escolha de qual imunossupressor deve ser usado é condicionada por algumas variáveis, como: gravidade e manifestação da doença, idade do indivíduos, efeitos adversos, por exemplo, alguns imunossupressores podem levar a infertilidade, sendo contraindicado para mulheres em idade reprodutiva e que pretendem ter filhos, além da segurança e custo-benefício (ARINGER, et al., 2019; FANOURIAKIS et al., 2019).

O Metotrexato é indicado quando há controle pobre de sintomas após um curso de corticoide ou quando a hidroxicloroquina sozinha é insuficiente. Formalmente contraindicado na gestação. Já a Azatioprina tem indicação semelhante do metotrexato, mas é compatível com a gestação (FANOURIAKIS et al., 2019).

O Micofenolato de mofetil (MMF) é um imunossupressor potente com ação na nefrite lúpica e no LES extra-renal, mas não tem impacto positivo nos sintomas neuropsiquiátricos e é incompatível com a gestação. A Ciclofosfamida é uma terapia de resgate na doença grave (renal, cardiopulmonar ou neuropsiquiátrica) e/ou na doença refratária. Apresenta Gonadotoxicidade, ou seja, necessita de cautela em pacientes na idade fértil. O uso concomitante com análogos do GnRH reduz a depleção da reserva ovariana associada e é indicado em mulheres na pré-menopausa (ARINGER, et al., 2019; FANOURIAKIS et al., 2019).

O guideline aponta os biológicos, como o rituximab que é usado apenas “off-label” em pacientes com doença renal grave ou extra-renal refratária, principalmente hematológica ou neuropsiquiátrica. O Belimumab é considerado

em pacientes com doença extra-renal com controle inadequado com os medicamentos de primeira linha. Nesse contexto, os pacientes com alto índice de atividade (SLEDAI >10), necessidade de prednisona >7,5mg/dia, evidência sorológica de atividade (consumo de C3/C4, altos títulos de anti-DNAs) e manifestações cutâneas e musculoesqueléticas são os mais propensos a ter boa resposta (ARINGER, et al., 2019; FANOURIAKIS et al., 2019).

No tratamento dos pacientes com LN, a terapia preconizada pela *Kidney Disease Improving Global Outcomes* (KDIGO) consiste em indução com metilprednisolona intravenosa, seguida de prednisona oral e 6 bolus de ciclofosfamida intravenosa (500-1g) ou micofenolato de mofetil 2-3g / dia. Após a indução, os pacientes iniciam uma terapia de manutenção com azatioprina ou micofenolato de mofetil, de acordo com o protocolo estabelecido e especificidades do indivíduo. Após seis meses de tratamento e acompanhamento clínico, ocorre o desfecho primário de resposta à terapia de indução; já o desfecho secundário é avaliado após 12 meses para as classes proliferativas (III e IV) e 18 meses para a classe V (associada ou pura) e será definido a partir da análise da proteinúria (PTN), pela persistência ou não dessa PTN (>1g / dia), com o uso de dois tratamentos diferentes, incluindo a ciclofosfamida (KDIGO,2012).

2.6 Imunopatogênese do LES e da Nefrite Lúpica

A principal alteração imunológica no LES é a quebra da autotolerância imunológica e a produção de autoanticorpos direcionados para várias moléculas encontradas principalmente no núcleo, porém outras regiões celulares também podem ser susceptíveis a esses eventos autoimunes, como o citoplasma, superfície celular e ainda algumas moléculas solúveis como IgG e fatores de

coagulação. Esses autoantígenos são reconhecidos por células dendríticas através do DNA de CpG (citosina-fosfato-guanina), através de DNA existente nos imunocomplexos ou pelo RNA nos antígenos próprios e, com isso, regulam respostas autoimunes adaptativas pela ativação anormal de linfócitos T e B autorreativos (HAHN, 2012).

Os anticorpos antinucleares são mais característicos e presentes em mais de 95% dos pacientes e, podem levar a dois tipos de quebra, quebras simples do DNA (single strand breaks, SSBs) e quebras duplas no DNA, as DSBs (doublestrand breaks), que quando não reparadas, levam a apoptose celular (TSAI & LIEBER, 2010; NEAL & MEEK, 2011; LIMA, 2018). A característica mais notável dos anticorpos anti-DNA é sua associação com a glomerulonefrite primária. Entretanto, a correlação entre anticorpos anti-DNA e NL não está totalmente esclarecida porque alguns pacientes com nefrite ativa são negativos para anticorpos anti-DNA, enquanto alguns pacientes com altos títulos persistentes de anti-DNA podem não apresentar comprometimento renal (KOSMINSKY et al., 2006).

Os autoanticorpos dirigidos contra anti-Sm e anti-RNP, são encontrados no soro de cerca de 30% a 50% dos pacientes lúpicos. O antígeno Sm é designado como uma pequena ribonucleoproteína nuclear (snRNP) e é composta de um conjunto único de moléculas de RNA ricas em uridina ligadas a um grupo comum de proteínas do núcleo e outras proteínas associadas com as moléculas de RNA. Os anticorpos anti-Sm reagem com proteínas principais do snRNP, enquanto os anticorpos anti-DNA se ligam a um determinante conservado em ácido nucléico amplamente presente no DNA (KOSMINSKY et al., 2006). Essas alterações na regulação imunológica e produção de auto-anticorpos provocam lesão tecidual,

formação e deposição de imunocomplexos nos tecidos que ativam o sistema complemento e resulta em um processo inflamatório crônico (Figura 5) (LIMA, 2018).

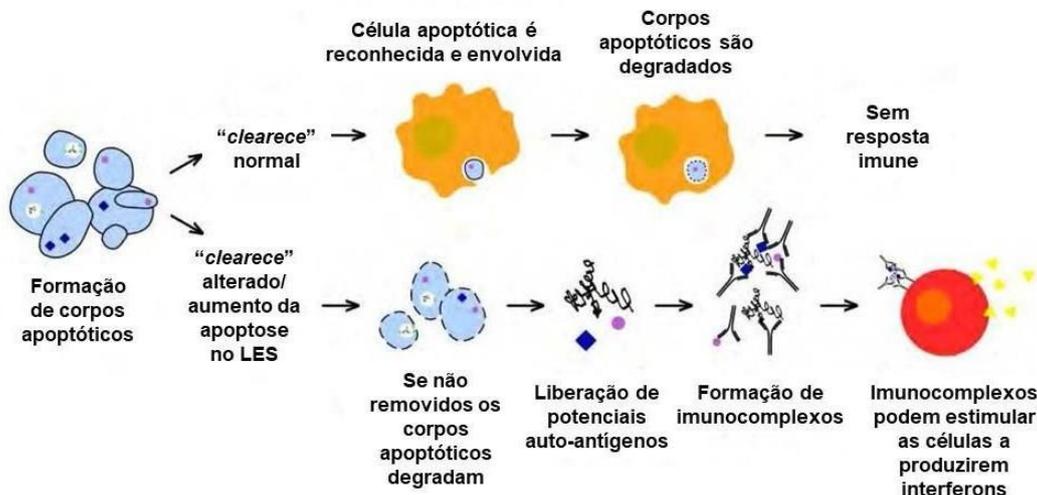


Figura 5- Falhas no "clearance" dos corpos apoptóticos em indivíduos lúpicos promove liberação de auto-antígenos formando imunocomplexos que estimulam a produção de interferons. Os interferons por sua vez promovem o processo inflamatório crônico no LES.
Fonte: LIMA,2018. Modificado de CLARK & POOLE, 2012.

2.7 Genética do LES e da Nefrite Lúpica

A genética do LES é complexa, sendo uma doença poligênica, na qual os genes atuam em conjunto para determinar a suscetibilidade à doença, mas nenhum gene particular agindo isoladamente mostrou ser suficiente para desencadear o processo patológico, demonstrando a baixa penetrância dos genes contribuintes (TSOKOS, 2011; MOHAN & PUTTERMAN, 2015).

Os primeiros genes associados ao risco de desenvolvimento do LES foram alguns dos genes do complexo de Histocompatibilidade Humana (HLA) (WUSTER & BEHRENS, 2016).

Os genes associados ao desenvolvimento tanto do LES quanto da NL podem ser divididos em alguns grupos, sendo esses: genes que afetam a

ativação de linfócitos; genes que afetam a imunidade inata; genes com função intrínseca aos rins e genes que influenciam o manejo de detritos apoptóticos, cromatina e complexos imunes portadores de antígenos nucleares (MOHAN & PUTTERMAN, 2015).

Alterações no mecanismo de imunidade inata tem uma importante função na patogênese do LES, principalmente pela liberação de citocinas pró-inflamatórias, indução à produção de autoantígenos e dano tecidual. Além disso, a imunidade inata possui um elo inerente com a imunidade adaptativa e a desordem de uma pode levar a descompensação da outra (WEIDENBUSCH et al., 2017). Por isso, diversos genes relacionados a regulação inata e adaptativa também são bem estudados para elucidação das doenças autoimunes, inclusive no LES. Os principais genes envolvidos com respostas inata e adaptativa estudados no LES se relacionam com a ativação da via do IFN1 e/ou com a regulação de células T e B (HARLEY, 2009; BURN et al., 2011; STANFORD et al., 2012; LIMA, 2018). Na tabela 1 podem ser observados os genes já relacionados ao LES e a via imunológica no qual participam.

Tabela 1 - Genes relacionados ao LES na literatura e vias imunológicas.

	Apoptose	Citocinas	Interferon		Transcrição					
Imunidade Inata	<i>AFF1</i>	22291604	<i>IL10</i>	19838195	<i>IFIH1</i>	22046141	<i>HAND1</i>	23740238	<i>MYO18B</i>	23740238
	<i>ATG5</i>	21622776	<i>IL21</i>	21425124	<i>IRF3</i>	25130328	<i>HIPK1</i>	23740238	<i>RASGRP3</i>	23249952
	<i>ATG7</i>	21622776	<i>IL8</i>	21179067	<i>IRF5</i>	24697319	<i>IKBKE</i>	21179067	<i>SOS1</i>	23740238
	<i>PDCD1</i>	19220647	<i>SPP1</i>	15692970	<i>IRF7</i>	21360504	<i>IRAK1</i>	19329491	<i>STAT4</i>	24697319
	<i>REL</i>	21905002	<i>IL12A</i>	26502338	<i>IRF8</i>	22046141	<i>JAZF1</i>	23740937	<i>TRAF6</i>	22231568
	<i>TREX1</i>	17660818	<i>SOCS1</i>	26502338	<i>PRDM1</i>	19838195	<i>MECP2</i>	22904263	<i>TNIP1</i>	23249952
	<i>RAD51B</i>	26502338			<i>TYK2</i>	22046141	<i>MIR146a</i>	21738483	<i>TCF7</i>	26502338
Imunidade Adaptativa	Sinalização Célula B		Sinalização Célula T		Apresentação de Antígeno		Outros			
	<i>BANK1</i>	21408207	<i>CD44</i>	21194677	<i>ERBB3</i>	20962850				
	<i>BLK</i>	21480188	<i>CTLA4</i>	20962850	<i>ICA1</i>	20962850				
	<i>CD40</i>	21914625	<i>PTPN22</i>	21078766						
	<i>CSK</i>	23042117	<i>TNFAIP3</i>	21905002	Sinalização Celular		Proteína de Membrana		Ubiquitinização	
	<i>LYN</i>	19369946	<i>TNFSF4</i>	21905002	<i>SPRED2</i>	26502338	<i>C3orf21 [XXYLT1]</i>	23740238	<i>SMURF1</i>	23740238
	<i>PRKCB</i>	21134959	<i>TRAF1</i>	21905002	<i>NADSYN1</i>	26502338	<i>CADPS</i>	23740238	<i>UBE2L3</i>	20962850
	<i>IKZF1</i>	23249952	<i>ELF1</i>	21044949	<i>SH2B3</i>	26502338	<i>SCUBE1</i>	22039224	<i>SKP1</i>	26502338
	<i>IKZF2</i>	26502338	<i>ETS1</i>	23249952	<i>CIITA</i>	26502338	<i>DHCR7</i>	26502338		
	<i>IKZF3</i>	22464253			<i>SLC5A11</i>	24925725	<i>PLD2</i>	26502338		
Complexos Imunológicos	Fagocitose		Complemento		Adesão Celular		Desconhecido			
	<i>CRP</i>	24574329	<i>CFB</i>	21792837	<i>TBL1XR1</i>	23740238	<i>CXORF21</i>	26502338	<i>TMEM39A</i>	22464253
	<i>FCGR2A</i>	15895258	<i>CR2</i>	25180293	<i>PECAM-1</i>	25201689	<i>FAM78B</i>	23740238	<i>TNPO3</i>	25205108
	<i>FCGR2B</i>	16227149	<i>CR5</i>	25167769	<i>ARHGAP26</i>	23740238	<i>KIAA0319L</i>	23740937	<i>TRAJ50</i>	23740238
	<i>FCGR3A</i>	17596285	<i>CSMD1</i>	23740238	<i>DIAPH3</i>	23740238	<i>KIAA1542</i>	21792837	<i>UHRF1BP1</i>	19838195
	<i>FCGR3B</i>	22551723	<i>MBL2</i>	21792837	<i>PDGFRA</i>	24925725	<i>LRRC18</i>	23249952	<i>WDFY4</i>	20169177
	<i>ITGAM</i>	18204098			<i>HAS2</i>	24925725	<i>PEX5L</i>	23740238	<i>XKR6</i>	20962850
	<i>ITGAX</i>	18204098					<i>PXK</i>	18204446	<i>ZBTB20</i>	23740238
	<i>NCF2</i>	22046141					<i>SLC15A4</i>	23249952	<i>ZBP2</i>	22464253

Fonte: Adaptado de SAEED, M. 2017

2.8 Via WNT β catenina e Nefrite Lúpica

A via de sinalização WNT é uma antiga e conservada via evolutiva que foi identificada em animais metazoários e tem sido bem caracterizada por desempenhar diversos papéis fundamentais no desenvolvimento humano, incluindo proliferação celular, desenvolvimento embrionário, homeostase do tecido e desenvolvimento do sistema imunológico. A desregulação e hiperativação na sinalização WNT tem sido implicada na patogênese de muitos tipos de doenças. Essa via tem papel indispensável no desenvolvimento de células T e do sistema imunológico e existem evidências crescentes que está envolvida na patogênese de algumas doenças auto-imunes, como artrite, Lupus e espondilite anquilosante (TVEITA & REKVIK, 2011; HAUCK et al, 2012; SHI et al, 2016).

Essas proteínas WNT participam de uma ampla variedade de vias de sinalização, porém, a via WNT β catenina canônica é a mais estudada e a melhor caracterizada atualmente. Nessa via, as proteínas axina, adenomatosispolyposis coli (APC) e β catenina formam um complexo na ausência da proteína ativadora WNT levando à fosforilação e à degradação da β catenina por uma proteólise mediada por ubiquitina. Quando as proteínas WNT ligam-se a receptores específicos transmembranafrizzled (Fz) e ao correceptor da proteína receptora de LDL relacionado (LRP), LRP5 ou LRP6, a β catenina é liberada do complexo e não sofre degradação proteolítica. A estabilização da β catenina produz sua translocação para o núcleo celular, onde se associa com o fator de transcrição 4 (TCF4) ou com o fator potenciador linfoide de ligação 1 (LEF1) que regulam a transcrição de genes alvo (Figura 6) (KRAMER, HALLEUX & KELLER, 2010).

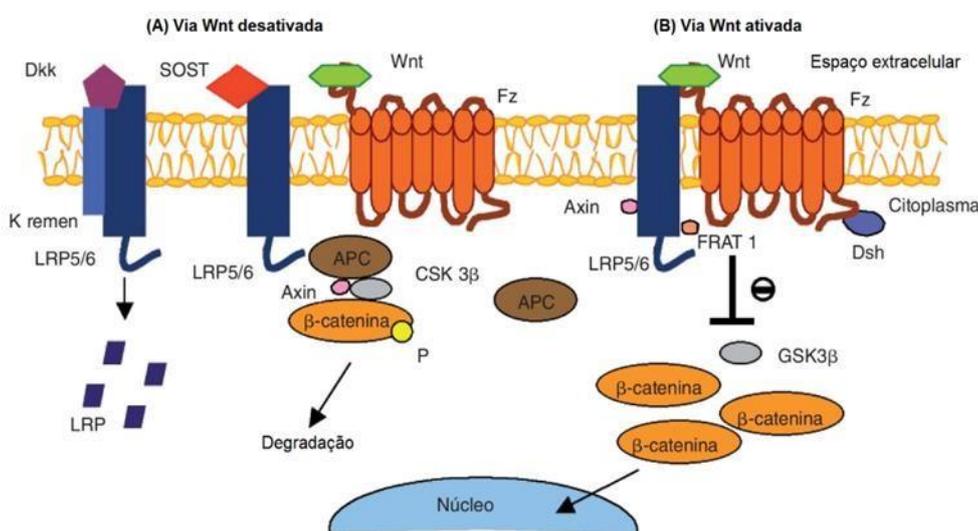


Figura 6. Inativação e ativação da via Wnt. (A) Inativação da via Wnt ocorre pelo bloqueio da proteína transmembrana LRP5/6, pelas proteínas inibidoras DKK e SOST, que se acoplam à LRP5/6 impedindo sua interação com as proteínas Wnt e assim diminuindo sua interação com os receptores Frizzled (Fz). O bloqueio promove a formação de um complexo que fosforila a proteína β -catenina levando assim à sua degradação. (B) A via Wnt ativa ocorre pela interação das proteínas Wnt com o receptor Fz com o intermédio da LRP5/6, ocorre assim a inibição do complexo para fosforilação da β -catenina, que se acumula no citoplasma entrando posteriormente no núcleo celular. Fonte: Adaptado de Escobar-Gómez; Jódar; Hawkins, 2009.

Estudos vem demonstrando que a sinalização WNT β catenina pode ter funções diferentes relacionados ao seu tempo em hiperativação na Doença Renal Crônica (DRC). Isso porque, alguns artigos indicam que a via WNT pode ter um papel fundamental na promoção do reparo e regeneração tubular após insuficiência renal aguda induzida por lesão de isquemia-reperfusão ou nefrotoxinas (NELSON, 2011; ZHOU, 2012). No entanto, alguns estudos também destacam que a ativação aumentada de WNT β catenina está associada com aumento da proteinúria, declínio da função renal e fibrose renal em muitas formas de DRC, independentemente da lesão ocorrer inicialmente no tubulointerstício ou no glomérulo renal (HAO et al., 2011; He et al., 2011; DIROCCO et al., 2013; XIAO et al., 2015; SHUNK, 2021).

A partir desse conjunto de evidências, alguns trabalhos tem indicado que enquanto a sinalização WNT β catenina transitória é essencial para acelerar o reparo tubular e a recuperação renal, uma ativação exagerada e sustentada dessa sinalização desencadeia respostas lesivas ao sistema orgânico, levando à DRC. Esses estudos apontaram o papel da via na lesão renal observando o aumento da sinalização renal WNT em vários modelos de fibrose renal, incluindo obstrução uretral unilateral. A principal causa disso, apontada pela literatura, é que a ativação da via WNT β catenina pode levar a aumento da expressão intersticial dos constituintes da matriz extracelular, incluindo procolágeno tipo I e fibronectina pelos fibroblastos. Dessa forma, ocorre um acúmulo e desorganização da homeostase da matriz que culmina em uma maior gravidade da fibrose renal (figura 7). (DAI et al, 2009; SHI et al, 2016; SCHUNK, 2021).

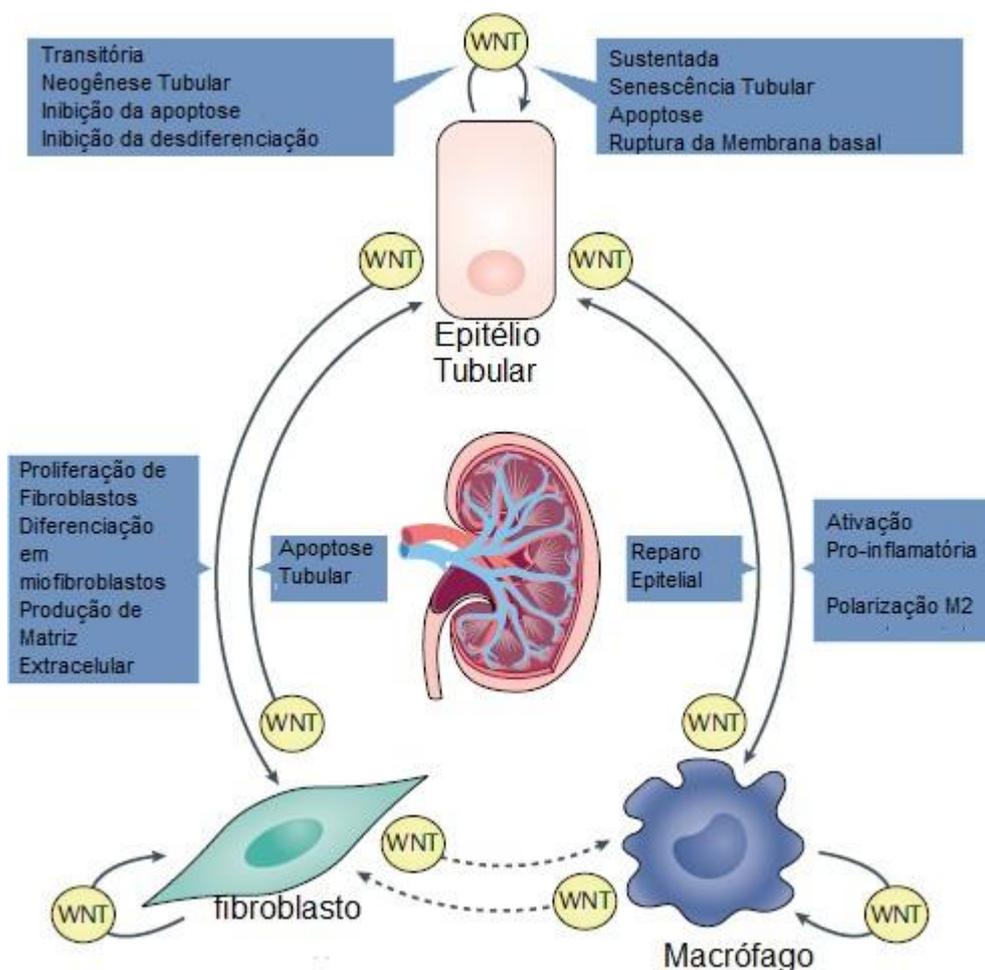


Figura 7-O papel da WNT β catenina na regulação da interação entre células epiteliais tubulares, fibroblastos e macrófagos. Os ligantes WNT podem atuar de maneira autócrina ou parácrina. Em células epiteliais tubulares, a ativação da via WNT β catenina transitória exerce efeitos regenerativos, enquanto a sinalização sustentada induz dano tubular. Em fibroblastos, ligantes WNT derivados de epitélio induzem sua ativação e um fenótipo profibrótico. Em macrófagos, ativação do WNT β catenina induz ativação pró-inflamatória, bem como polarização em direção ao fenótipo M2. Por sua vez, ligantes WNT derivados de fibroblastos e derivados de macrófagos interagem diretamente com as células tubulares. Uma interação direta entre macrófagos e fibroblastos mediados pela via WNT é provável, mas ainda não foram comprovados. Fonte: Adaptado de SCHUNK et al., 2021.

Além disso, o aumento da via de sinalização WNT, desregula a expressão de metaloproteinases que podem ser importantes na remodelação da matriz extracelular e na perda da integridade da membrana na NL, inclusive aumento da expressão das metaloproteinases 2, 7 e 9 acompanhadas na mudança qualitativa da composição do colágeno tipo IV. A literatura ainda mostra a sinalização WNT como alvo de intervenção potencial nos processos de doença renal fibrótica e

possivelmente inflamatória (SURENDRAN, MCCAUL & SIMON, 2002; TVEITA, REKVIG & ZYKOVA, 2008; HWANG, SEO & HA, 2009; SHI et al, 2016; SCHUNK, 2021).

2.8.1 O papel das proteínas antagonistas da via WNT β catenina na Nefrite

Lúpica: DKK1 e SOST1

A ativação da sinalização WNT β catenina pode ser desencadeada pela ligação do ligante WNT ao seu co-receptor de proteína 5 relacionada ao receptor de lipoproteína de baixa densidade (LRP-5) ou família de proteínas LRP6 e frizzled (FZD) (TAMAI, 2000). Curiosamente, a sinalização WNT também pode ser regulada por antagonistas extracelulares, como a família Dickkopf (DKK) de proteínase Esclerostina (SOST) (MALINAUSKAS, 2014; CHICANA et al., 2019; KIM et al., 2020). A família DKK compreende quatro membros de proteínas, DKK1 (DKK1), DKK2, DKK3 e DKK4, que são sintetizadas como proteínas precursoras ativadas por clivagem proteolítica. Dentro do grupo, os DKK são os membros mais estudados, pois podem inibir a sinalização WNT ligando-se ao LRP5/6 e degradando o correceptor e, portanto, têm sido considerados como alvos potenciais em doenças com hiperativação da via WNT (LIANG et al., 2015). Um nível significativamente maior da proteína DKK1 já foi observada tanto no soro quanto na urina de pacientes com LES em comparação com coortes saudáveis. Em 2017, o estudo de Xue et al. mostrou que o DKK1 sérica foi considerado um ótimo biomarcador positivo para identificação de LN em pacientes com LES. Indicando que o DKK1 sérico e/ou urinário pode ser um biomarcador promissor para auxiliar no diagnóstico de NL em pacientes com LES ou que apresentam risco aumentado para a complicação (XUE et al., 2017).

A Esclerostina (SOST) é uma glicoproteína secretada que é predominantemente expressa em osteócitos, porém pode ser encontrada em diversos órgãos e tecidos, como fígado, pele, pulmão, artérias e rins. A SOST também tem papel importante na inibição da sinalização da via WNT canônica por meio da ligação nas proteínas LRP5/6 (LINTERN, 2009; AHN et al., 2011). Um estudo recente apontou papéis importantes para o domínio de esclerostina-1 (*Sostdc1*) no desenvolvimento e função das células que atuam no sistema imunológico, como células NK, induzindo respostas pró-inflamatórias. Além disso, estudos apontam que os níveis de esclerostina sérica aumentam ao longo da progressão da DRC para atingir níveis que vão de duas a quatro vezes maiores em pacientes com doença renal em estágio terminal em comparação com indivíduos com função renal normal. Nesse aspecto, alterações associadas ao controle da sinalização WNT podem mediar lesões autoimunes por meio das células do sistema imunológico (CEJKA, 2011; PELLETIER, 2013; KANBAY, 2014; CHICANA, 2019; SHUNCK, 2021). A atuação da DKK1 e Esclerostina na via WNT é evidenciada na figura 8.

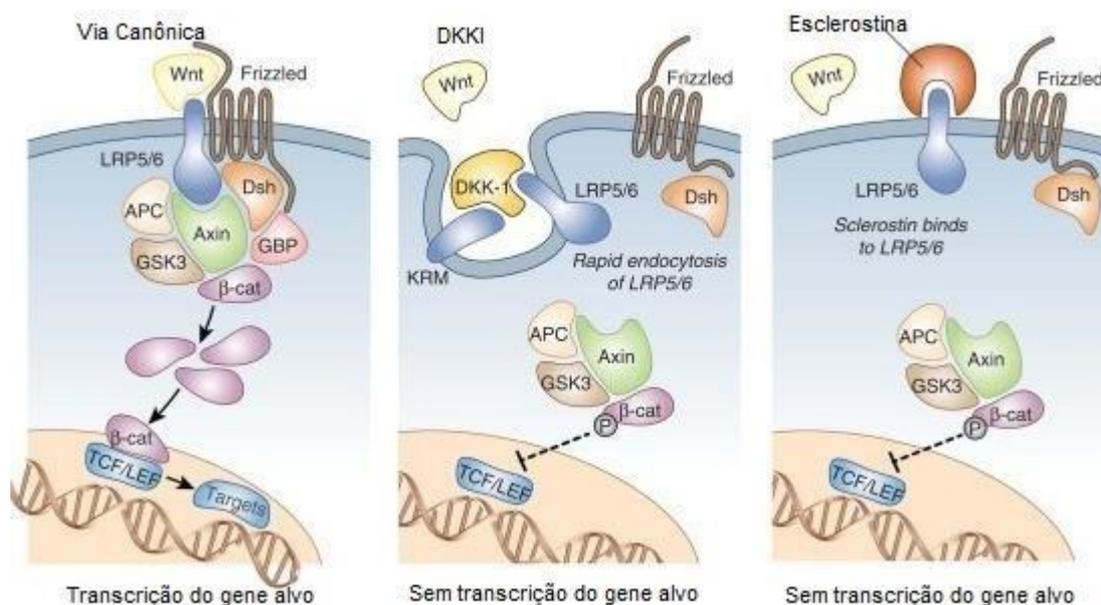


Figura 8 -Via canônica de sinalização WNT βcatenina e sua regulação extracelular. (Painel esquerdo). A ligação extracelular de Wnt ao complexo do receptor Frz – LRP5/6 causa o acúmulo intracelular de βcatenina que pode induzir a expressão de genes alvo após a translocação para o núcleo. (Painel do meio) DKKI diminui a sinalização Wnt formando um complexo terciário com LRP5/6 e o correceptor de superfície celular, Kremen-1 (KRM), promovendo assim a internalização do complexo receptor. (Painel direito) A esclerostina inibe a sinalização induzida por Wnt ligando-se a LRP5 /6, evitando assim que Wnt se ligue ao complexo receptor Frz – LRP5/6. Fonte: Adaptado de EVENEPOEL, 2015.

2.8.2 O receptor LRP5 da via WNT e sua relação com a lesão renal

Os receptores de lipoproteínas de baixa densidade (LDLR) estão envolvidos em uma variedade de funções celulares. Os membros da família LDLR incluem receptor LDL, LRP (também denominado LRP1), megalina (LRP2), receptor VLDL, apoER2 (LRP8), SorLA / LR11, LRP1b, LRP3, MEGF7 (LRP4) e LRP5/6 (REN, et al., 2021). No entanto, cada membro da família é expresso em uma gama de tecidos distintos e possuem uma amplitude de ligantes diferentes (JOINER et al., 2013). Além disso, LRP5/6 são únicos no número e arranjo de suas repetições LDLR em comparação com outros membros da família. A LRP5/6, como correceptores de ligantes WNT são componentes-chave e necessários de seu complexo receptor para a sinalização WNT βcatenina (TAMAI et al., 2000; REN et al., 2021). E evidências têm demonstrado que o gene *LRP5*

pode desempenhar um papel importante na doença renal policística autossômica dominante (CNOSSEN et al., 2016). Um estudo *in silico* identificou um total de quatro variantes diferentes de *LRP5*, que poderiam participar da patogênese de doenças renais, sugerindo que as variantes da *LRP5* podem contribuir para a cistogênese renal. Os ensaios de luciferase também mostram que três das variantes *LRP5* reduzem significativamente a ativação da sinalização WNT β catenina (CNOSSEN et al., 2016). Somado a isso, o estudo de Wang et al. observou em embriões de camundongo nocaute para *LRP6* (18,5 dias após o coito) pequenos rins císticos macroscópicos, sugerindo um fenótipo de doença renal policística (WANG et al., 2016). Esses achados indicam que o *LRP6* desempenha um papel fundamental durante o desenvolvimento renal inicial e que o *LRP5*, embora não afete o desenvolvimento renal inicial, pode contribuir parcialmente para a cistogênese renal após a maturação renal, afetando a sinalização de WNT β catenina. As evidências apontam ainda que a sinalização WNT β catenina é hiperativada no tecido renal após lesão, e a ativação sustentada desta via acelera a progressão de lesão renal aguda para a cronicidade (HE et al., 2009; XIAO et al., 2015 ; ZHOU et al., 2016).

Embora *LRP5/6* sejam correceptores na via WNT β catenina, seu papel exato na doença renal não é claro. Um estudo recente mostrou que a expressão de *LRP5* é regulada positivamente em túbulos renais de diabetes tipo 1 e tipo 2 e modelos de nefropatia obstrutiva; Além disso, o nocaute de *LRP5* no rim do modelo de obstrução ureteral unilateral desregulou a sinalização de TGF- β /Smad e, com isso, melhorou a fibrose túbulo intersticial sem alterar a sinalização WNT β catenina (HE et al., 2020). Os autores observaram ainda que o *LRP5* poderia interagir com o receptor I de TGF- β ($T\beta$ RI) e $T\beta$ RII, promovendo assim a

formação de heterodímeros $T\beta RI / T\beta RII$ e regulando a sinalização de $TGF-\beta / Smad$ em células epiteliais do túbulo renal humano (HE et al., 2020).

2.8.3 Os genes *WNT2* e *WNT16*

Os genes *WNT2* e *WNT16* são membros da família de genes WNT. Os genes dessa família estão estruturalmente relacionados e codificam proteínas de sinalização. Essas proteínas têm sido implicadas na oncogênese e em vários processos de desenvolvimento, incluindo a regulação do destino celular e padronização durante a embriogênese. Evidências científicas têm relacionado o aumento da proteína *WNT2* com uma hiperatividade de fibroblastos nos tecidos, principalmente no microambiente tumoral, criando um ambiente favorável ao crescimento celular e à continuidade do processo tumorigênico (JUNG et al., 2015; UNTERLEUTHNER et al., 2020). Na Nefrite lúpica, ocorre um aumento desregulado da produção de componentes da matriz extracelular pelos fibroblastos, como fibronectina e procolágeno tipo I, além das metaloproteinases que colaboram com a instalação da lesão renal, demonstrando que o aumento da expressão do gene *WNT2* pode estar associado ao desequilíbrio da produção desses componentes da matriz extracelular levando a degradação da integridade das membranas no tecido e à fibrose renal (DAI et al, 2009; SHI et al, 2016).

A proteína *WNT16* é uma mediadora da via WNT β catenina e evidências recentes tem indicado que em situações de alteração na expressão, como em processos inflamatórios e lesivos aos tecidos, essa proteína pode atuar com função protetora e inibitória da via WNT (NALESSO et al., 2017). Entretanto, os dados na literatura sobre a atuação da *WNT2* e *WNT16* na NL ainda são bastante escassos.

2.8.4 A função do BMP2 como mediador nas doenças autoimunes

As proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) foram identificadas inicialmente por sua função na indução da formação óssea *in vivo* (DUCY et al., 2000). As BMPs são membros da superfamília TGF-B. Essas proteínas iniciam a cascata de sinalização através da ligação com ligante e a ativação de um complexo de quinases de receptor transmembranar de serina/treonina, tipo I e tipo II (CHEN et al., 2004). O receptor BMP tipo I ativado fosforila Smad-1 e Smad-5, resultando em sua dissociação do complexo receptor. o Smad1 fosforilado e Smad5, então, formam complexos heteroligoméricos com Smad4 e translocam para o núcleo ativando a transcrição de genes alvo. A via de sinalização BMP/Smad também é regulada negativamente pelas proteínas Smads divergentes da subfamília do inibidor Smads: Smad-6 e Smad-7 (ATTISANO e WRANA, 2000; GRAHAM et al., 2009). As BMPs e os membros da NF-kB tem uma relação importante para o desencadeamento de agravos autoimunes. Isso porque, os membros NF-kB ligam-se aos seus elementos de resposta cognatos, como homo ou heterodímeros, para modular a expressão de uma matriz de genes implicados em diversos processos celulares, inclusive o gene BMP-2. Nas células quiescentes, proteínas NF-kB são sequestradas no citoplasma, fosforiladas, ubiquitinadas e posteriormente degradadas pelo proteassoma 26S. Isso resulta na translocação nuclear de NF-kB. Já a ativação inadequada de NF-KB e, concomitantemente, de BMP2 foi associada a várias doenças inflamatórias, incluindo LES, nefrite imunomediada e tireoidite linfocitária crônica (AKSENTIJEVICH e ZHOU, 2017). Além disso, a STAT3 é um membro da família de proteínas STAT e é ativada através da fosforilação em resposta a várias citocinas e fatores de crescimento, incluindo BMP2; e cabe destacar que a STAT3

também participa no desencadeamento e manutenção de doenças autoimunes, incluindo LES e LN (FLANAGAN et al., 2014).

2.9 Relação da via WNT com células imunes do tecido sanguíneo na resposta autoimune e inflamatória

As células-tronco hematopoiéticas (HSCs) são capazes de se diferenciar em células progenitoras hematopoiéticas (HPCs), que podem se diferenciar ainda em células imunes, como células T, células B, células NK e macrófagos. Algumas evidências científicas demonstraram que a via de sinalização WNT β catenina apresenta importante função na manutenção, proliferação, diferenciação e auto-renovação das HSCs (AHMADZADEH et al., 2016). As proteínas reguladoras da via WNT podem ser produzidas tanto pelas HSCs como também pelas células presentes no microambiente hematopoiéticos em adultos e também em fetos humanos (STAAL et al., 2008; SHI et al., 2016).

Além de seus papéis regulatórios em HSCs, a importância da sinalização WNT no desenvolvimento de células T também está bem estabelecida. Nesse contexto, a sinalização WNT fornece sinais proliferativos cruciais para células T imaturas, o que é corroborado por estudo experimental em camundongos deficientes para os fatores de transcrição responsivos a WNT, TCF1 e LEF1, nos quais o desenvolvimento de células T e B foi defeituoso (STAAL et al., 2008). Ainda nesse sentido, foi demonstrado que a via canônica de WNT β catenina/ fator de células T (TCF) regula a diferenciação de células T, tanto no timo quanto em tecidos linfóides periféricos, e uma disfunção desta via em qualquer estágio da diferenciação dessas células poderia levar a grave autoimunidade ou deficiência

imunológica (MA et al., 2012). Outras evidências associam a expressão de uma forma estável de β catenina com um aumento na sobrevivência de células Treg $CD4^+ / CD25^+$ *in vitro*, sugerindo que uma estabilização de β catenina tem um impacto sobre a prevenção de doença inflamatória aumentando a sobrevivência de células Treg existentes e mantendo precursores de células T efetoras sem resposta. Dessa forma, uma ativação da sinalização WNT em uma condição inflamatória poderia reprimir a função das células Treg, que por sua vez permitiria o desencadeamento de uma resposta imune, e, se o processo não fosse controlado, poderia culminar no desencadeamento de respostas autoimunes (DING et al., 2008; VANLOOSDREGT, et al., 2013; SHI et al., 2016).

Somado a isso, a sinalização WNT ainda apresenta importância crítica para a diferenciação de HSCs em células B com função normal, entretanto, os estudos que abordam a sinalização WNT em células B são escassos. Porém, existem várias evidências de hiperativação WNT em células B que estavam relacionados à autoimunidade (MURALIDHARAN et al., 2011; TOKUDA et al., 2014; NOVO et al., 2015). Por exemplo, a via canônica WNT poderia induzir a sobrevivência e proliferação das células B-1, estimulando a expressão dos genes alvo WNT de c-Myc e ciclina D1 (NOVO et al., 2015; SHI et al., 2016).

A partir do panorama apresentando, o estudo se propôs avaliar o padrão de expressão de genes da via WNT β catenina em uma coorte brasileira com NL durante o curso do tratamento dos pacientes em um intervalo de 0 a 12 meses. Nesse sentido, a hipótese do trabalho é que a via WNT β catenina pode ser um elo importante para a injúria e fibrose renal da NL e, também, um candidato a biomarcador de resposta à terapia.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Analisar o perfil de expressão de genes da via WNT β catenina em sangue periférico de pacientes com nefrite lúpica durante o curso de tratamento em um estudo coorte prospectivo.

3.2 Objetivos específicos

- 1.** Identificar perfil epidemiológico, clínico e laboratorial de coorte de pacientes com NL.
- 2.** Avaliar o perfil de expressão dos genes da via WNT (*DKK1*, *SOST*, *LRP5*, *WNT2*, *WNT16* E *BMP2*) em diferentes momentos no tratamento de NL no período de 1 ano.
- 3.** Avaliar os padrões de expressão gênicas da via WNT no decorrer do tempo de tratamento da NL e associar com características clínicas e laboratoriais.

4. Material e Métodos

4.1 Local de estudo, pacientes e amostras

A seleção dos pacientes e coletas de sangue foram realizadas no ambulatório do setor de Nefrologia do Hospital das Clínicas/Universidade Federal de Pernambuco (HC-UFPE) em pacientes que se encontram acompanhados pelos pesquisadores parceiros e equipe do ambulatório de Glomerulonefrite do Hospital das Clínicas da UFPE. As amostras foram coletadas em 5 momentos para comparação entre os grupos: no início do tratamento para a Nefrite lúpica (T=0M), momento da realização da biópsia, três meses sob o tratamento (T=3M), seis meses (T=6M), 9 meses (T=9M) e um ano (T=12M) .

As amostras de sangue foram coletadas e armazenadas no Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA/UFPE). No estudo foram incluídos 14 pacientes com mais de 18 anos de idade, com diagnóstico de lúpus de acordo com os critérios EULAR/ACR e nefrite lúpica com confirmação histológica por biópsia renal (classes III-V) e com o consentimento informado por escrito. Pacientes que não preencheram os critérios para LES (pelo menos > 4 critérios ACR ou biópsia de nefrite lúpica mais FAN ou anti-DNA) ou aqueles sem laudo histopatológico de nefrite lúpica foram excluídos. Os parâmetros clínicos e bioquímicos, como os exames que avaliam a função renal e correlatos (Creatinina sérica, Albumina sérica, proteinúria, C3 e C4) e dados da biópsia (índice de atividade, índice de cronicidade, Classe Histológica), além da caracterização da população de estudo foram retirados do prontuário e foram utilizados para comparação.

A terapia utilizada pelos pacientes da coorte consistiu em indução com metilprednisolona intravenosa, seguida de prednisona oral e 6 bolus de

ciclofosfamida intravenosa (500-1g) ou micofenolato de mofetil 2-3g / dia. Após a indução, os pacientes iniciam uma terapia de manutenção com micofenolato de mofetil.

4.2 Extração de RNA e síntese do cDNA

Inicialmente, foi isolado PBMC do sangue total utilizando Ficoll Paque Plus (Sigma). Em seguida, o RNA foi isolado de PBMC utilizando Trizol® (Invitrogen, USA). As amostras de RNA foram armazenadas em deep freezer - 80°C. Para a síntese de cDNA, foi utilizado o kit GoScript™ Rev Trans Mix (Promega, USA), empregando para cada amostra uma entrada padrão de 500ng do RNA total em cada reação de 20 ul de cDNA. Oligo (dT) foi usado como primer em todas as amostras. O cDNA foi armazenado a -20°C até os ensaios de expressão gênica.

4.3 Ensaios de expressão gênica

Os níveis de mRNA foram determinados para genes alvo (*SOST*, *LRP5*, *DKK1*, *WNT2*, *WNT16* e *BMP2*) nas amostras de cDNA, utilizando sondas de ensaio Taqman Gene Expression (*SOST* - Hs00228830_m1) (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) e primers, bem como dois genes de referência (*RPLP0* e *EF1A*) que foram previamente validados para normalização dos dados (Tabela 02). No caso da utilização de primers, estes foram desenhados através do programa Primer Express disponível na plataforma ABI7500 (Applied Biosystems, USA) que apresenta as condições necessárias para desenho de primers para expressão gênica. Na tabela 03 estão as sequências dos primers utilizados no estudo. Os ensaios de expressão foram realizados na plataforma ABI 7500 (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). A quantidade relativa (RQ) do mRNA foi calculada pelos valores do ciclo de quantificação (Cq) obtidos para o gene alvo

e cada um dos genes de referência de todas as amostras. Em seguida, o valor médio para cada gene em cada grupo foi usado para calcular os níveis de mRNA usando $2^{-\Delta\Delta Cq}$ como método de quantificação neste estudo (Livak e Schmittgen, 2001). Todos os ensaios qPCR foram realizados em triplicatas técnicas.

Tabela 02- Sequências dos primers utilizados nas análises de expressão gênica do estudo

Gene	Primer sequences / Taqman [®] probe reference	Product size/bp	R ²	E/%
WNT2	F: GATGCCAGAGCCCTGATGAA	77	0.999	104.79
	R: TGGCACTTGCACTCTTGTTTC			
WNT16	F: CTGTGGCCGAGGTTACAACA	84	1	100.51
	R: CGGACATAGCAGCACCAGAT			
BMP2	F: CTGCAACAGCCAACTCGAAA	79	0.999	98.38
	R: TTCCCACCTGCTTGCAATTCT			
EF1A	F: GAGGCTGCTGAGATGGGAAA	74	1	102.37
	R: CGTTCACGCTCAGCTTTCAG			
RPLP0	F: GCGACCTGGAAGTCCAATA	100	0.999	102.02
	R: TCTGCTTGGAGCCCACATTG			
LRP5	F: ATCGCATGCGGAAAGTCCAT	80	0.999	96.81
	R: CCGGCAAGACAGACCTTCTC			
DKK1	F: AGGTCAAGTGTGTACCAAGCA	74	0.99	101.43
	R: CCGGCAAGACAGACCTTCTC			

4.4 Análises estatísticas

Os dados obtidos foram analisados pelo software GraphPadPrism[®] versão 8.0. A estatística descritiva foi feita usando a média \pm desvio padrão. O valor de p foi obtido através do teste T pareado para os dados paramétricos e

do teste de Wilcoxon para os dados não paramétricos na comparação entre dois grupos. Para a comparação entre diferentes grupos, foi utilizada a análise de variância (ANOVA) para os dados paramétricos e o teste de Kruskal-Wallis para os dados não paramétricos. A significância estatística foi considerada, comum nível crítico de 5%, em todos os casos

4.5 Comitê/Comissão de ética

Todos os pacientes recrutados assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido. Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética da Universidade Federal de Pernambuco (CAAE 11401219.2.0000.8807) e está de acordo com a Declaração de Helsink.

5. Resultados

5.1 Caracterização da coorte estudada

De acordo com os critérios de seleção (seção 4.1) foram selecionados 14 pacientes com LES que apresentaram a NL como complicação da doença de base para o presente estudo. Desses pacientes, 13 (92,86%) foram do sexo feminino, enquanto 1 (7,14%) do sexo masculino. A caracterização racial dos pacientes foi avaliada por meio da autodeclaração. Esses dados são relevantes, visto que o fator racial é associado à gravidade da NL. Entre os indivíduos do estudo, 5 (35,71%) se declararam brancos, enquanto 9 (64,29%) se declararam pardos.

Na tabela 03 estão apresentadas a média \pm desvio padrão das características epidemiológicas da coorte como idade atual ($29,80 \pm 8,37$); idade de diagnóstico do LES ($24,52 \pm 8,31$); tempo de diagnóstico (em meses) do LES ($75,72 \pm 70,81$), idade de diagnóstico da NL ($27,38 \pm 11,06$), tempo de diagnóstico da NL (em meses) ($48 \pm 44,90$), SLICC ($7,71 \pm 3,07$), peso ($59,50 \pm 13,99$), altura ($1,59 \pm 0,07$) e índice de massa corporal (IMC) ($23,35 \pm 4,62$).

Tabela 03 - Caracterização epidemiológica e clínica dos pacientes da coorte de estudo.

Caracterização da Coorte	Média \pm Desvio Padrão
Idade atual	$29,80 \pm 8,37$
Idade de diagnóstico do LES	$24,52 \pm 8,31$
Tempo de diagnóstico LES (em meses)	$75,72 \pm 70,81$
Idade de diagnóstico da NL	$27,38 \pm 11,06$
Tempo de diagnóstico da NL (em meses)	$48 \pm 44,90$
SLICC	$7,71 \pm 3,07$
Peso	$59,50 \pm 13,99$
Altura	$1,59 \pm 0,07$
IMC	$23,35 \pm 4,62$

LES= Lúpus Eritematoso sistêmico; NL= Nefrite lúpica; SLICC - Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology - Damage Index; IMC - Índice de Massa corporal.

Os dados relacionados ao perfil da biópsia renal da coorte, como a classe histológica predominante, presença ou ausência da classe V, percentagem de glomérulo esclerosado, percentagem de glomerulonefrite proliferativa, percentagem de glomerulopatia crescente, atrofia tubular e fibrose Intersticial, índice de atividade e índice de cronicidade foram levantados apenas no início do tratamento (T=0M) (Tabela 04). Isso porque, a repetição da biópsia renal é indicada após o tempo mínimo de 1 ano do início do tratamento, salvo algumas exceções (KLUMB et al., 2015).

Tabela 04 – Características Histopatológicas das Biópsias renais na coorte de pacientes com NL.

Características histopatológicas das biópsias de tecido renal	
% Glom	18,92 ± 14,06
% Esclerose Global	12,54 ± 18,30
% Glomerulonefrite proliferativa	46,98 ± 38,95
% Crescente/Fc	25,40 ± 28,70
AT/FI	13,08 ± 12,17
IA	6,77 ± 4,88
IC	3,08 ± 2,36
Classe histológica (CL)	CL3 = 23,08%; CL4 = 61,54%; CL5 = 15,38%
Presença de Classe V	53,85%

%glom = percentagem de glomérulo esclerosado; %glomerulonefrite = percentagem de glomerulonefrite proliferativa; %crescente/FC = Percentagem de glomerulopatias com formação crescente; AT/FI= Atrofia tubular e fibrose intersticial; IA= Índice de Atividade; IC= índice de cronicidade; CL3= classe Histológica 3; CL4 = classe Histológica 4; CL5= classe Histológica 5.

Ainda para uma melhor caracterização dos pacientes, os dados clínicos e marcadores laboratoriais como albumina sérica, proteinúria, além do índice de atividade da doença (SLEDAI) e a concentração da terapia medicamentosa utilizada (prednisona e micofenolato de mofetila), foram acompanhados e avaliados em intervalos de 3 meses. Cabe destacar também que a comorbidade

clínica mais prevalente na coorte foi a hipertensão arterial sistêmica, sendo apresentada por 8 indivíduos (57,15%) (Tabela 05). O Diabetes Mellitus não foi relatado nesses pacientes.

As análises estatísticas usando o One-way ANOVA (dados paramétricos) e o teste de Friedman (dados não-paramétricos) para múltiplas comparações demonstraram associação entre as características clínicas em distintos momentos do tratamento. O SLEDAI apresentou associação significativa entre os tempos T=0M e T=9M ($p = 0,0191$), e entre o T=0M e T=12M ($p = 0,0466$) com redução desse índice. A dose de prednisona (mg/dia) demonstrou redução com associação estatística no T=0M e T= 6M ($p = 0,0237$); T=0M e T=9M ($p < 0,0001$); T=0M e T=12M ($p < 0,0001$); T=3M e T=9M ($p = 0,0156$); e T=3M e T=12M ($p = 0,0051$). A Albumina sérica demonstrou aumento significativo entre o T=0M e T=9M ($p = 0,0153$); T=0M e T=12M ($p = 0,0004$); e T=3M e T=12M ($p = 0,0095$). Os níveis de C3 apresentaram aumento na associação estatística entre T=0M e T= 6M ($p = 0,0119$); T=0M e T=9M ($p = 0,0015$); T= 0M e T=12M ($p = 0,0119$). Quanto aos níveis de C4, demonstraram diferença significativa entre o T=0M e T=6M ($p = 0,0117$) e T=0M e T=9M ($p = 0,0020$) com tendência de aumento da enzima durante o tratamento.

Entretanto, o micofenolato de mofetila (mg/dia) ($p = 0,0346$), os níveis de creatinina sérica ($p = 0,2350$) e proteinúria de 24 horas ($p = 0,0617$) não demonstram diferença significativa entre os diferentes períodos (Tabela 05)

Tabela 05 - Dados clínicos da coorte coletados durante o período de 1 ano de seguimento no tratamento dos pacientes com NL.

Dados Clínicos	1° Coleta (T=0M)	2° Coleta (T=3M)	3° Coleta (T=6M)	4° Coleta (T=9M)	5° Coleta (T=12M)	P Value	P Post-Hoc
	Média ± Desvio Padrão	-	-				
SLEDAI	12,71 ± 4,03	5,4 ± 5,08	1,25 ± 1,49	0,57 ± 0,98	1,6 ± 3,50	0.018	<i>P</i> = 0,0191 (T=0M vs. T=9M) <i>P</i> = 0,0466 (T=0M vs. T=12M)
Prednisona (mg/dia)	40,71 ± 16,39	23,21 ± 10,85	16,43 ± 10,46	8,03 ± 6,66	5,38 ± 7,96	<0.0001	<i>P</i> =0,0237 (T=0M e 6M) <i>P</i> <0,0001 (T= 0M vs. T=9M e T=0M vs. T=12M) <i>P</i> = 0,0156 (T=3M vs. T=9M) <i>P</i> =0,0051 (T=3M vs. T=12M)
MMF (mg/dia)	1000 ±1388	887,69 ± 1031,553	1393 ± 924	1643 ± 819	1731 ± 865	0.0346	-
Hipertensão Arterial	57,15%	-	-	-	-	-	-
Creatinina sérica	1,288 ± 0,56	1,22 ± 1,12	1,46 ± 2,04	1,34 ± 1,20	1,26 ± 1,04	0.2350	-
Albumina Sérica	2,73 ± 0,75	3,21± 0,60	3,55 ± 0,52	3,75 ± 0,38	3,94 ± 0,39	<0.0001	<i>P</i> =0,0153 (T=0M vs. T=9M) <i>P</i> =0,0004 (T=0M vs. T=12M) <i>P</i> = 0,0095 (T=3M vs. T=12M)

PTN 24H	3.675 ± 3.042	2.224 ± 1.267	1.537 ± 1235	1.244 ± 927	1.097 ± 966	0.0617	-
C3	48,71 ± 19,99	73,92 ± 16,14	90,92 ± 18,62	93,85 ± 21,28	90,2 ± 17,47	0.0005	<p>$p= 0,0119$ (T= 0M vs. T=6M)</p> <p>$p= 0,0015$ (T= 0M e vs. T=9M)</p> <p>$P= 0,0119$ (T=0M e T= 12M)</p>
C4	10,76 ± 12,51	14,08 ± 7,52	20,5 ± 11,67	22,77 ± 13,68	17,33 ± 8,66	0.017	<p>$p =0,0117$ (T= 0M vs. T=6M)</p> <p>$P= 0,0020$ (T=0M vs. T=9M)</p>

SLEDAI = Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index; (mg/dia) = miligrama por dia; MMF = Micofenolato de mofetila; PTN 24H= proteinúria de 24 horas.

5.2 Análise de Expressão Gênica

O gene *WNT16* apresentou diferenças estatisticamente significativas entre seus níveis de expressão entre o início do tratamento e T=3M (FC= 1338,47 ± 243,9, $p= 0,0078$) (figura 9c e 10). Não observamos diferenças significativas nas expressões dos genes: *DKK1* (FC=11,65 ± 2,89, $p= 0,849$) (figura 9a), *LRP5* (FC= 0,013 ± 0,003, $p= 0,258$) (figura 9b) e *BMP2* (FC= 9,93 ± 2,49, $p=0,291$) (figura 9d) entre os tempos estudados.

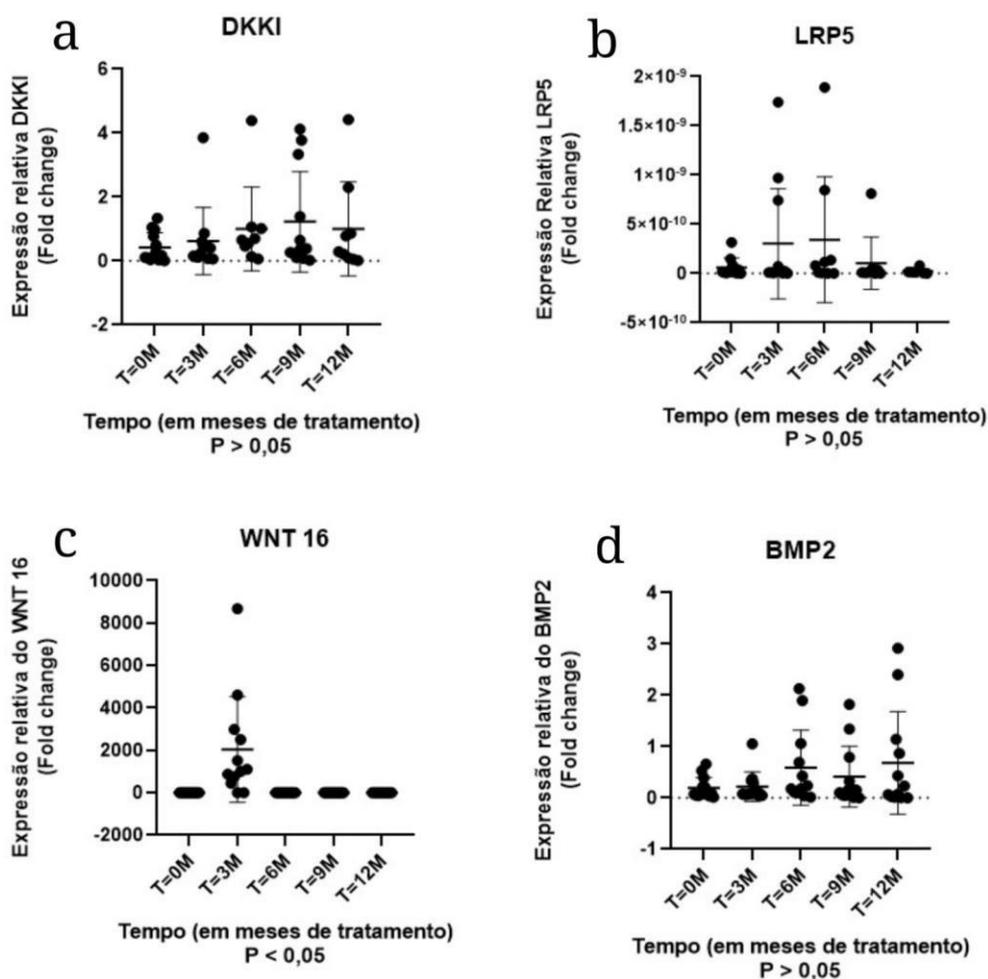


Figura 9 - Expressão Gênica dos genes da via WNT β catenina. **a)** Expressão relativa do *DKK1* (Fold Change). **b)** Expressão relativa do *LRP5* (Fold change). **c)** Expressão relativa do *WNT16* (Fold change). **d)** Expressão relativa do *BMP2* (Fold Change). Os níveis de expressão dos grupos no T=0M, T=3M, T=6M, T=9M e T=12M estão representados. Os níveis de mRNA foram normalizados usando os genes de referência *EF1A* e *RPLP0*.

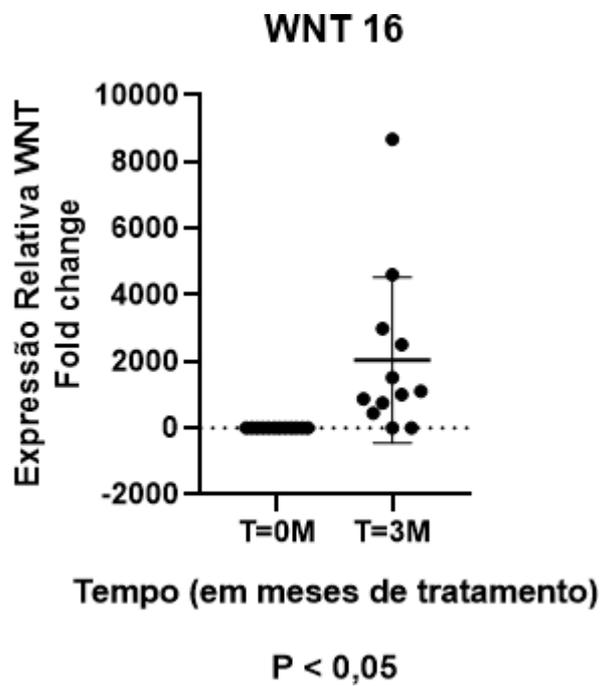


Figura 10 - Destaque para a expressão relativa do *WNT16* (Foldchange) nos tempos T=0M e T=3M.

Além disso, não obtivemos valores mínimos detectáveis de expressão dos genes *SOST* e *WNT2* nos dois primeiros momentos do estudo (T=0M e T=3M) e, dessa forma, os genes não foram avaliados.

6. Discussão

Em relação aos dados epidemiológicos avaliados na coorte desse estudo, observamos a relação de NL de 13:1 para as mulheres relacionados aos homens. Isso corrobora com a literatura, na qual a relação entre a prevalência do LES e suas complicações por sexo é de até 15:1 para as mulheres, sendo isso condicionado principalmente aos fatores hormonais (VILAR & SATO, 2002; NAKASHIMA et al., 2011; REES et al., 2017).

A distribuição étnica dos pacientes também é fator importante na NL, uma vez que estudos têm demonstrado que indivíduos com afrodescendência e latinos americanos apresentam maior risco de ter essa alteração dentre os pacientes com LES, além de um pior prognóstico, quando comparado com os caucasianos; isso se dá principalmente pelo background genético e a contribuição de fatores ambientais dessas regiões (CONTRERAS et al., 2006; ALMAANI, MEARA & ROVIN, 2016). Na análise dos dados do grupo estudado, por meio da autodeclaração, temos que 64,29% dos indivíduos se consideram pardos, em concordância com a literatura. Além disso, a idade de diagnóstico do LES ressalta que a idade média de apresentação da doença no grupo do estudo ($24,52 \pm 8,31$), variando entre 18 e 43 anos, se dá principalmente na idade reprodutiva e, baseado em estudos prévios, isso também pode estar relacionado ao aumento da susceptibilidade do LES associado às alterações hormonais. A idade de diagnóstico da Nefrite Lúpica ($27,38 \pm 11,06$) também corrobora que os eventos hormonais tenham papel importante, pois seu pico de incidência é em adultos na

idade reprodutiva (KYTTARIS et al., 2010; ALMAANI, MEARA & ROVIN, 2016; REES et al., 2017).

Em relação às implicações evidenciadas quando analisados o tempo de diagnóstico do LES e sua relação com o tempo de diagnóstico da NL, foi observado que 50% (7) da nossa casuística descobriu a NL no mesmo período do diagnóstico do LES, 28,6% (4) apresentaram a sintomatologia da NL entre o intervalo de 11 e 36 meses após o diagnóstico do LES, no entanto, 21,4% (3) dos indivíduos apresentaram o estabelecimento da NL entre 3 e 18 anos com a doença base. Alguns fatores sobre a etiopatogênese da NL podem ser levados em consideração para compreensão desses resultados. A NL é uma manifestação complexa e heterogênea, seu desencadeamento pode estar associado a uma gama de fatores genéticos, ambientais e estímulos hormonais. Nesse sentido, a combinação desses fatores ao longo do curso do LES é que irão determinar quando ou se a NL será estabelecida no paciente com a doença. Ainda devemos considerar que pacientes com LES e com NL podem apresentar diferenças quanto à gravidade e resposta ao tratamento (KARAGIANNI et al., 2019). Segundo Santos-Araújo e Pestana, a NL é mais comumente apresentada pouco tempo após o estabelecimento do LES, entre 0 meses e 36 meses, entretanto os sinais da doença podem surgir em qualquer momento do curso do LES. Na coorte de estudo, 78,6% dos pacientes obtiveram o diagnóstico da NL com menos de 36 meses, corroborando com a literatura (SANTOS-ARAUJO & PESTANA, 2008).

Sobre a avaliação do status de massa corpórea dos pacientes, a literatura aponta que indivíduos com LES e suas complicações podem apresentar uma tendência ao aumento de peso associados a alterações metabólicas pela doença

ou pelo tratamento, pois alguns desses estimulam a deposição de gordura e o ganho de peso, como os glicocorticoides (SANTOS et al., 2010). O estudo de Santos et al., por exemplo, demonstrou que 64,2% de uma coorte de 170 brasileira coms LES apresentavam-se acima do peso ideal ($IMC > 25$). Entretanto, na nossa coorte, a partir da coleta do peso e altura no início do tratamento, a média do IMC foi de $23,35 \pm 4,62$, sendo destacados apenas um indivíduo com obesidade grau I ($IMC = 32,42$), três indivíduos com sobrepeso ($IMC = 25,34; 26,32$ e $26,70$) e dois com baixo peso ($IMC = 18,10$ e $17,58$). Os outros indivíduos estavam dentro dos parâmetros de normalidade ($IMC = 18,50-24,99$) definidos pela Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS). Ou seja, 28,57% da casuística apresenta excesso de peso. No entanto, a avaliação bruta do peso total de um indivíduo não consegue evidenciar adequadamente o seu status metabólico e nutricional, sendo necessário avaliar outros aspectos, como a composição corporal para dados e condutas clínicas mais assertivas. Ademais, é indispensável o acompanhamento desse índice, visto que o excesso de peso pode estar associado ao pior prognóstico do LES (SANTOS et al., 2010).

A caracterização detalhada da biópsia renal também foi realizada no T=0M e pode ser evidenciada na tabela 04. A classe histológica predominante nos pacientes é a NL difusa (IV) (61,54%), seguida da NL focal (III) (23,08%) e por último a NL membranosa (V) (15,38%). Entretanto, foram encontradas presença de lesões características de classe V em diferentes níveis em 53,85% das biópsias. Essa última característica é importante, visto que estudos têm demonstrado, por meio de biópsias seriadas, transformações dos padrões histológicos (MORONI et al., 1999). Além disso, alguns estudos têm indicado que a presença de classe IV, classe predominante na coorte, e fibrose intersticial

podem ser preditivas para a insuficiência renal crônica e falência renal (VELOSO, 2006).

Outras características que podem ser observadas na biópsia renal são o índice de atividade e índice de cronicidade. Esses índices semiquantitativos de atividade e cronicidade oferecem informações a respeito da severidade do comprometimento agudo ou crônico no rim e é um norteador preditivo e das diretrizes terapêuticas (SOARES, TELES & MOURA, 2005).

O índice de atividade (IA) é um score indicador de acometido agudo renal (0-24). Esse índice leva em consideração a hiperplasia endocapilar, infiltração leucocitária, depósitos hialinos subendoteliais e inflamação intersticial pontuando cada alteração histológica conforme sua gravidade entre (0-3); além disso, a necrose fibrinóide/cariorrexe e a presença de crescentes celulares também são avaliadas e pontuadas de (0-3), entretanto apresentam peso (2) na interpretação. Desse modo, quanto maior o valor do IA, maior será a atividade e risco de lesão aguda grave (SOARES, TELES & MOURA, 2005). O nosso grupo de estudo apresentou no IA médio de $6,77 \pm 4,88$, na biópsia de diagnóstico na NL

Já o índice de cronicidade (score de 0-12), aponta a tendência para cronificação da lesão renal na nossa coorte e se as lesões são reversíveis ou irreversíveis, ou seja, quanto maior o score, maior a probabilidade de cronicidade da lesão, a partir das seguintes alterações histopatológicas da coorte: porcentagem de glomérulos escleróticos ($12,54 \pm 18,30$), porcentagem de crescentes fibrosas / fibrocelulares ($25,40 \pm 28,70$), atrofia tubular e fibrose intersticial ($13,08 \pm 12,17$). Todas essas características histológicas são avaliadas conforme sua gravidade e pontuadas (0-3) (SOARES, TELES & MOURA, 2005).

O índice de cronicidade médio do grupo estudado foi de $3,08 \pm 2,36$. Cabe destacar aqui, que os dados da coorte foram representados de forma epidemiológica, no entanto, as análises do IA e IC são melhores interpretadas individualizadas, pois dependendo das alterações encontradas na biópsia, da gravidade da lesão no tecido e sua severidade, o padrão de lesão renal pode ser melhor caracterizado e buscado a diretriz de tratamento mais adequada (SOARES, TELES & MOURA, 2005).

Relacionado à caracterização clínico laboratorial, presente na tabela 05, a avaliação estatística demonstrou que o intervalo entre os momentos T=0M vs. T=3M foi insuficiente para uma mudança significativa nos achados clínicos dos pacientes. Esses resultados sugerem que apenas 3 meses de tratamento pode não ser tempo suficiente para ocorrer uma significativa mudança nos dados clínicos dos portadores da NL (KDIGO, 2012).

Quando avaliado os períodos T=0 vs. T=6M, nota-se associação estatística da dose de prednisona (mg/dia) ($p = 0,0237$), dos níveis de C3 ($p = 0,0119$) e nos níveis de C4 ($p = 0,0117$). A redução da prednisona do T=0M ($40,71 \pm 16,39$) para T=6M ($16,43 \pm 10,46$) é esperada visto que no momento do diagnóstico da NL, os pacientes geralmente estão em atividade e iniciam a terapia de indução para o controle da NL, utilizando bolus de medicamentos imunossupressores, incluindo glicocorticóides como a prednisona. Após a resposta do indivíduo ao tratamento e indução da remissão, as doses desses imunossupressores vão sendo reduzidas gradativamente e o paciente inicia o tratamento de manutenção. Concomitante a redução do processo inflamatório, ocorre o aumento das enzimas C3 e C4 séricas, pois essas são consumidas durante o período inflamatório. Desse modo, pode ser observado na coorte o aumento da dosagem sérica do C3 entre o T=0M

($48,71 \pm 19,99$) e o T=6M ($90,92 \pm 18,62$). Assim como a elevação sérica de C4 o T=0M de ($10,76 \pm 12,51$) para o T = 6M ($20,5 \pm 11,67$), mostrando que nossos resultados estão condizentes com o observado na literatura (KDIGO, 2012)

Na casuística, o SLEDAI apresentou diferença estatisticamente significativa entre o T=0M ($12,71 \pm 4,03$) e T=9M ($0,57 \pm 0,98$) ($p = 0,0191$), demonstrando um intervalo maior do que o esperado para a redução significativa do SLEDAI na nossa coorte, pois o SLEDAI tende a acompanhar a redução do processo inflamatório e do uso de imunossupressores; apesar disso, é possível notar no SLEDAI uma tendência de redução gradativa no índice quando observado o T=0M ($12,71 \pm 4,03$), o T=3M ($5,4 \pm 5,08$) e o T=6M ($1,25 \pm 1,49$), entretanto, não foi significativa para a coorte estudada. Os níveis de albumina sérica apresentaram um aumento significativo entre o T=0M ($2,73 \pm 0,75$) e T=9M ($3,75 \pm 0,38$) ($p = 0,0153$), com o aumento da preservação da proteína na corrente sanguínea como resposta ao tratamento (KDIGO, 2012). A proteinúria de 24 horas, a dose de MMF (mg/dia) e a creatinina sérica não apresentaram associação nas combinações de diferentes momentos. Isso pode estar relacionado pela variação de resposta clínica dos pacientes da coorte ao tratamento e também ao tamanho amostral que pode influenciar na estatística da análise. Outras associações de momentos distintos, com menor relevância clínica podem ser observadas na tabela 05.

Por fim, a hipertensão arterial sistêmica foi a comorbidade mais frequente, sendo encontrada em 57,15% do grupo estudado. Ela pode ser justificada como consequência da NL, tendo em vista, principalmente, as alterações do metabolismo renal que levam, por exemplo, a alterações e ao desequilíbrio

eletrolítico que acarretam no aumento da pressão arterial (hipertensão arterial secundária) (ACIOLI et al., 1982; FRANCO, 2002).

Em relação aos resultados obtidos na análise da expressão gênica de 3 (*DKK1*, *LRP5* e *BMP2*) dos 4 genes da via WNT β catenina avaliados, não foi possível observar diferenças estatisticamente significativas entre a análise de múltiplas comparações nos cinco diferentes momentos avaliados. Ou seja, nesse estudo não conseguimos observar alteração no perfil de expressão desses genes em resposta ao tratamento a que os pacientes com NL estavam sendo submetidos durante o período de 1 ano. Entretanto, a expressão do *WNT16* mostrou expressão diferencial estatisticamente significativa entre os períodos T=0M e T=3M (FC=1338,47 \pm 243,9 $p= 0,0078$).

Conforme a literatura, os resultados esperados para o gene *DKK1* são a diminuição de sua expressão após o tratamento na NL, isso porque mesmo o gene sendo antagonista da via WNT β catenina, ele é uma proteína inflamatória positiva, ou seja, em processos inflamatórios, ela teria seus níveis aumentado no organismo (LIANG et al., 2015; XUE et al., 2017). Já para o *LRP5*, ocorreria a redução dos níveis de expressão do gene após um período de tratamento na NL, diminuindo assim a interação das proteínas WNT com o *LRP5*. Entretanto, a literatura destaca que polimorfismos no gene *LRP5* podem codificar proteínas transmembranas menos responsivas a ligação das proteínas WNT, isto significa que o aumento/diminuição isolado da *LRP5* não é suficiente para predizer hipó/hiperatividade da via, sendo necessária análises de outras proteínas da via complementarmente e dos polimorfismos presentes no gene (CNOSSEN et al., 2016; ZHOU et al., 2016; HE et al., 2020). Todavia, no presente estudo não

observamos expressão diferencial desses genes durante o tratamento na NL no período de 12 meses.

A proteína BMP2 está associada com crescimento celular, desenvolvimento de matriz extracelular e processo de fibrinólise em doenças autoimunes, no qual ocorre a permanente hiperativação da via. Nesse sentido, a literatura indica que é esperada uma redução da expressão do gene conforme o decorrer do tratamento nos pacientes com NL (FLANAGAN et al., 2014; SHI et al., 2016; AKSENTIJEVICH e ZHOU, 2017; SHUNCK, 2021). Porém, da mesma forma que os genes DKK1 e LRP5, o estudo não conseguiu observar nenhuma associação com o segmento do tratamento da NL.

Já a proteína WNT16 tem sido relacionada a ter um efeito regulador da via WNT em situações de aumento de atividade, ou seja, em situações de doenças inflamatórias crônicas com tendência à lesão e crescimento tecidual exacerbado é esperada que ocorra um aumento de sua expressão gênica (NALESSO et al., 2017). Nesse aspecto, foi observado no estudo um aumento da expressão do *WNT16* no início do tratamento podendo indicar uma participação importante do gene na resposta inicial do tratamento, regulando outros genes da via e atuando na diminuição da lesão renal e do processo inflamatório na NL.

Além disso, não foi possível avaliar a expressão dos genes *SOST* e *WNT2* da via WNT β catenina no sangue periférico dos pacientes com NL, pois não foram obtidos valores mínimos detectáveis de expressão. Um estudo prévio que avaliou apenas a expressão do DKK1, já havia pontuado dificuldades de se estudar a via WNT, como a ausência de expressão no sangue periférico e presença de atividade exacerbada no tecido renal, além de que em modelos

murinos não foi possível estabelecer correlação entre a expressão renal com a observada no sangue periférico para os genes WNT (TVEITA & REKVIG, 2011).

Em suma, no nosso estudo prospectivo com pacientes portadores da NL acompanhados por um ano após o início da terapia, para os critérios clínicos avaliados, foi necessário um período de 6 meses do início de tratamento para notar uma associação estatística significativa de redução da dose de prednisona (mg/dia) ($p = 0.0237$) e aumento dos níveis de C3 ($p = 0.0119$) e nos níveis de C4 ($p = 0.0117$). O score do SLEDAI e a albumina sérica necessitaram de 9 meses após o início do tratamento para apresentar uma associação estatística significativa com o momento inicial, com a redução significativa do SLEDAI ($p = 0.0191$) e aumento da albumina sérica ($p = 0,0153$). Em relação à análise da expressão dos genes *DKK1*, *LRP5* e *BMP2*, não observamos diferenças significativas entre os tempos avaliados. O gene *WNT16* demonstrou um aumento significativo após 3 meses de tratamento em relação ao momento inicial indicando provável participação como regulador no processo de redução inflamatória.

Por fim, no decorrer da elaboração e concretização desse estudo, os pesquisadores envolvidos na proposta tiveram que lidar com alguns obstáculos e limitações que podem ter colaborado para os resultados obtidos. O primeiro deles foi a pandemia que interrompeu a seleção de novos indivíduos para a coorte e dificultou o segmento das coletas dos pacientes durante o período de mais de um ano. Somado a isso, outro desafio foi alcançar o número de indivíduos pré-estabelecido no projeto, pois alguns voluntários descontinuaram sua participação na pesquisa por diversos fatores, seja pelo medo no período da pandemia, pela dificuldade de recursos e acesso ao serviço de saúde no qual ocorre a pesquisa ou também por estar cansado e traumatizado de tantas terapias, procedimentos e

coleta de sangue periférico. O segmento adequado também foi outro desafio, por vezes, os usuários não compareciam no tempo ideal para a coleta necessária para o estudo, então alguns deles têm o período de coleta incompleto e foram excluídos de algumas análises.

7. Conclusões

- A dose de prednisona e os níveis de C3 e C4 séricos apresentaram significância estatística, quando comparados o tempo 0 e após 6 meses de tratamento.

- O score SLEDAI e a Albumina sérica demonstraram significância estatística quando comparados o início do tratamento e após 9 meses de segmento.

- Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre o padrão de expressão dos genes *DKKI*, *LRP5* e *BMP2* nos momentos avaliados.

- O Gene *WNT16* apresentou associação estatística quando comparado o momento de início do tratamento e 3 meses de continuidade, demonstrando que ele pode ter papel importante na resposta inicial ao tratamento, regulação das vias inflamatórias e diminuição da lesão renal na LN.

8. Referências Bibliográficas

- ACIOLI, M. D. et al. Nefrite lúpica: correlação entre hipertensão insuficiência arterial, renal e histologia renal. **J. bras. nefrol**, p. 53-6, 1982.
- AHMADZADEH, Ahmad et al. Wnt/ β -catenin signaling in bone marrow niche. **Cell and tissue research**, v. 363, p. 321-335, 2016.
- AHN, Victoria E. et al. Structural basis of Wnt signaling inhibition by Dickkopf binding to LRP5/6. **Developmental cell**, v. 21, n. 5, p. 862-873, 2011.
- AKSENTIJEVICH, Ivona; ZHOU, Qing. NF- κ B pathway in autoinflammatory diseases: dysregulation of protein modifications by ubiquitin defines a new category of autoinflammatory diseases. **Frontiers in immunology**, v. 8, p. 250305, 2017.
- ALFADHLI, Suad; ALFAILAKAWI, Asma'a; GHANEM, Aqeel AM. Th-17 related regulatory network in the pathogenesis of Arab patients with systemic lupus erythematosus and lupus nephritis. **International Journal of Rheumatic Diseases**, v. 19, n. 5, p. 512-520, 2016.
- ALMAANI, Salem; MEARA, Alexa; ROVIN, Brad H. Update on lupus nephritis. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 12, n. 5, p. 825-835, 2017.
- AMERICANS, African. Association of Trypanolytic ApoL1 Variants with Kidney Disease in African Americans.
- Antunes LJ and Matos KTF (1992) Lúpus eritematoso sistêmico e artrite reumatóide. **Imunologia Médica** 19: 129-144.
- ARINGER, Martin et al. 2019 European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology classification criteria for systemic lupus erythematosus. **Arthritis & rheumatology**, v. 71, n. 9, p. 1400-1412, 2019.
- ASSIS, Marcos Renato de; BAAKLINI, César Emile. Lúpus eritematoso sistêmico. **RBM rev. bras. med**, p. 274-285, 2009.
- ATTISANO, Liliana; WRANA, Jeffrey L. Smads as transcriptional co-modulators. **Current opinion in cell biology**, v. 12, n. 2, p. 235-243, 2000.
- BARR, R. Graham et al. Prognosis in proliferative lupus nephritis: the role of socio-economic status and race/ethnicity. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 18, n. 10, p. 2039-2046, 2003.
- BEZBRADICA, Jelena S.; MEDZHITOV, Ruslan. Role of ITAM signaling module in signal integration. **Current opinion in immunology**, v. 24, n. 1, p. 58-66, 2012.
- BLASINI, Ana M. et al. Protein tyrosine kinase activity in T lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. **Journal of autoimmunity**, v. 11, n. 5, p. 387-393, 1998.
- Borba NEF, Bonfá E (2006) Lúpus Eritematoso Sistêmico. **Tratado de Clínica Médica**. 1: 1595-604.
- BORBA, Eduardo Ferreira et al. Consenso de lúpus eritematoso sistêmico. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 48, p. 196-207, 2008.

- BRENOL, J. C. T. et al. Lúpus Eritematoso Sistêmico: Acometiment Acometimento Cutâneo/Articular. **Rev Assoc Med Bras**, v. 52, n. 6, p. 375-88, 2006.
- BRODIE, Erica J. et al. Lyn, lupus, and (B) lymphocytes, a lesson on the critical balance of kinase signaling in immunity. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 338624, 2018.
- BRODSKY, F. M.; DPHIL. Apresentação de antígenos e complexo principal de histocompatibilidade, In: PARSLOW, T. G. et al. **Imunologia médica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. cap. 6, p. 70-80.
- BURN, Garth L. et al. Why is PTPN22 a good candidate susceptibility gene for autoimmune disease?. **FEBS letters**, v. 585, n. 23, p. 3689-3698, 2011.
- CAMPBELL, Andrew W. et al. Autoimmunity and the gut. **Autoimmune diseases**, v. 2014, 2014.
- CASTREJÓN, I. et al. Indices to assess patients with systemic lupus erythematosus in clinical trials, long-term observational studies, and clinical care. **Clin Exp Rheumatol**, v. 32, n. 5 Suppl 85, p. 85-95, 2014.
- CEJKA, Daniel et al. Sclerostin and Dickkopf-1 in renal osteodystrophy. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 6, n. 4, p. 877-882, 2011.
- CHEN, D. I.; ZHAO, Ming; MUNDY, Gregory R. Bone morphogenetic proteins. **Growth factors**, v. 22, n. 4, p. 233-241, 2004.
- CHICANA, Betsabel et al. Wnt antagonists in hematopoietic and immune cell fate: implications for osteoporosis therapies. **Current osteoporosis reports**, v. 17, p. 49-58, 2019.
- CNOSSEN, Wybrich R. et al. LRP5 variants may contribute to ADPKD. **European Journal of Human Genetics**, v. 24, n. 2, p. 237-242, 2016.
- CONTRERAS, G. et al. Outcomes in African Americans and Hispanics with lupus nephritis. **Kidney international**, v. 69, n. 10, p. 1846-1851, 2006.
- DAI, Chunsun et al. Wnt/ β -catenin signaling promotes podocyte dysfunction and albuminuria. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 20, n. 9, p. 1997-2008, 2009.
- DAVIDSON, Anne et al. Molecular studies of lupus nephritis kidneys. **Immunologic research**, v. 63, p. 187-196, 2015.
- DAVIDSON, Anne. What is damaging the kidney in lupus nephritis?. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 12, n. 3, p. 143-153, 2016.
- DING, Yi et al. Beta-catenin stabilization extends regulatory T cell survival and induces anergy in nonregulatory T cells. **Nature medicine**, v. 14, n. 2, p. 162-169, 2008.
- DIROCCO, Derek P. et al. Wnt4/ β -catenin signaling in medullary kidney myofibroblasts. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 24, n. 9, p. 1399-1412, 2013.
- DUCY, Patricia; SCHINKE, Thorsten; KARSENTY, Gerard. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. **Science**, v. 289, n. 5484, p. 1501-1504, 2000.

- ESCOBAR-GÓMEZ, F.; JÓDAR, E.; HAWKINS, F. Receptor Wnt: fisiología, fisiopatología y potenciales nuevas dianas terapéuticas. **Revista Española de Enfermedades Metabólicas Óseas**, v. 18, n. 2, p. 39-44, 2009.
- EVENEPOEL, Pieter; D'HAESE, Patrick; BRANDENBURG, Vincent. Sclerostin and DKK1: new players in renal bone and vascular disease. **Kidney international**, v. 88, n. 2, p. 235-240, 2015.
- FANOURIKIS, Antonis et al. 2019 update of the EULAR recommendations for the management of systemic lupus erythematosus. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 78, n. 6, p. 736-745, 2019.
- FLANAGAN, Sarah E. et al. Activating germline mutations in STAT3 cause early-onset multi-organ autoimmune disease. **Nature genetics**, v. 46, n. 8, p. 812-814, 2014.
- FLORES-BORJA, Fabian et al. Decreased Lyn expression and translocation to lipid raft signaling domains in B lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. **Arthritis & Rheumatism**, v. 52, n. 12, p. 3955-3965, 2005.
- FRANCO, Roberto JS. Crise hipertensiva: definição, epidemiologia e abordagem diagnóstica. **Rev Bras Hipertens**, v. 9, n. 4, p. 340-5, 2002.
- GAULD, Stephen B.; CAMBIER, John C. Src-family kinases in B-cell development and signaling. **Oncogene**, v. 23, n. 48, p. 8001-8006, 2004.
- GILES, Brendan M.; BOACKLE, Susan A. Linking complement and anti-dsDNA antibodies in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. **Immunologic research**, v. 55, p. 10-21, 2013.
- GLADMAN, D. D. et al. Crosscultural validation and reliability of 3 disease activity indices in systemic lupus erythematosus. **The Journal of Rheumatology**, v. 19, n. 4, p. 608-611, 1992.
- GRAHAM, Tisheeka R. et al. PI3K/Akt-dependent transcriptional regulation and activation of BMP-2-Smad signaling by NF- κ B in metastatic prostate cancer cells. **The Prostate**, v. 69, n. 2, p. 168-180, 2009.
- HAHN, Bebra Hannahs. Lúpus eritematoso sistêmico. In: **Harrison, reumatología**. McGraw-Hill Interamericana de España, 2007. p. 69-83.
- HAO, Sha et al. Targeted inhibition of β -catenin/CBP signaling ameliorates renal interstitial fibrosis. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 22, n. 9, p. 1642-1653, 2011.
- HARLEY, Isaac TW et al. Genetic susceptibility to SLE: new insights from fine mapping and genome-wide association studies. **Nature Reviews Genetics**, v. 10, n. 5, p. 285-290, 2009.
- HAUBRICHT, L.; TSCHURTSCHENTHALER, N. N. Lúpus Eritematoso Sistêmico: seu aspecto laboratorial na determinação clínica. **Laes & Haes**. São Paulo, Mc Will Editores Incorporados, v.30, n.179, p. 144-158, Jul. 2009.
- HAUCK, Stefanie M. et al. Label-free LC-MSMS analysis of vitreous from autoimmune uveitis reveals a significant decrease in secreted Wnt signalling inhibitors DKK3 and SFRP2. **Journal of proteomics**, v. 75, n. 14, p. 4545-4554, 2012.

- HE, Weichun et al. Blockade of Wnt/ β -catenin signaling by paricalcitol ameliorates proteinuria and kidney injury. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 22, n. 1, p. 90-103, 2011.
- HE, WEICHUN et al. Wnt/ β -Catenin Signaling Promotes Renal Interstitial Fibrosis. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 20, n. 4, p. 765-776, 2009.
- HE, Xuemin et al. A novel role of LRP5 in tubulointerstitial fibrosis through activating TGF- β /Smad signaling. **Signal transduction and targeted therapy**, v. 5, n. 1, p. 45, 2020.
- 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.
- HOOVER, Paul J.; COSTENBADER, Karen H. Insights into the epidemiology and management of lupus nephritis from the US rheumatologist's perspective. **Kidney international**, v. 90, n. 3, p. 487-492, 2016.
- HSIEH, Song-Chou; TSAI, Chang-Youh; YU, Chia-Li. Potential serum and urine biomarkers in patients with lupus nephritis and the unsolved problems. **Open Access Rheumatology: Research and Reviews**, p. 81-91, 2016.
- HWANG, Inah; SEO, Eun-young; HA, Hunjoo. Wnt/ β -catenin signaling: a novel target for therapeutic intervention of fibrotic kidney disease. **Archives of pharmacal research**, v. 32, p. 1653-1662, 2009.
- JEONG, Dong Yeon et al. Genetic variation and systemic lupus erythematosus: a field synopsis and systematic meta-analysis. **Autoimmunity Reviews**, v. 17, n. 6, p. 553-566, 2018.
- JJ, WEENING. International society of nephrology working group on the classification of lupus nephritis; renal pathology society working group on the classification of lupus nephritis. The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited. **Kidney Int.**, v. 65, p. 521-530, 2004.
- JOINER, Danese M. et al. LRP5 and LRP6 in development and disease. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 24, n. 1, p. 31-39, 2013.
- JUNG, Youn-Sang et al. Wnt2 complements Wnt/ β -catenin signaling in colorectal cancer. **Oncotarget**, v. 6, n. 35, p. 37257, 2015.
- KANBAY, Mehmet et al. Serum sclerostin and adverse outcomes in nondialyzed chronic kidney disease patients. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 99, n. 10, p. E1854-E1861, 2014.
- KARAGIANNI, Panagiota; TZIOUFAS, Athanasios G. Epigenetic perspectives on systemic autoimmune disease. **Journal of Autoimmunity**, v. 104, p. 102315, 2019.
- KDIGO GROUP et al. KDIGO clinical practice guideline for acute kidney injury. **Kidney Int. Suppl.**, v. 2, p. 1, 2012.
- KIM, Andrew; CHONG, Benjamin F. Photosensitivity in cutaneous lupus erythematosus. **Photodermatology, photoimmunology & photomedicine**, v. 29, n. 1, p. 4-11, 2013.

- KIM, Jinuk et al. Sclerostin inhibits Wnt signaling through tandem interaction with two LRP6 ectodomains. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 5357, 2020.
- KLUMB, Evandro Mendes et al. Consenso da Sociedade Brasileira de Reumatologia para o diagnóstico, manejo e tratamento da nefrite lúpica. **Revista brasileira de reumatologia**, v. 55, p. 1-21, 2015.
- KOSMINSKY, Samuel; MENEZES, Renata Carneiro de; COÊLHO, Maria Rosângela Cunha Duarte. Infecção pelo vírus Epstein-Barr em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 52, p. 352-355, 2006.
- KRAMER, Ina et al. Osteocyte Wnt/ β -catenin signaling is required for normal bone homeostasis. **Molecular and cellular biology**, 2010.
- KYTTARIS, Vasileios C. Systemic lupus erythematosus: from genes to organ damage. **Systems Biology in Drug Discovery and Development: Methods and Protocols**, p. 265-283, 2010.
- LIANG, Libo et al. Preliminary mechanism on the methylation modification of Dkk-1 and Dkk-3 in hepatocellular carcinoma. **Tumor Biology**, v. 36, p. 1245-1250, 2015.
- LIMA, Suelen Cristina de. Influência dos genes da imunidade inata e adaptativa PTPN22, IFIH1 e VDR e dos genes de reparo de DNA RAD52, LIG4 e STK17A na patogênese do Lúpus Eritematoso Sistêmico. 2018.
- LINTERN, Katherine B. et al. Characterization of wise protein and its molecular mechanism to interact with both Wnt and BMP signals. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 34, p. 23159-23168, 2009.
- LIOSSIS, Stamatis-Nick C. et al. B-cell kinase lyn deficiency in patients with systemic lupus erythematosus. **Journal of Investigative Medicine**, v. 49, n. 2, p. 157-165, 2001.
- LU, Rufeï et al. Genetic associations of LYN with systemic lupus erythematosus. **Genes & Immunity**, v. 10, n. 5, p. 397-403, 2009.
- MA, Jian et al. β -catenin/TCF-1 pathway in T cell development and differentiation. **Journal of neuroimmune pharmacology**, v. 7, p. 750-762, 2012.
- Magalhães júnior HM. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas do Lúpus Eritematoso Sistêmico. PORTARIA Nº 100, DE 7 DE FEVEREIRO DE 2013.
- MAGALHÃES, Marcela B.; DONADI, Eduardo A.; JUNIOR, Paulo Louzada. Manifestações clínicas do lúpus eritematoso sistêmico: abordagem diagnóstica e terapêutica na sala de urgência. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v. 36, n. 2/4, p. 409-417, 2003.
- MALINAUSKAS, Tomas; JONES, E. Yvonne. Extracellular modulators of Wnt signalling. **Current opinion in structural biology**, v. 29, p. 77-84, 2014.
- MKADDEM, Sanae Ben et al. Lyn and Fyn function as molecular switches that control immunoreceptors to direct homeostasis or inflammation. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 246, 2017.
- MOHAN, Chandra; PUTTERMAN, Chaim. Genetics and pathogenesis of systemic lupus erythematosus and lupus nephritis. **Nature Reviews Nephrology**, v. 11, n. 6, p. 329-341, 2015.

- MOK, C. C.; LAU, C. S. Pathogenesis of systemic lupus erythematosus. **Journal of clinical pathology**, v. 56, n. 7, p. 481-490, 2003.
- MOK, Chi Chiu et al. Urinary angiostatin, CXCL4 and VCAM-1 as biomarkers of lupus nephritis. **Arthritis research & therapy**, v. 20, p. 1-10, 2018.
- MORONI, Gabriella et al. Clinical and prognostic value of serial renal biopsies in lupus nephritis. **American journal of kidney diseases**, v. 34, n. 3, p. 530-539, 1999.
- MURALIDHARAN, Sujatha et al. Activation of Wnt signaling arrests effector differentiation in human peripheral and cord blood-derived T lymphocytes. **The Journal of Immunology**, v. 187, n. 10, p. 5221-5232, 2011.
- NAKASHIMA, Carlos Alberto Kenji et al. Incidência e aspectos clínico-laboratoriais do Lúpus eritematoso sistêmico em cidade do Sul do Brasil. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 51, p. 235-239, 2011.
- NALESSO, Giovanna et al. WNT16 antagonises excessive canonical WNT activation and protects cartilage in osteoarthritis. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 76, n. 1, p. 218-226, 2017.
- NEAL, Jessica A.; MEEK, Katheryn. Choosing the right path: does DNA-PK help make the decision?. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 711, n. 1-2, p. 73-86, 2011.
- NELSON, Peter J.; VON TOERNE, Christine; GRÖNE, Hermann-Josef. Wnt-signaling pathways in progressive renal fibrosis. **Expert opinion on therapeutic targets**, v. 15, n. 9, p. 1073-1083, 2011.
- NOVO, Marilia Campos Tavares et al. Blockage of Wnt/ β -catenin signaling by quercetin reduces survival and proliferation of B-1 cells in vitro. **Immunobiology**, v. 220, n. 1, p. 60-67, 2015.
- NOWLING, Tamara K.; GILKESON, Gary S. Mechanisms of tissue injury in lupus nephritis. **Arthritis research & therapy**, v. 13, p. 1-9, 2011.
- OLIVEIRA, Ciane Martins de , et al. **Lúpus eritematoso sistêmico: Uma falha do Sistema Imune**. Revista Científica Multidisciplinar Núcleo do Conhecimento. Ano 1, Ed. 08, Vol. 06, pp. 52-67. Agosto de 2016.
- PALACIOS, Emil H.; WEISS, Arthur. Function of the Src-family kinases, Lck and Fyn, in T-cell development and activation. **Oncogene**, v. 23, n. 48, p. 7990-8000, 2004.
- PELLETIER, Solenne et al. The relation between renal function and serum sclerostin in adult patients with CKD. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 8, n. 5, p. 819-823, 2013.
- PINHEIRO, Sergio Veloso Brant et al. Pediatric lupus nephritis. **Brazilian Journal of Nephrology**, v. 41, p. 252-265, 2018.
- PINTO, Ana Marco et sl. JB LUPUS DISCOIDE. **ATLAS DA SAÚDE**. Disponível em:<https://www.atlasdasaude.pt/publico/content/lupus-discoide>. 2019.
- PONS-ESTEL, Guillermo J. et al. Mestizos with systemic lupus erythematosus develop renal disease early while antimalarials retard its appearance: data from a Latin American cohort. **Lupus**, v. 22, n. 9, p. 899-907, 2013.

- QI, S. et al. Clinical application of protein biomarkers in lupus erythematosus and lupus nephritis. **Lupus**, v. 27, n. 10, p. 1582-1590, 2018.
- REES, Frances et al. The worldwide incidence and prevalence of systemic lupus erythematosus: a systematic review of epidemiological studies. **Rheumatology**, v. 56, n. 11, p. 1945-1961, 2017.
- REN, Qian; CHEN, Jiongcheng; LIU, Youhua. LRP5 and LRP6 in Wnt signaling: similarity and divergence. **Frontiers in cell and developmental biology**, v. 9, p. 670960, 2021.
- RIBEIRO, Alves, M. Propedêutica das Glomerulopatias in Glomerulopatias: patogenia, clínica e tratamento. 12. ed. [s.l.] Barros RT. 2012.
- ROVIN, Brad H.; PARIKH, Samir V.; ALVARADO, Anthony. The kidney biopsy in lupus nephritis: is it still relevant?. **Rheumatic Disease Clinics**, v. 40, n. 3, p. 537-552, 2014.
- SACK, K. E.; FYE, K. H. Doenças reumáticas. In: STITES, D. P.; TERR, A. I.; PARSLOW, T. G. **Imunologia Médica**, 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. cap. 31, p. 349-353,
- SAEED, Mohammad. Lupus pathobiology based on genomics. **Immunogenetics**, v. 69, n. 1, p. 1-12, 2017.
- SANTOS, Fabiana de Miranda Moura dos et al. Avaliação do estado nutricional e da atividade física em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, p. 631-638, 2010.
- SANTOS-ARAÚJO, Carla; PESTANA, Manuel. Tratamento da nefrite lúpica. **Acta Médica Portuguesa**, v. 21, n. 3, p. 259-272, 2008.
- SATO, Ei. **Lúpus eritematoso sistêmico**. cap. 29. 2009. Disponível em: <http://www.fmrp.usp.br/cg/novo/images/pdf/conteudo_disciplinas/lupuseritematoso.pdf>. Acesso em: 27 de outubro de 2019.
- SCHUNK, Stefan J. et al. WNT- β -catenin signalling—a versatile player in kidney injury and repair. **Nature Reviews Nephrology**, v. 17, n. 3, p. 172-184, 2021.
- SELIGMAN, Victoria A. et al. Demographic differences in the development of lupus nephritis: a retrospective analysis. **The American journal of medicine**, v. 112, n. 9, p. 726-729, 2002.
- SEO, Hye-Young et al. Fyn deficiency attenuates renal fibrosis by inhibition of phospho-STAT3. **Kidney international**, v. 90, n. 6, p. 1285-1297, 2016.
- SESSO, Ricardo de Castro Cintra et al. Diálise crônica no Brasil-relatório do censo brasileiro de diálise, 2011. **Brazilian Journal of Nephrology**, v. 34, p. 272-277, 2012.
- SHI, Juan et al. Emerging role and therapeutic implication of Wnt signaling pathways in autoimmune diseases. **Journal of immunology research**, v. 2016, 2016.
- SIEMENS, Tobias August et al. APOL1 risk variants and kidney disease: what we know so far. **Brazilian Journal of Nephrology**, v. 40, p. 388-402, 2018.
- SOARES, Maria Fernanda; TELLES, José Ederaldo Queiroz; MOURA, Luiz Antonio. Classificações da nefrite lúpica: metanálise e proposta atual da

- Sociedade Internacional de Nefrologia e da Sociedade de Patologia Renal. **J Bras Nefrol**, v. 27, p. 157-162, 2005.
- STAAL, Frank JT; LUIS, Tiago C.; TIEMESSEN, Machteld M. Erratum: WNT signalling in the immune system: WNT is spreading its wings. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 5, p. 329-329, 2015.
- STANFORD, Stephanie M.; BOTTINI, Nunzio. PTPN22: the archetypal non-HLA autoimmunity gene. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 10, n. 10, p. 602-611, 2014.
- SURENDRAN, Kameswaran; MCCAUL, Sean P.; SIMON, Theodore C. A role for Wnt-4 in renal fibrosis. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 282, n. 3, p. F431-F441, 2002.
- TAMAI, Keiko et al. A mechanism for Wnt coreceptor activation. **Molecular cell**, v. 13, n. 1, p. 149-156, 2004.
- TAN, Eng M. et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. **Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology**, v. 25, n. 11, p. 1271-1277, 1982.
- TOKUDA, Yuichi et al. The defect of SFRP2 modulates an influx of extracellular calcium in B lymphocytes. **BMC Research Notes**, v. 7, p. 1-8, 2014.
- TSAI, Albert G.; LIEBER, Michael R. Mechanisms of chromosomal rearrangement in the human genome. **BMC genomics**, v. 11, n. Suppl 1, p. S1, 2010.
- TSOKOS, George (Ed.). **Systemic lupus erythematosus: basic, applied and clinical aspects**. Academic Press, 2020.
- TVEITA, Anders Aune; REKVIG, Ole Petter. Alterations in Wnt pathway activity in mouse serum and kidneys during lupus development. **Arthritis & Rheumatism**, v. 63, n. 2, p. 513-522, 2011.
- TVEITA, Anders; REKVIG, Ole Petter; ZYKOVA, Svetlana N. Glomerular matrix metalloproteinases and their regulators in the pathogenesis of lupus nephritis. **Arthritis research & therapy**, v. 10, p. 1-8, 2008.
- UNTERLEUTHNER, Daniela et al. Cancer-associated fibroblast-derived WNT2 increases tumor angiogenesis in colon cancer. **Angiogenesis**, v. 23, p. 159-177, 2020.
- URAMOTO, Kristine M. et al. Trends in the incidence and mortality of systemic lupus erythematosus, 1950-1992. **Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology**, v. 42, n. 1, p. 46-50, 1999.
- USRDS 2012 ANNUAL DATA REPORT.U.S. Renal Data System, **USRDS 2012 Annual Data Report: Atlas of End-Stage Renal Disease in the United States**, National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. Disponível em: <<http://www.usrds.org/qtr/default.aspx>>.
- VAJGEL, Gisele et al. Effect of a single apolipoprotein L1 gene nephropathy variant on the risk of advanced lupus nephritis in Brazilians. **The Journal of rheumatology**, v. 47, n. 8, p. 1209-1217, 2020.
- VAN LOOSDREGT, Jorg et al. Canonical Wnt signaling negatively modulates regulatory T cell function. **Immunity**, v. 39, n. 2, p. 298-310, 2013.

- VAZ, Adelaide José; TAKEI, Kioko; BUENO, Ednéia Casagrande. Imunoensaios: fundamentos e aplicações. In: **Imunoensaios: fundamentos e aplicações**. 2014. p. 372-372.
- VELOSO, Valéria Soares Pigozzi. Envolvimento renal em pacientes com lúpus eritomatoso sistêmico. 2006.
- 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.
- WANG, Xiao-dong et al. Aberrant activation of the WNT/ β -catenin signaling pathway in lupus nephritis. **PLoS One**, v. 9, n. 1, p. e84852, 2014.
- WEIDENBUSCH, Marc; KULKARNI, Onkar P.; ANDERS, Hans-Joachim. The innate immune system in human systemic lupus erythematosus. **Clinical Science**, v. 131, n. 8, p. 625-634, 2017.
- WUSTER, Arthur; BEHRENS, Timothy W. Thinking differently about lupus. **Elife**, v. 5, p. e15352, 2016.
- XIAO, Yu-Feng et al. Notch and Wnt signaling pathway in cancer: Crucial role and potential therapeutic targets. **International journal of oncology**, v. 48, n. 2, p. 437-449, 2016.
- XUE, Jing et al. Dickkopf-1 is a biomarker for systemic lupus erythematosus and active lupus nephritis. **Journal of immunology research**, v. 2017, 2017.
- ZHOU, Dong et al. Tubule-specific ablation of endogenous β -catenin aggravates acute kidney injury in mice. **Kidney international**, v. 82, n. 5, p. 537-547, 2012.
- ZHOU, Dong et al. Wnt/ β -catenin signaling in kidney injury and repair: a double-edged sword. **Laboratory investigation**, v. 96, n. 2, p. 156-167, 2016.

9. Anexos

Anexo I – Comitê de Ética em Pesquisa

UFPE - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DE PERNAMBUCO -



COMPROVANTE DE ENVIO DO PROJETO

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Perfil da expressão de tirosina quinases como preditor
de resposta ao tratamentona nefrite lúpica

Pesquisador: Gisele Vajgel Fernandes

Versão: 1

CAAE: 11401219.2.0000.8807

Instituição Proponente: EMPRESA BRASILEIRA DE SERVICOS
HOSPITALARES - EBSEH

DADOS DO COMPROVANTE

Número do Comprovante: 036573/2019

Patrocinador Principal: University College London

Informamos que o projeto Perfil da expressão de tirosina quinases como preditor de resposta ao tratamento na nefrite lúpica que tem como pesquisador responsável Gisele Vajgel Fernandes, foi recebido para análise ética no CEP UFPE - Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco - HC/UFPE em 09/04/2019 às 10:01.