



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
CURSO DE BIOMEDICINA

MARIANA SILVA LUCENA

**Análise da expressão do gene *MYD88* em pacientes com Lúpus
eritematoso sistêmico juvenil**

Recife
2024

MARIANA SILVA LUCENA

**Análise da expressão do gene *MYD88* em pacientes com Lúpus
eritematoso sistêmico juvenil**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Curso de Graduação em Biomedicina da
Universidade Federal de Pernambuco, como
pré-requisito à obtenção do título de Bacharel
em Biomedicina.

Orientadora: Denise de Queiroga Nascimento

Coorientador: Paula Sandrin Garcia

Recife

2024

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Lucena, Mariana Silva.

Análise da expressão do gene MYD88 em pacientes com Lúpus
eritematoso sistêmico juvenil / Mariana Silva Lucena. - Recife, 2024.
58 : il., tab.

Orientador(a): Denise de Queiroga Nascimento

Coorientador(a): Paula Sandrin Garcia

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de
Pernambuco, Centro de Biociências, Biomedicina, 2024.

Inclui referências, anexos.

1. Biologia Molecular . 2. Doenças Autoimunes. 3. Lúpus eritematoso
sistêmico juvenil. I. Nascimento, Denise de Queiroga. (Orientação). II. Garcia,
Paula Sandrin. (Coorientação). IV. Título.

570 CDD (22.ed.)

MARIANA SILVA LUCENA

**Análise da expressão do gene *MYD88* em pacientes com Lúpus
eritematoso sistêmico juvenil**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação
em Biomedicina da Universidade
Federal de Pernambuco, como
pré-requisito à obtenção do título de
Bacharel em Biomedicina.

Aprovada em: 19/03/2024

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof. Dra Denise de Queiroga Nascimento
Instituto Federal da Paraíba - IFPB

Dr. Wlisses Henrique Veloso de Carvalho Silva
IAM/FIOCRUZ-PE

Dr. Ronaldo Celerino da Silva
IAM/FIOCRUZ-PE

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer à minha orientadora Denise de Queiroga Nascimento por todo o ensinamento dentro e fora do laboratório. Agradeço também a professora Paula Sandrin Garcia, coorientadora deste projeto, por todo o apoio e orientação. E aos demais integrantes e colegas do grupo de pesquisa PATGEN - iLIKA UFPE.

Além disso, quero agradecer a minha família, que sempre prezou por minha educação e inspiraram minha dedicação aos estudos. E ao meu namorado Emanuel, amigas e amigos, que sempre me incentivaram e compartilharam de momentos bons e ruins. Admiro todos e sem vocês não seria o mesmo, obrigada!

RESUMO

Lúpus eritematosos sistêmico juvenil (LESj) é uma doença autoimune heterogênea e inflamatória caracterizada por manifestações multissistêmicas, que geralmente se iniciam com maior frequência entre os 12 e 16 anos de idade. Sua patogênese está associada a fatores genéticos e ambientais, resultando na desregulação do sistema imunológico e, consequentemente, numa resposta inflamatória exacerbada. O fator de diferenciação mieloide 88, MyD88, é uma proteína adaptadora. A atividade do MyD88 está associada à transdução de sinais intracelulares que, por sua vez, desencadeiam na ativação de fatores de transcrição que estimulam a produção de citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ , TNF- α e IL-6. Sua expressão desregulada pode contribuir para um perfil inflamatório abrupto nas doenças autoimunes, tal como o LESj. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o padrão de expressão do gene *MYD88* em pacientes diagnosticados com LESj comparado a controles saudáveis, para investigar sua potencial contribuição na patogênese desta doença. Foram coletadas amostras de sangue de 10 pacientes femininas atendidas no ambulatório de reumatologia do Hospital das Clínicas/ UFPE, e 10 controles saudáveis com respectivas idades e sexo correspondente as pacientes. O grupo de pacientes foi classificado em um grupo com atividade moderada da doença e um único grupo com inatividade e atividade leve. Após a coleta, foi realizado o isolamento de PBMC e o cultivo dessas células em três condições: sem estímulo, estímulo com lipossacarídeo (LPS) e com LPS+Adenosina trifosfato (ATP). Em seguida, foi feita a síntese de cDNA e o ensaio de expressão gênica por PCR em tempo real utilizando sondas Taqman, sendo o gene alvo *MYD88* e os genes de referência: *ACTB* e *GAPDH*. Por fim, as análises estatísticas foram realizadas pelo programa GraphPad Prism versão 8.0. Apesar de não ser estatisticamente significativa, o grupo de pacientes total LESj apresentou expressão de *MYD88* 2 vezes maior do que os controles saudáveis nas células sem estímulo (Fold Change (FC) = 2.14; p=0.1347). Nas células com estímulo de LPS e LPS+ATP, não houve diferença de expressão entre os dois grupos (FC=1,2; p=0,8184 e FC=1,1; p=0,8955, respectivamente), mas sem significância estatística. Nas células sem estímulo, o grupo de pacientes com inatividade-atividade leve de LESj demonstrou expressão 2 vezes maior do que o grupo de controle saudável (FC=2,33; p=0,0766), sem significância estatística. Nas células com estímulo de LPS e LPS+ATP, não houve diferença de expressão entre os pacientes com inatividade-atividade leve e os controles saudáveis (FC=1.36; p=0.2999 e FC=1.15; p=0.4650, respectivamente) mas sem significância estatística. A partir do estudo, embora tenha-se observado maior expressão do *MYD88* entre pacientes LESj totais e com inatividade-atividade leve comparados a controles saudáveis nas células sem estímulo, esses dados não foram estatisticamente significativos. Portanto, a fim de melhor investigar a potencial contribuição do *MYD88* na patogênese do LESj, são necessários estudos mais amplos, reunindo mais dados clínicos e com análise pareada, possibilitando resultados mais robustos e de maior validade externa.

Palavras-chave: Autoimunidade. Lúpus Juvenil. Mydssoma. Inflamação. Cultura de célula.

ABSTRACT

Juvenile Systemic Lupus Erythematosus (jSLE) is a heterogeneous and inflammatory autoimmune disease characterized by multisystemic manifestations that typically begin most frequently between the ages of 12 and 16. Its pathogenesis is associated with genetic and environmental factors, resulting in dysregulation of the immune system and consequently in exacerbated inflammatory response. Myeloid differentiation factor 88, MyD88, is an adaptor protein. MyD88 activity is associated with the transduction of intracellular signals, which in turn trigger the activation of transcription factors that stimulate the production of pro-inflammatory cytokines such as IFN-I, TNF- α , and IL-6. Its dysregulated expression may contribute to an abrupt inflammatory profile in autoimmune diseases, such as jSLE. Thus, the aim of this study is to evaluate the expression pattern of the *MYD88* gene in patients diagnosed with jSLE compared to healthy controls, to investigate its potential contribution to the pathogenesis of this disease. Blood samples were collected from 10 female patients attending the rheumatology outpatient clinic at Hospital das Clínicas/UFPE, and 10 healthy controls matched for age and gender. The patient group was classified into one group with moderate disease activity and one group with inactivity and mild activity. PBMC isolation and cell culture were performed under three conditions: without stimulation, stimulation with stimulation with lipopolysaccharide (LPS), and with LPS+Adenosine triphosphate (ATP). Subsequently, cDNA synthesis and gene expression assay using Taqman probes were performed, *MYD88* as target gene and *ACTB* and *GAPDH* as reference genes. Statistical analyses were carried out using GraphPad Prism version 8.0. Although not statistically significant, the total jSLE patient group showed *MYD88* expression 2 times higher than healthy controls in unstimulated cells (Fold Change (FC) = 2.14; $p=0.1347$). In cells stimulated with LPS and LPS+ATP, there was no difference in expression between the two groups (FC=1.2; $p=0.8184$ and FC=1.1; $p=0.8955$, respectively), without statistical significance. In unstimulated cells, the group of patients with inactivity-mild activity of jSLE demonstrated expression 2 times higher than the healthy control group (FC=2.33; $p=0.0766$), without statistical significance. In cells stimulated with LPS and LPS+ATP, there was no difference in expression between patients with inactivity-mild activity and healthy controls (FC=1.36; $p=0.2999$ and FC=1.15; $p=0.4650$, respectively), without statistical significance. Although higher *MYD88* expression was observed among total jSLE patients and those with inactivity-mild activity compared to healthy controls in unstimulated cells, these data were not statistically significant. Therefore, in order to better investigate the potential contribution of *MYD88* to jSLE pathogenesis, further studies are needed, gathering more clinical data and paired analysis.

Keywords: Autoimmunity. Juvenile lupus. Myddosome. Inflammation. Cell culture.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Manifestações clínicas do LES	16
Figura 2 – Rash Malar em paciente LESj	17
Figura 3 – Úlcera oral em paciente LESj	18
Quadro 1 – Critérios ACR 1987/1999 para Lúpus Eritematoso Sistêmico	21
Quadro 2 – Critérios SLICC aplicados para diagnóstico do LES	22
Quadro 3 – Critério do SLEDAI para LES	24
Figura 4 – Genes envolvidos na patogênese do LES	28
Figura 5 – Patogênese do LES	29
Figura 6 – Via de sinalização do Mydssoma	32
Figura 7 – Domínios do MyD88	33
Figura 8 – Complexo ternário do MyD88, IRAK2, IRAK4	33
Figura 9 – Gene MYD88	34
Figura 10 – Metodologia aplicada na coleta, processamento e análise de dados	39
Figura 11 – Expressão gênica relativa (Fold Change) do gene MYD88 do grupo de pacientes totais e controles saudáveis	42
Figura 12 – Expressão gênica relativa (Fold Change) do gene MYD88 do grupo de pacientes inativos-atividade leve e controles saudáveis	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características clínicas do LES de início na infância e de início na idade adulta	19
Tabela 2 – Características clínico-demográficas do grupo de estudo	40
Tabela 3 – Caracterização individual dos pacientes	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACR	Colégio Americano de Reumatologia
ACTB	Actina Beta
ANA	Anticorpo antinuclear
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Anti-dsDNA	Anticorpo anti-DNA de fita dupla
Anti-ENA	Anticorpo anti-antígeno nuclear extraível
Anti-Sm	Anticorpo anti-smith
ATP	Adenosina trifosfato
BLyS	Estimuladores de Linfócito B
cDNA	DNA complementar
DAMPs	Padrões moleculares associados a dano
DD	Domínio de morte N-terminal
EULAR	Liga Europeia Contra o Reumatismo
FC	Fold Change
FN	Fator de normalização
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GWAS	Estudos de associação genômica ampla
ICAM-1	Molécula de adesão celular intercelular-1
ID	Domínio intermediário curto
IFN	Interferon
IL	Interleucina
ILR	Receptor de interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
IRAKs	Quinases associadas ao receptor de interleucina-1
LES	Lúpus eritematoso sistêmico
LESj	Lúpus eritematosos sistêmico juvenil
LPS	Lipossacarídeo
MyD88	Fator de diferenciação mielóide 88
NF- κ B	Fator nuclear kappa beta
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PANLAR	Liga Pan-Americana de Associações de Reumatologia
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico

PRRs	Receptores de Reconhecimento de Padrões
QR	Quantidade relativa
QRN	Quantidade relativa normalizada
RNA	Ácido ribonucleico
SLEDAI	Sistema de Escore de Atividade da Doença do Lúpus Eritematoso Sistêmico
SLICC	<i>Systemic Lupus International Collaborating Clinics</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
TIR	Domínio C-terminal
TLRs	Receptores Toll-like
TNF	Fator de necrose tumoral

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1 Lúpus eritematosos sistêmico juvenil.....	14
2.1.1 Epidemiologia.....	14
2.1.2 Manifestações clínicas.....	16
2.1.3 Diagnóstico e classificação.....	20
2.1.4 Tratamento.....	25
2.2 Imunogenética do LES.....	27
2.3 A via MYD88.....	30
2.3.1 Biologia do MyD88.....	32
2.3.2 MyD88 no Lúpus eritematosos sistêmico juvenil.....	35
3 OBJETIVOS.....	36
3.1 Objetivo geral.....	36
3.2 Objetivos específicos.....	36
4 METODOLOGIA.....	37
4.1 Desenho de estudo.....	37
4.2 Isolamento de PBMC e cultura de células.....	37
4.3 Isolamento de mRNA e síntese de cDNA.....	38
4.4 Ensaio de expressão gênica.....	38
4.5 Análise estatística.....	39
5 RESULTADOS.....	40
5.1 Caracterização clínica.....	40
5.2 Análise de expressão do MYD88.....	41
6 DISCUSSÃO.....	44
7 CONCLUSÃO.....	47
REFERÊNCIAS.....	48
ANEXOS.....	57
ANEXO A.....	57
Cópia do parecer do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE.....	57

1 INTRODUÇÃO

O Lúpus eritematosos sistêmico juvenil (LESj) é uma doença autoimune caracterizada por ser multissistêmica, heterogênea e inflamatória. Geralmente, o LESj surge entre os 12 e 16 anos de idade sendo menos comum antes dos 10 anos e ainda mais raro antes dos cinco anos. Embora compartilhe patogênese e manifestações clínicas semelhantes ao LES em adultos, o LESj tende a se manifestar de forma mais agressiva e com maior comprometimento dos sistemas renal, neurológico e hematológico. Resultando em taxas de mortalidade mais elevadas e tratamento intensivo.

Conhecida como uma condição poligênica, o LESj tem sua patogênese relacionada a diversos fatores genéticos e ambientais. Combinados, esses fatores podem levar à desregulação do sistema imunológico, tanto inato quanto adaptativo. Assim, a ativação exacerbada do sistema imune inato resulta em uma produção de citocinas pró-inflamatórias relacionadas a doenças autoimunes.

Nesse sentido, existem os Receptores de Reconhecimento de Padrões (PRRs), os quais desempenham um importante papel no curso inflamatório da doença. Os PRRs são proteínas presentes nas células imunológicas com a capacidade de identificar padrões moleculares associados ao dano (DAMPs), que surgem em situações de traumas ou danos teciduais e celulares, como também, padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), que englobam componentes como material genético, parede celular e proteínas de patógenos.

Dentre os PRRs, pode-se destacar os Receptores da Família Semelhante a Toll-like (TLRs). Estruturalmente, os TLRs apresentam três domínios: DD, ID e TIR; sendo o TIR essencial na transdução do sinal iniciado pelos TLRs. Após reconhecer a um PAMPs ou DAMPs, o TIR sofre uma mudança conformacional, permitindo a interação com moléculas adaptadoras, que ficam no interior da célula, dentre elas o fator de diferenciação mieloide (MyD88).

O MyD88 responde a sinalização de vários TLRs e IL-1R, levando à formação do complexo Mydssoma, composto pelo próprio MyD88 e proteínas IRAKs, como IRAK1, IRAK2 e IRAK4. Uma vez formado, este complexo tem como função desencadear uma cascata de sinalização, ativando fatores de transcrição e induzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como IFN-I, TNF- α , IL6 e IL-1 β . A desregulação na atividade desta via está relacionado com doenças autoimunes e inflamatórias, incluindo o LES.

Apesar da existência de estudos que relacionam o Mydssoma com LES, permanecem algumas lacunas quanto a esse complexo no LESj. Alguns estudos apontam que os genes envolvidos no LES e LESj podem ser diferentes, tendo como justificativa a apresentação clínica mais agressiva na infância e o menor tempo de exposição desses pacientes aos fatores ambientais.

Considerando a importância de ampliar a compreensão dos mecanismos no LESj, o presente estudo avaliou a possível contribuição do MyD88 para a patogênese da doença, por meio da análise do padrão de expressão do gene *MYD88* em culturas de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de pacientes com LESj.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Lúpus eritematosos sistêmico juvenil

O LESj é uma condição autoimune com caráter multissistêmico, heterogêneo e inflamatório (Charras et al., 2021; Luo et al., 2022). O termo “Lupus Erythematosus” (lupus=lobo; erythematosus= vermelhidão), bem como sua descrição mais detalhada, foram apresentados por Cazenave em meados de 1850, referindo-se às manifestações cutâneas da doença. Somente em 1895, o médico canadense Osler concluiu que a condição afetava diversas partes do corpo, introduzindo, assim, o termo “sistêmico” na doença (Zimmermann, 1997; Rodrigues et al., 2017).

Dentre os pacientes com LES, 15-20% são diagnosticados antes dos 18 anos de idade, tendo em vista que o LESj começa a se manifestar entre os 12 e 16 anos de idade e menos frequente antes dos 10 anos e mais raro antes dos cinco anos de idade. Como outras doenças autoimunes, é mais comum no sexo feminino do que masculino, sendo afetadas 4-5 meninas a cada 1 menino (Schildt et al., 2021; Sestan et al., 2023)

Apesar de compartilhar semelhantes patogênese e manifestações clínicas com o LES em adultos, o LESj se manifesta de forma mais agressiva, resultando em maiores taxas de mortalidade em comparação com LES (Ambrose, 2016; Pan et al., 2023). A mortalidade desses pacientes é 3-5 vezes maior do que a população geral, isso está atrelada a atividade inflamatória da doença, principalmente as manifestações renais, cardiovasculares e do sistema nervoso central, além de risco maior a infecções. Devido ao seu caráter heterogêneo, o LESj se apresenta de diferentes formas a depender de fatores étnicos, ambientais e genéticos, por exemplo (Smith, 2019; BRASIL, 2021).

2.1.1 Epidemiologia

Reunindo estudos da China, Austria, Canadá e Estados Unidos, observou-se que as taxas de incidência de LESj variam de 0,3 a 0,9 por 100.000 crianças-ano, com taxas de prevalência de 3,3 a 8,8 por 100.000 crianças (Denardo et al., 1994; Kaipainen-seppänen; Savolainen, 1996; Malleson et al., 1996; Huemer et al., 2001; Huang; Yao; See, 2004; Houghton et al., 2006; Harry et al., 2018; Brunner et al., 2020).

Assim como no LES, o LESj é mais frequente em populações não brancas, em especial os hispânicos, afro-americanos, afro-caribenhos, nativos americanos e asiáticos (Hiraki et al., 2009). Além disso, as populações não-brancas com pais não-brancos são diagnosticadas mais cedo do que as com pais brancos (Peschken et al., 2009).

Em relação ao sexo, embora o LESj seja mais comum em mulheres do que em homens, a proporção de 4-5 meninas a cada 1 menino é menor do que a observada em LES na faixa etária adulta, sendo nesta 9 mulheres a cada 1 homem (Peschken et al., 2009). Inicialmente, os estudos sugeriam que a variação da proporção estava relacionada com o estado de puberdade; porém, estudos posteriores complementaram que a proporção mulheres/homens aparenta depender da etnia da população estudada. As razões para a influência da etnia na idade de início da doença e no sexo em LESj não são conhecidas (Huang; Yao; See, 2004).

Em comparação com outras doenças autoimunes na infância, LESj é cerca de 10 a 15 vezes menos comum do que a artrite idiopática juvenil (AIJ) e o diabetes tipo 1 em crianças brancas (Bahillo et al., 2007). No entanto, em alguns países asiáticos, o LESj foi relatado como sendo ainda mais comum do que AIJ (Huang; Yao; See, 2004), reafirmando assim, os fatores étnicos como influência importante na doença e consequentemente nos dados epidemiológicos.

A expectativa de vida dos pacientes com lúpus aumentou significativamente nas últimas três décadas. A taxa de sobrevivência de 5 anos para pacientes com LESj é de 94-100%; e a taxa de sobrevivência de 10 anos varia de 81 a 92%, entretanto, isso ocorre no hemisfério norte ocidental (Ravelli; Ruperto; Martini, 2005). Os países caribenhos, africanos, asiáticos e sul-americanos têm relatado taxas de sobrevivência mais baixas (Vachvanichsanong; Dissaneewate; Mcneil, 2009), resultado, provavelmente, do diagnóstico tardio e do acesso limitado ao suporte adequado, recursos médicos e terapias mais atualizadas. Visto que as condições de saúde em diferentes grupos étnicos sofrem influência de diversos fatores como localização geográfica, estado socioeconômico, acesso à saúde e educação (Peschken, 2020; Gonzales, 2022).

No Brasil, há uma escassez de estudos epidemiológicos com LESj. Assim, apenas o LES adulto foi avaliado e mesmo assim poucos estudos foram realizados, no entanto, foi observada uma diferença na incidência entre regiões. Um exemplo dessa variação é evidenciado ao compararmos os dados de Natal - Rio Grande do Norte, onde a incidência foi registrada em 8,7 casos por 100.000 habitantes no ano de 2000, com Cascavel - Paraná, que

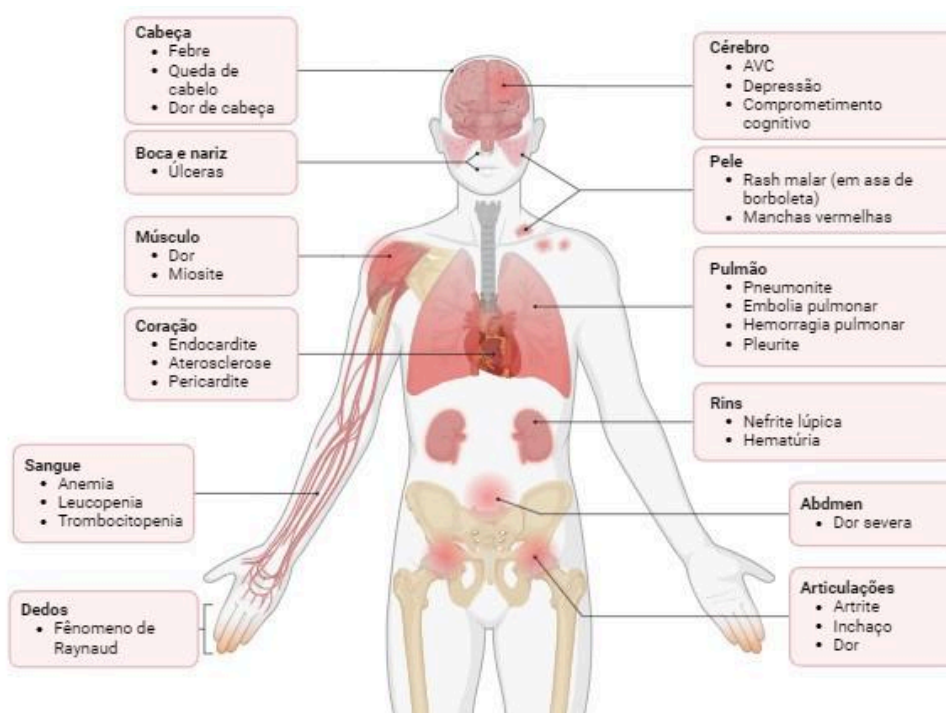
apresentou uma incidência de 4,8 casos por 100.000 habitantes/ano nos anos de 2007 e 2008 (Vilar; Sato, 2002; Nakashima et al., 2011).

A diversidade na incidência do LESj pode ser atribuída a vários fatores, com destaque para os fatores climáticos e étnicos (Rees, 2017). O Brasil, por exemplo, é caracterizado por uma ampla diversidade climática e exposição solar variada entre regiões. Além disso, devido à sua história de miscigenação étnica, o país apresenta uma variedade de grupos populacionais. Por exemplo, a presença mais significativa de descendentes da população europeia na região sul pode influenciar padrões distintos de incidência da doença. Essa interação complexa de fatores climáticos e étnicos reflete-se na fisiopatologia do LES, que é influenciada por fatores genéticos e ambientais (Fava, Petri, 2019).

2.1.2 Manifestações clínicas

O LES é conhecido como “a doença com manifestações incontáveis”, pelo acometimento de diversos órgãos além da abrangência de sintomas clínicos (Sestan et al., 2023). As manifestações podem variar entre agudas e crônicas, e períodos ativos e inativos (Trindade et al., 2021). Uma visão geral pode ser vista na Figura 1.

Figura 1: Manifestações clínicas do LES



Fonte: elaborado pelo próprio autor pelo BioRender (2024)

O LESj frequentemente inicia de forma aguda, afetando simultaneamente diversos órgãos. No início da doença, é comum observar manifestações clínicas gerais, tais como febre, perda de peso, mal-estar, fadiga, inapetência além de erupções cutâneas e envolvimento renal. Muitos desses sintomas são inespecíficos, dessa forma, é preciso excluir condições infecciosas e neoplásicas para diagnosticar corretamente (Harry et al., 2018).

Um estudo feito por reumatologistas da Liga Pan-Americana de Associações de Reumatologia (PANLAR) descreveu as principais características observadas nos pacientes de LESj, sendo as seguintes manifestações: nefrite lúpica (86%), manifestações na pele (84%), envolvimento hematológico (84%), manifestações musculoesqueléticas (72%), febre (71%), serosite (49%), manifestações neuropsiquiátricas (32%), fenômeno de Raynaud (24%), manifestações pulmonares (14%), envolvimento gastrointestinal (12%) e ocular (5%) (Ferreira et al., 2018).

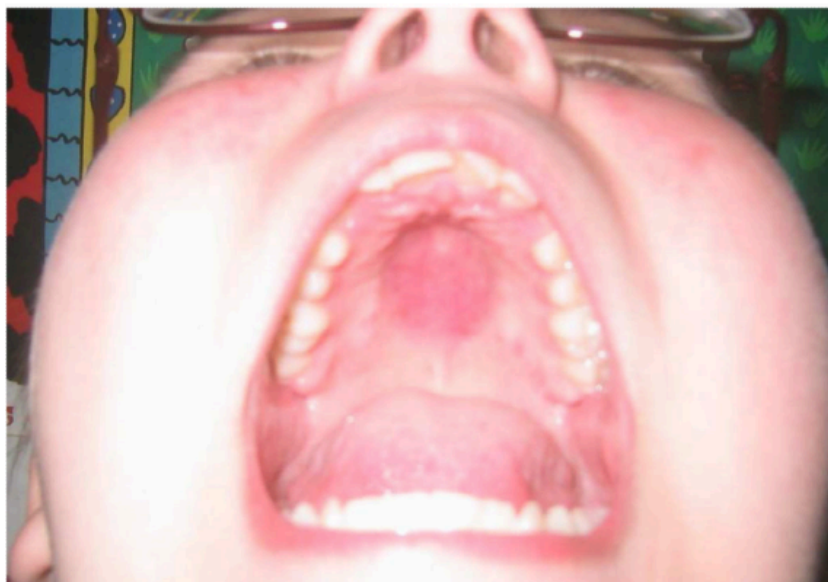
Pacientes com LESj comumente apresentam manifestações cutâneas, onde a mais predominante é a rash malar, conhecida como erupção em "asa de borboleta" (Figura 2). Outros sintomas incluem úlceras nasais e orais indolores (Figura 3), bem como alopecia não cicatricial, principalmente na área frontal (Tarvin; O'Neil, 2018).

Figura 2: Rash Malar em paciente LESj



Manifestação cutânea característica do LES, rash malar em “asa de borboleta”. Fonte: Levy, Kamphuis, 2012.

Figura 3: Úlcera oral em paciente LESj



Fonte: Levy, Kamphuis, 2012.

O comprometimento renal é comum no LES adulta e juvenil, sendo caracterizada como Nefrite Lúpica, onde os glomérulos são as estruturas mais afetadas. Os sinais clínicos compreendem proteinúria, hematúria e redução da filtração glomerular. No entanto, nos pacientes pediátricos, os sintomas variam consideravelmente, de manifestações lentas a casos de glomerulonefrite rapidamente progressiva. O espectro inclui casos de síndrome nefrótica, síndrome nefrítica, injúria renal aguda e até doença renal crônica. Sendo assim, a realização de uma biópsia renal é, atualmente, indispensável para a classificação da nefrite lúpica, avaliação da gravidade do comprometimento renal e orientação das estratégias terapêuticas (Pinheiro, 2019).

A presença de autoanticorpos é um ponto central na patogênese do LES. São exemplos desses anticorpos o anti-nuclear (ANA), anti-DNA de fita dupla (anti-dsDNA), anti-Smith (anti-Sm) e diversos anticorpos anti-antígeno nuclear extraível (anti-ENA). Eles são detectados no diagnóstico e ao longo da atividade, sendo os anti-Sm e anti-dsDNA específicos do LES e essenciais como critério para classificação (Phan et al., 2002; Emad et al., 2018; Abd El Monem Teama et al., 2021; Pongsawat Rodsaward et al., 2022). Algumas manifestações clínicas foram relacionadas com esses anticorpos, como o anti-dsDNA que foi associado ao desenvolvimento da nefrite lúpica e a exacerbação do LES (Linnik et al., 2005; Rekvig, 2015). Já o anti-ENA, apesar de incerto, mostrou-se como potencial preditor do

envolvimento de diversos órgãos, assim como a gravidade da doença e dessa forma, auxilia em direcionar um tratamento adequado (Emad et al., 2018).

No sistema nervoso central, os sintomas englobam cefaleia, transtornos de humor e doença cerebrovascular. O diagnóstico de lúpus neuropsiquiátrico é de exclusão, sendo crucial eliminar outras causas, tais como infecções agudas e crônicas, traumatismos, doenças psiquiátricas primárias, malignidades ou distúrbios metabólicos e uso de medicamentos que possuem efeitos colaterais semelhantes. Para um diagnóstico preciso, é necessário exames de imagem juntamente com a avaliação clínica e testes neurocognitivos (Trindade et al., 2021).

Assim como o LES em adultos, o LESj pode envolver inflamações no tecido cardíaco e nas serosas, levando a condições como: endocardite, miocardite, pleurite e pericardite. São emergências médicas casos de hemoptise, hemorragia alveolar e dispneia decorrentes de embolia pulmonar, requerendo intervenção terapêutica imediata (Massias et al., 2020)

No âmbito hematológico, por se tratar de uma doença autoimune, a manifestação mais predominante é a anemia hemolítica Coombs positiva, indicando presença de autoanticorpos. Ademais, a anemia, leucopenia e trombocitopenia também são comuns, além de distúrbios da coagulação, como a síndrome do anticorpo antifosfolípide, aumentando risco de eventos trombóticos ao longo da vida (Harry et al., 2018).

A maioria dos pacientes com LESj também pode apresentar manifestações reumatológicas, como: artrite, tipicamente nas mãos e nos pés. Nessas condições, é comum a rigidez articular matinal ou após períodos de inatividade juntamente com dor muscular e miosite. A artropatia de Jaccoud, que resulta no desvio ulnar das mãos, é menos frequente em crianças (menos de 5% dos pacientes com LESj) comparado ao LES adulto (Li et al., 2022).

As manifestações clínicas principais do LESj estão representadas na Tabela 1 abaixo, além de uma comparação com os pacientes de LES adulto.

Tabela 1: Características clínicas do LES de início na infância e de início na idade adulta (Continua)

Características clínicas	LESj	LESa
Febre	20–67%	43–55%
Linfadenopatia	6–36%	0–1%
Erupção de Malar	22–79%	35–59%
Lúpus discoide	0-19%	3–29%

(Continuação)

Úlceras orais	9–49%	13–40%
Fotossensibilidade	23–53%	20–57%
Artrite	22–88%	67–94%
Nefropatia	67–82%	33–53%
Pericardite	16–26%	13–33%
Pleurite	6–48%	6–33%
Doença neuropsiquiátrica	15–95%	33–60%
Leucopenia	46–64%	41–57%
Trombocitopenia	25–37%	6–25%
Anemia Hemolítica	10–76%	3–13%

Fonte: Adaptado de Malattia e Martini, 2013.

2.1.3 Diagnóstico e classificação

Indivíduos diagnosticados com LESj frequentemente apresentam uma trajetória clínica mais agressiva da doença. No entanto, observa-se que, mesmo sendo uma parcela significativa dos casos de LES, não há critérios de diagnóstico exclusivamente destinados a essa faixa etária (Chang, 2022). Assim, o diagnóstico de LESj comumente é estabelecido com base em critérios anteriormente validados para pacientes adultos (Cheng, 2022).

Nesse contexto, há mais de um sistema de classificação para o diagnóstico de LES (Chang, 2022). O Colégio Americano de Reumatologia (ACR), estabelecido em 1982 e revisado em 1997, consiste em 11 critérios, representado no Quadro 1, e a presença de pelo menos 4 é, geralmente, suficiente para confirmar o diagnóstico em crianças (Chang, 2022). No entanto, o ACR possui limitações na detecção precoce do LES, especialmente em relação à nefrite lúpica, uma manifestação comum, e aos problemas neurológicos (Lythgoe et al., 2017).

Quadro 1: Critérios ACR 1987/1999 para Lúpus Eritematoso Sistêmico

Critérios
Eritema malar: eritema fixo, plano ou elevado nas eminências malares, tendendo a poupar a região nasolabial.
Lesão discoide: lesão eritematosa, infiltrada, com escamas queratóticas aderidas e tampões foliculares, que evolui com cicatriz atrófica e discromia.
Fotossensibilidade: eritema cutâneo resultante de reação incomum ao sol, por história do paciente ou observação do médico
Úlcera bucal: ulceração bucal ou nasofaríngea, geralmente não dolorosa, observada pelo médico.
Artrite: artrite não erosiva envolvendo 2 ou mais articulações periféricas, caracterizada por dor à palpação, edema ou derrame.
Serosite: a) pleurite – história convincente de dor pleurítica ou atrito auscultado pelo médico ou evidência de derrame pleural; ou b) pericardite – documentada por eletrocardiografia ou atrito ou evidência de derrame pericárdico.
Alteração renal: a) proteinúria persistente de mais de 0,5 g/dia ou acima de 3+ (+++) se não quantificada; ou b) cilindros celulares – podem ser hemáticos, granulares, tubulares ou mistos.
Alteração neurológica: a) convulsão – na ausência de fármacos implicados ou alterações metabólicas conhecidas (por exemplo, uremia, cetoacidose, distúrbios hidroeletrólíticos); ou b) psicose – na ausência de fármacos implicados ou alterações metabólicas conhecidas (por exemplo, uremia, cetoacidose, distúrbios hidroeletrólíticos).
Alterações hematológicas: a) anemia hemolítica com reticulocitose; ou b) leucopenia de menos de 4.000/mm ³ em duas ou mais ocasiões; ou c) linfopenia de menos de 1.500/mm ³ em duas ou mais ocasiões; ou d) trombocitopenia de menos de 100.000/mm ³ na ausência de uso de fármacos causadores
Alterações imunológicas: a) presença de anti-DNA nativo; ou b) presença de anti-Sm; ou c) achados positivos de anticorpos antifosfolipídeos baseados em concentração sérica anormal de anticardiolipina IgG ou IgM, em teste positivo para anticoagulante lúpico, usando teste-padrão ou em VDRL falso-positivo por, pelo menos, 6 meses e confirmado por FTA-Abs negativo.
Anticorpo antinuclear (FAN): título anormal de FAN por imunofluorescência ou método equivalente em qualquer momento, na ausência de medicamentos sabidamente associados ao lúpus induzido por fármacos.

Fonte: American College of Rheumatology (ACR)

O Systemic Lupus International Collaborating Clinics (SLICC), revisado em 2012, baseado na definição de dano do paciente, conta com 11 critérios clínicos e 6 critérios imunológicos. O SLICC, detalhado no Quadro 2, abrange uma ampla variedade de manifestações, incluindo aquelas de natureza neurológica, renal, cutânea, citológica e imunológica (Petri et al., 2012).

Quadro 2: Critérios SLICC aplicados para diagnóstico do LES

(Continua)

Critérios Clínicos
1. Lúpus cutâneo agudo incluindo lúpus erupção malar (não conta discoide malar) lúpus bolhoso necrólise epidérmica tóxica variante do LES lúpus maculopapular lúpus fotossensível na ausência de dermatomiosite ou lúpus cutâneo subagudo 0 (lesões psoriasiformes não endurecidas e/ou policíclicas anulares que se resolvem sem cicatriz, embora ocasionalmente com despigmentação pós-inflamatória ou telangiectasias)
2. Lúpus cutâneo crônico incluindo erupção discoide clássica localizada (acima do pescoço) generalizada (acima e abaixo do pescoço) lúpus hipertrófico (verrucoso) paniculite lúpica (profundus) lúpus de mucosa lúpus eritematoso tumidus lúpus chilblains sobreposição de lúpus discoide/líquen plano
3. Úlceras orais: palato bucal língua ou úlceras nasais na ausência de outras causas, como vasculite, Behcet, infecção (herpes), doença inflamatória intestinal, artrite reativa e alimentos ácidos
4. Alopecia não cicatricial (desbaste difuso ou fragilidade do cabelo com cabelos quebradiços visíveis) na ausência de outras causas como alopecia areata, drogas, deficiência de ferro e alopecia androgênica
5. Sinovite envolvendo duas ou mais articulações, caracterizada por edema ou efusão OU sensibilidade em 2 ou mais articulações e trinta minutos ou mais de rigidez matinal.
6. Serosite pleurisia típica por mais de 1 dia ou derrames pleurais ou fricção pleural dor pericárdica típica (dor com decúbito melhorado ao sentar para a frente) por mais de 1 dia ou derrame pericárdico ou atrito pericárdico ou pericardite por eletrocardiograma na ausência de outras causas, como infecção, uremia e pericardite de Dressler
7. Renal Proteína na urina/creatinina (ou proteína na urina de 24 horas) representando 500 mg de

(Continuação)

proteína/24 horas ou Cilindros de glóbulos vermelhos
8. Neurológico convulsões psicose mononeurite múltipla na ausência de outras causas conhecidas, como vasculite primária mielite neuropatia periférica ou craniana na ausência de outras causas conhecidas, como vasculite primária, infecção e diabetes mellitus estado confuso agudo na ausência de outras causas, incluindo tóxico-metabólicas, uremia, drogas
9. Anemia hemolítica
10. Leucopenia (< 4000/mm ³ pelo menos uma vez) na ausência de outras causas conhecidas, como Felty, drogas e hipertensão portal OU Linfopenia (< 1000/mm ³ pelo menos uma vez) na ausência de outras causas conhecidas, como corticosteroides, drogas e infecção
11. Trombocitopenia (<100.000/mm ³) pelo menos uma vez na ausência de outras causas conhecidas, como drogas, hipertensão portal e PTT
Critérios imunológicos
1. ANA acima do intervalo de referência do laboratório
2. Anti-dsDNA acima da faixa de referência laboratorial, exceto ELISA: duas vezes acima da faixa laboratorial intervalo de referência
3. Anti-Sm
4. Anticorpo antifosfolípide: qualquer um dos seguintes anticoagulante lúpico RPR falso positivo anticardiolipina de título médio ou alto (IgA, IgG ou IgM) anti-β 2 glicoproteína I (IgA, IgG ou IgM)
5. Baixo complemento baixo C3 baixo C4 baixo CH50
6. Teste de Coombs direto na ausência de anemia hemolítica

Fonte: (Petri et al. 2012).

No momento do diagnóstico, torna-se essencial avaliar a atividade da doença do paciente. Para atender a essa necessidade, foi desenvolvido um instrumento específico chamado Sistema de Escore de Atividade da Doença do Lúpus Eritematoso Sistêmico (SLEDAI), criado por especialistas em LES (Bombardier et al., 1992). Ao longo do tempo, o

SLEDAI passou por modificações substanciais, evoluindo para o SLEDAI-2K, apresentado e validado por Gladman e colaboradores (2002).

O SLEDAI-2K compreende 24 critérios que abrangem nove sistemas do corpo, cada um detalhadamente enumerado. A avaliação desses critérios resulta em uma pontuação total que varia de 0 a 105 pontos, quanto maior atividade da doença (Lai et al., 2021). As definições de atividade da doença são classificadas da seguinte forma: LES inativo= 0; Atividade leve= 1-5; Atividade moderada= 6-10; Atividade alta= 11-19; e Atividade muito alta= 20 ou mais (Gladman et al. 2002). Para um entendimento abrangente dos critérios do SLEDAI-2K, o Quadro 3 fornece um resumo detalhado desses elementos.

Quadro 3: Critério do SLEDAI para LES

(Continua)

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 orgânico-cerebral	Função mental alterada com alteração da orientação, memória ou outra função intelectual com rápida instalação e flutuação dos achados clínicos incluindo obnubilação 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 actividade 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 neurite 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

(Continuação)

8	Vasculite	Ulceração, gangrena, nódulos digitais dolorosos, infarto periungueal, hemorragias subungueais, 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	Hematuria	> 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	Trombocitopenia	<100.000 plaquetas/mm ³
1	Leucopenia	<3.000 leucócitos/mm ³ Excluir causas farmacológicas
1	Febre	>38° C excluir causa infecciosa

Quadro do escore de SLEDAI-2K. Fonte: (Gladman et al. 2002).

2.1.4 Tratamento

O LESj é considerado uma doença sem cura e o conhecimento sobre medicamentos eficazes na remissão da doença ainda é escasso, devido a menor quantidade de pesquisas e estudos clínicos. Dessa forma, o tratamento foca em minimizar os sinais e sintomas, controlando a atividade da doença e permitindo maior qualidade de vida (Charras et al., 2021).

O prognóstico do LES evoluiu desde de 1960 com o estabelecimento de terapias usando glicocorticoides, apresentando uma taxa de sobrevida de 90% ou mais após 5 anos do

diagnóstico (Tanaka, 2020). O tratamento medicamentoso consiste de antimaláricos (cloroquina e hidroxicloroquina), glicocorticoides (betametasona, dexametasona, metilprednisolona e prednisona) e diversos tipos de imunossuppressores ou imunomoduladores, escolhidos conforme o comprometimento de órgãos e sistemas específicos (Gordon, 2017).

O início imediato de terapia combinada, incluindo altas doses de glicocorticoides e drogas imunossupressoras, é recomendado para pacientes com alta atividade da doença ou com danos como nefrite lúpica e distúrbios do sistema nervoso central (Jameson, 2018). Os glicocorticoides, apesar de eficazes no controle da inflamação e necessários em doses elevadas, estão relacionados com efeitos adversos significativos (Vaglio et al., 2018).

Os imunossuppressores mais utilizados são o micofenolato mofetil e ciclofosfamida intravenosa (Tanaka, 2020). As diretrizes da Liga Europeia contra o Reumatismo (EULAR) indicam hidroxicloroquina e demais glicocorticoides em baixa dose para pacientes sem lesões importantes nos órgãos, com artrite, dor muscular e febre (Bertsias et al. 2012). Já para pacientes que não apresentam resposta ao tratamento ou que não conseguem atingir a dose de manutenção dos glicocorticoides, há indicação de associação com azatioprina e o micofenolato, para poupar o uso de glicocorticoides (Tanaka, 2020).

O belimumabe, anticorpo monoclonal IgG, tem como mecanismo de ação a ligação ao BLyS solúvel, impedindo sua ligação ao linfócito B, reduzindo sua maturação, diferenciação e sobrevivência. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) registrou este medicamento como terapia adjuvante em pacientes com LES adulto ativo, e para pacientes a partir de 5 anos de idade com LESj ativo. Ambos devem estar em uso de tratamento padrão. No entanto, o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas do Lúpus Eritematoso Sistêmico (BRASIL, 2021) não preconiza o uso de belimumabe no tratamento para LES pois seu uso não foi incorporado ao Sistema Único de Saúde (SUS).

Na conduta atual, pacientes com LESj fazem uso dos mesmos imunossuppressores utilizados para LES adulto, mas na maioria das vezes, necessitam de tratamentos mais agressivos para controle desejado da doença (Trindade et al., 2021).

No entanto, pela heterogeneidade da doença, é essencial a individualização da conduta terapêutica, em vista disso, diversos estudos são feitos para encontrar biomarcadores. Essas substâncias podem ser úteis para o diagnóstico, prognóstico, classificação e/ou serem utilizadas como alvo terapêutico, baseando-se no papel daquele marcador na doença (Habib et al., 2022).

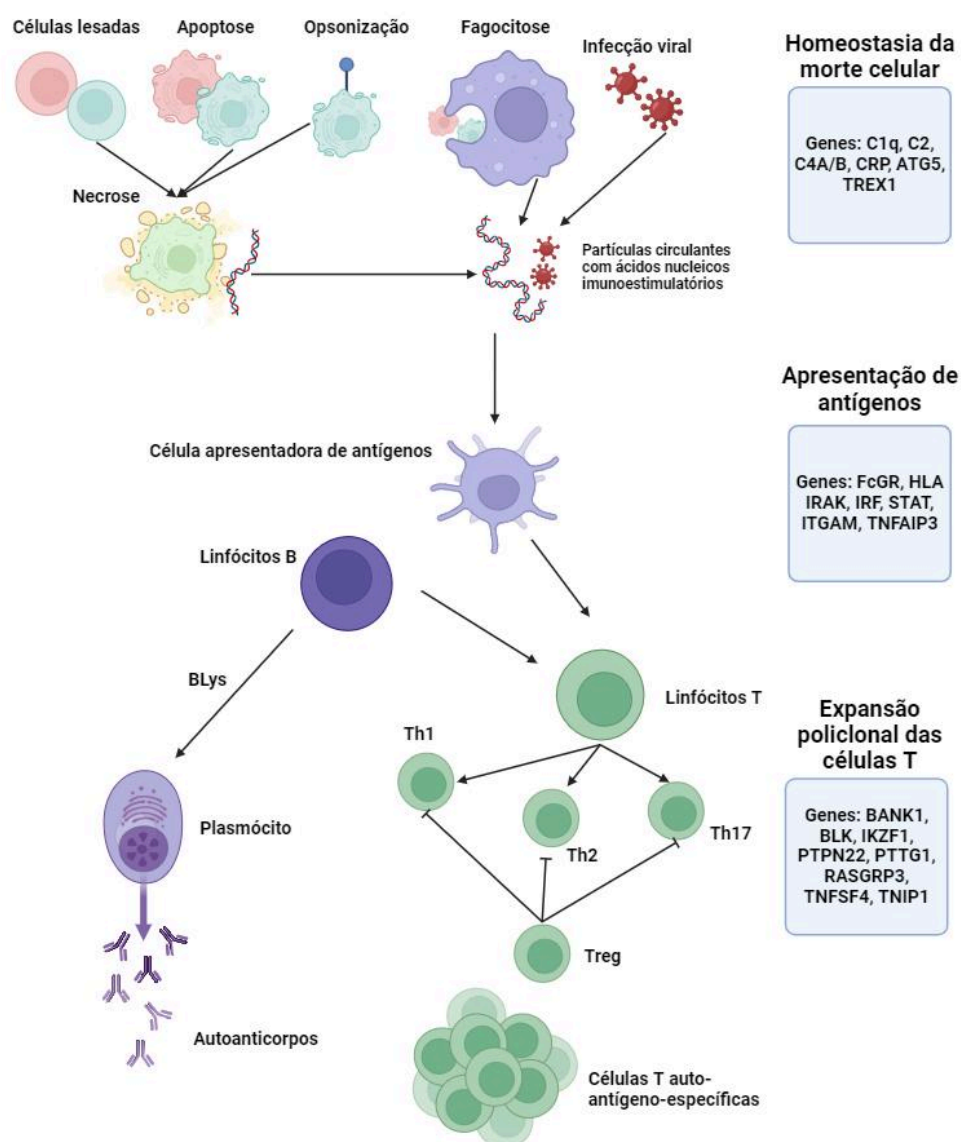
2.2 Imunogenética do LES

Os indivíduos com LESj nascem sem a doença ativa ou qualquer manifestação clínica visível, no entanto, são suscetíveis ao lúpus (Fava, Petri, 2019). Estudos indicaram que as alterações ocorrem em genes envolvidos com a morte celular, sinalização de células B e T, apresentação de antígenos, entre outros mecanismos importantes para o sistema imunológico. Cerca de 7% dos indivíduos com LESj desenvolvem a condição devido à presença de uma mutação em um único gene, como por exemplo, genes do sistema complemento (*C1q*, *C1r*, *C1s*, *C2*, *C4A* e *C4B*) (Amano, 2008). Já os demais, possuem variantes genéticas, mas sua manifestação depende de outros fatores para ocorrer (Charras et al., 2021). Assim, a carga genética provavelmente desempenha um papel significativo no início precoce do lúpus e na manifestação mais intensa da doença durante a juventude (Massias et al., 2020; Charras et al., 2021).

Estudos de associação genômica ampla (GWAS) foram realizados em coortes de LES adulto, demonstrando associação entre polimorfismos em vários genes envolvidos com ativação de células do sistema imunológico, inflamação e homeostasia celular (Harley, 2009). Algumas variantes foram associadas ao risco, desenvolvimento e manifestações clínicas do LESj, e foram realizadas em coortes de diferentes etnicidades como brasileira, japonesa, mexicana, entre outras (Charras et al., 2021). Como exemplo, a variante rs1143629 do gene *IL1B*, envolvido com sinalização de células imune, foi associada ao desenvolvimento do LESj numa coorte brasileira (Pontillo, 2015). Além desses estudos, já foram vistos nas últimas décadas, a associação de genes ao desenvolvimento, progressão e manifestação clínica do LES. Um panorama de alguns genes já determinados e suas respectivas contribuições estão ilustrados na Figura 4.

Vale ressaltar que o desencadeamento do LESj resulta da combinação de fatores genéticos e ambientais, incluindo mudanças hormonais, exposição solar, uso de certos medicamentos, exposição ao monóxido de carbono e infecções virais. Esses fatores podem levar a um desequilíbrio do sistema imunológico, tanto do sistema imune inato quanto do sistema imune adaptativo (Trindade et al., 2021).

Figura 4: Genes envolvidos na patogênese do LES



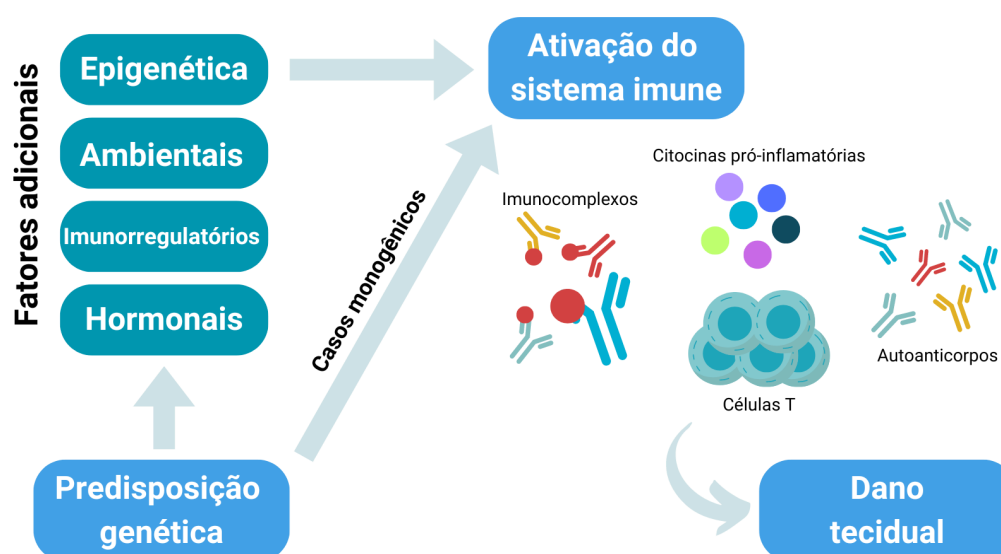
As variações do LES nos genes C1q, C2, C4A/B, CRP, ATG5, TREX1, afetam a homeostasia da morte celular e a rápida remoção de células mortas, resultando numa necrose secundária e exposição de restos nucleares ao sistema imune. Juntamente aos restos nucleares, os vírus também conseguem ativar a resposta imunológica. As células apresentadoras de antígenos são responsáveis pela ativação das demais células imunes, variantes genéticas em seus receptores se caracterizam como fator de risco no LES, são os genes afetados: FcGR, HLA, IRAK, IRF, STAT, ITGAM, TNFAIP3. Já as variantes no genes BANK1, BLK, IKZF1, PTPN22, PTTG1, RASGRP3, TNFSF4 e TNIP1 podem afetar a regulação da ativação das células T, levando a um desequilíbrio da expansão policlonal de linfócitos. Além disso, os altos níveis de BLyS, que atuam no amadurecimento dos linfócitos B, aumentam a quantidade de plasmócitos. No fim, são gerados células T auto-antígenos específicos e autoanticorpos a partir dos plasmócitos. Fonte: Lech, Anders, 2013; adaptado pelo autor.

O sistema imune inato, caracterizado pelas respostas inespecíficas, age como uma defesa inicial por intermédio de diversos mecanismos celulares e moleculares, envolvendo células imunes, citocinas e proteínas do sistema complemento. Já o sistema imune adaptativo está relacionado a uma resposta mais demorada que a inata, porém mais específica. Nesse

contexto, pacientes com LES apresentam níveis elevados de estimuladores de Linfócito B (BLyS ou BAFF) e maior atividade das células B para atender à produção dos autoanticorpos. Esse tipo de anticorpo têm como alvo, proteínas do próprio indivíduo, principalmente antígenos intracelulares como as histonas presentes no núcleo (Trindade et al., 2021).

A resposta imunológica provocada por esses autoanticorpos leva a um aumento na apoptose, resultando em mais danos celulares e na exposição de restos nucleares. Com os restos nucleares expostos, os autoanticorpos continuam ativando-se e recrutando células imunológicas, como os linfócitos T, B e monócitos. Esse evento desencadeia uma resposta inflamatória adicional, assim, perpetuando o estado inflamatório característico do LES que converge à perda da autotolerância imunológica (Trindade et al., 2021). A interação entre anticorpos e antígenos gera a formação de imunocomplexos, o que torna um fenômeno característico do LES e resulta na deposição desses complexos nos tecidos. Dessa forma, essa deposição gera danos aos órgãos, destacando o impacto direto da resposta autoimune na fisiologia e integridade dos sistemas afetados pelo LES e aparecimento de manifestações clínicas (Smith, 2019). A patogênese do LES está esquematizada na Figura 5. Diversos mecanismos moleculares são estudados como alvo terapêutico por possuírem um papel na indução da resposta inflamatória e imunológica, e estarem relacionados com doenças autoimunes (Loiarro, 2013; Cen, Liu, Cheng, 2018; Mussari, 2020).

Figura 5: Patogênese do LES



A patogênese do LES envolve a predisposição genética, que pode ser suficiente para desenvolver a doença em alguns casos, mas que normalmente se relaciona a fatores adicionais como epigenética, ambiente, regulação do

sistema imune e fatores hormonais. Esses fatores combinados geram ativação do sistema imune inato e adaptativo, gerando liberação de citocinas pró-inflamatórias, ativação de células T efectoras, produção de autoanticorpos e imunocomplexos. Esse estado contribui para a inflamação do tecido e seu dano. Fonte: Adaptado de Smith et al. 2019.

2.3 A via MYD88

No ano de 1989, Charles Janeway Jr. propôs a existência de um conjunto de receptores, expressos por células do sistema imunológico inato, encarregados de identificar moléculas provenientes de patógenos ou danos (Janeway, 1989; Amarante-Mendes et al., 2018). Esses receptores são denominados Receptores de Reconhecimento de Padrões (PRRs), e consistem em proteínas com a capacidade de identificar padrões moleculares associados ao dano (DAMPs), que surgem em situações de traumas ou danos teciduais e celulares, e padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), que englobam componentes como material genético, parede celular e proteínas de patógenos (Tang e Zhou, 2020; Abas et al., 2022).

Classificados como PRRs, o grupo de receptores Toll-like (TLR)/receptor de interleucina-1 (IL1R) foram identificados pela primeira vez em 1998 por estudos de O'Neill e Greene (O'Neill; Greene, 1998). Essa família apresenta uma característica estrutural única, um domínio intracelular conservado composto por aproximadamente 200 aminoácidos na região citoplasmática, denominado de domínio Toll/IL-1R (TIR) (Xu et al., 2000; Chen et al., 2020). Além do domínio TIR, os TLRs possuem outros dois domínios: um extracelular para o reconhecimento do ligante e um transmembrana.

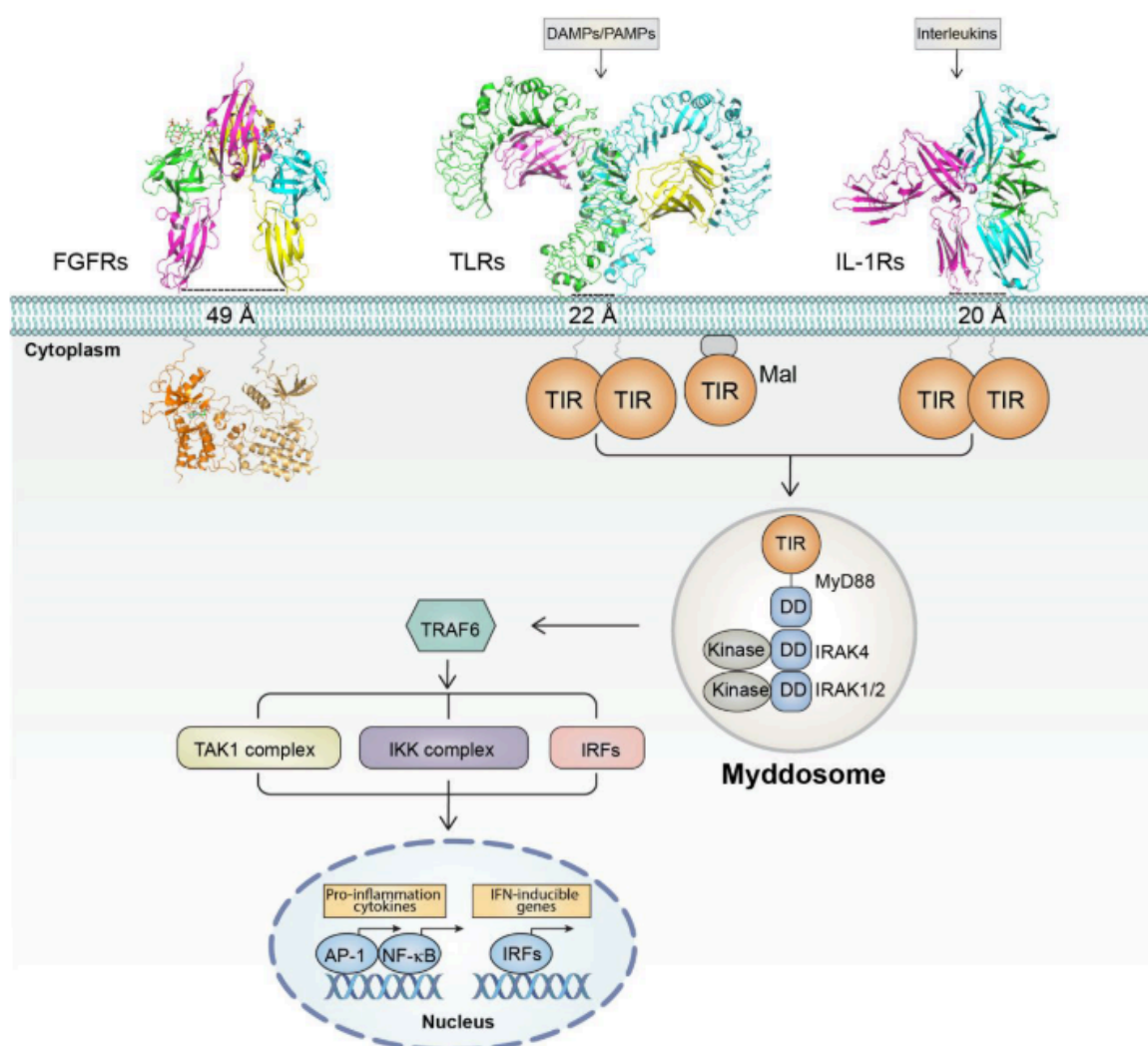
Após a ativação dos domínios externos dos receptores por PAMPs ou DAMPs, o domínio TIR pode passar por uma mudança conformacional. A mudança consiste na formação de um dímero que facilita o recrutamento de proteínas adaptadoras subsequentes da via, criando a estrutura essencial para a transdução de sinais do TLR/IL-1Rs ao núcleo celular (Janssens; Beyaert, 2002; Chen et al., 2020).

Dessa forma, as proteínas adaptadoras têm como função recrutar e ativar quinases de sinalização que, consequentemente, ativam fatores de transcrição e geram resposta inflamatória através de citocinas e interferons tipo 1 (IFN-I) (O'NEILL; BOWIE, 2007; CHEN et al., 2020). Dentre as proteínas adaptadoras envolvidas com TLR/IL-1R, o MyD88 atua como proteína canônica, sendo esta a via mais utilizada. Dentre todos os TLR/IL-1Rs, apenas o TLR3 não utiliza MyD88 para sinalização (Akira, Takeda, 2004; Chen et al., 2020).

No estado de repouso, o MyD88 inativo normalmente está disperso no citoplasma (Funami et al., 2007; Chen et al., 2020), após o seu recrutamento dos domínios TIR dos

receptores, o MyD88 ativa a proteína Quinase 4 Associada ao Receptor de Interleucina-1 (IRAK4). Então, o IRAK4 se liga ao domínio de morte (DD) do MyD88, formando o complexo Mydssoma. As proteínas IRAK1 e IRAK2 também são recrutadas, promovendo a fosforilação do complexo, que leva a sua dissociação do receptor e também, ao recrutamento do Fator 6 Associado ao Receptor TNF (TRAF6), iniciando a transdução de sinal. Vale ressaltar que espécies diferentes podem utilizar IRAKs de maneira distinta no Mydssoma. Por último, o Mydssoma resulta na ativação do fator nuclear-kappa B (NF- κ B) e proteína ativadora-1 (AP-1), que produzem citocinas pró-inflamatórias como IL-6, IL-12, TNF- α e IL-1 β , além de fatores reguladores de interferons (IRFs) (Gay et al., 2014). A via de sinalização do Mydssoma está detalhada na Figura 6.

A formação do complexo Mydssoma é crucial na resposta inflamatória, e é regulada pela quantidade, tamanho e velocidade da montagem desses complexos, que geram respostas graduadas a diferentes estímulos (Chen et al., 2020).

Figura 6: Via de sinalização do Mydssoma

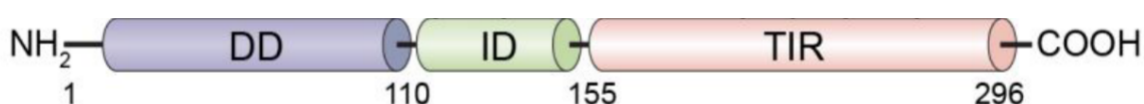
A ativação de TLRs e IL1R recruta MyD88, adaptador principal dos TLRs e IL1R, exceto o TLR3. O esquema mostra TLR2 e TLR4, a ligação é estabelecida por interações dos domínios TIR-TIR. O complexo Mydssoma é montado juntamente aos IRAKS, com interações no domínio DD. A ativação do TRAF6 leva a diferentes vias de sinalização, como complexo TAK1, complexo IKK e IRFs (fatores reguladores de interferon), que resultam em resposta inflamatória. Fonte: Chen et al. 2020.

2.3.1 Biologia do MyD88

MyD88 foi descoberto por em 1990 Lord et al (Lord; Hoffman-Liebermann; Liebermann, 1990) e sua estrutura foi apresentada em 1996 por Hardiman et al, sendo descrito três domínios principais: domínio de morte N-terminal (DD), domínio intermediário curto (ID) e um domínio C-terminal (TIR) (Figura 7). O domínio DD promove a associação do

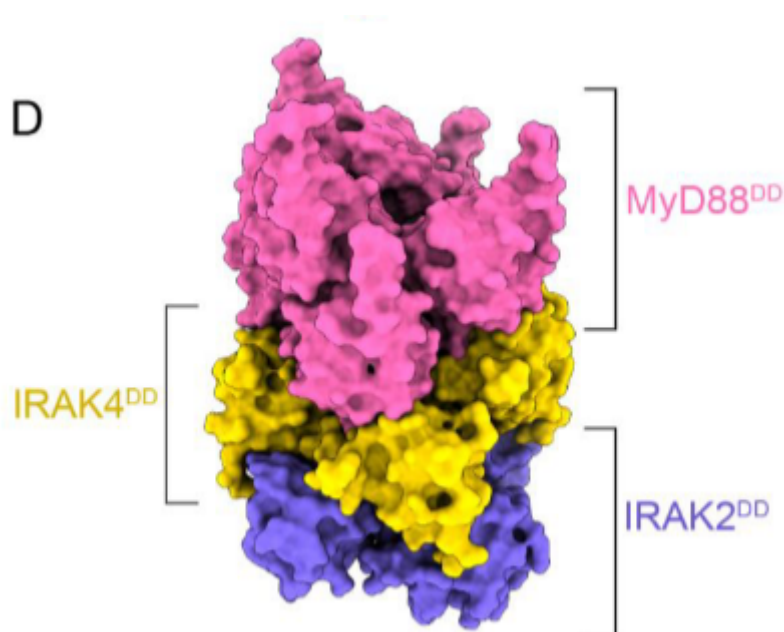
MyD88 com as proteínas IRAK, enquanto o domínio intermediário tem como função ligar TIR ao DD, sendo essencial para ativar o IRAK4. Por fim, o domínio TIR tem papel de mediar a interação com as demais proteínas que também apresentam esse domínio (Figura 8) (Hardiman et al., 1996).

Figura 7: Domínios do MyD88



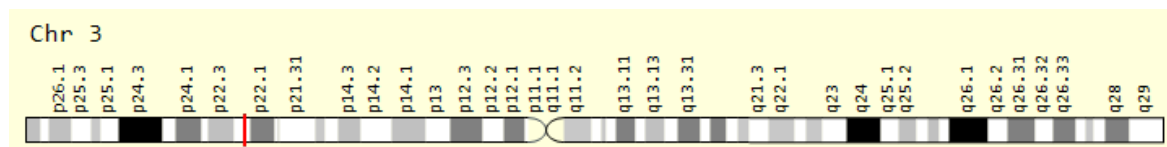
Esquematização dos domínios do MyD88: domínio de morte N-terminal (DD), domínio intermediário curto (ID) e um domínio C-terminal (TIR). Fonte: Adaptado de Chen et al. 2020.

Figura 8: Complexo ternário do MyD88, IRAK2, IRAK4



Associação do MyD88 com as proteínas IRAK a partir dos domínios DD. Fonte: Adaptado de Chen et al. 2020.

O gene *MYD88* está localizado no braço curto do cromossomo 3 (3p22.2) (Figura 9). O gene foi descrito com 5 éxons e 4.362 nucleotídeos (Bonnert et al. 1997; Muzny et al. 2006).

Figura 9: Gene *MYD88*

Fonte: ID GeneCars: gc03p038211

Este gene codifica a proteína adaptadora MyD88, que tem como função transdução de sinal a partir da sua interação com o domínio TIR dos receptores TLR/IL1R (Deliz-Aguirre et al., 2021). Sabe-se que há 6 isoformas do MyD88 produzidas por splicing alternativo que variam de 146 (15kDa) a 304 aminoácidos (34kDa), sendo a sendo a Q99836-1 a isoforma canônica com 296 aminoácidos (ID UniProt: Q99836) (Hardiman et al. 1997; Ota et al. 2004).

Além disso, essa proteína está relacionada com a regulação de proliferação e diferenciação das células do sistema imune (Guo et al., 2023);(ID Ensembl: ENSG00000172936);(ID NCBI:4615). Nesse sentido, a expressão do *MYD88* em humanos acontece principalmente em monócitos, linfócitos T, linfócitos B, células natural killer e células dendríticas (Hardiman et al., 1996).

Sobre interferências nesse gene, já se sabe que atividades alteradas do *MYD88* estão relacionadas a doenças autoimunes, inflamatórias crônicas, infecciosas e carcinogênese (Deguine; Barton, 2014). Como exemplo, uma única mutação no *MYD88* Arg196Cys pode resultar em deficiência na produção de citocinas pela incapacidade de ligação do domínio TIR (Von Bernuth et al., 2008). Da mesma forma, a deleção do resíduo Glu-52 no MyD88 gera infecções bacterianas invasivas para os pacientes. Além disso, alguns polimorfismos de nucleotídeo único não sinônimos (nsSNPs) do *MYD88* foram associados em problemas com a montagem do Mydssoma, contribuindo para maior susceptibilidade a infecções (George et al., 2011).

Sendo assim, uma compreensão mais aprofundada das alterações no MyD88 e das patologias associadas a esse complexo podem contribuir para o desenvolvimento de novas terapias para os pacientes.

2.3.2 MyD88 no Lúpus eritematosos sistêmico juvenil

Sabe-se que a sinalização desregulada do MyD88 está envolvida com diversas doenças autoimunes, como artrite reumatoide (AR), doença inflamatória intestinal, lúpus eritematoso sistêmico (LES), esclerose sistêmica (ES) e diabetes autoimune (Chaudhary et al., 2015).

LESj é, na maioria dos casos, uma condição poligênica complexa associada a mais de 80 genes distintos, que predominantemente afetam as vias do sistema imunológico (Webber et al., 2020). Entretanto, não há estudos que avaliaram a via do MyD88 em LESj.

É importante compreender a via do MyD88 no LESj, pois sua desregulação pode ocorrer por mutações de ganho de função ou superexpressão, permitindo que a NF- κ B se transloque para o núcleo e induza a expressão exacerbada de quimiocinas e citocinas inflamatórias. Esses fatores inflamatórios incluem TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, IL-17, óxido nítrico sintase induzida (iNOS), IFN- γ e molécula de adesão celular intercelular-1 (ICAM-1) (Picard et al., 2011).

Foram realizados estudos utilizando camundongos deficientes em MyD88 e essas pesquisas forneceram evidências substanciais sobre a função inflamatória dessa proteína. Os camundongos com deficiência de MyD88 demonstraram não responder a doses elevadas de endotoxina, com ausência de elevação nos níveis séricos de TNF- α , IL-1 β e IL-6 após exposição ao LPS. Além disso, macrófagos e células B desses camundongos também não produziram níveis mensuráveis de TNF- α e IL-6 em resposta ao LPS (Takeuchi et al., 2000). Os camundongos knockout para *MYD88* apresentaram produção reduzida de citocinas pró-inflamatórias em células do baço (Kissner et al., 2011).

Com isso em vista, a ausência de MyD88 foi associada à supressão de diversas doenças autoimunes em camundongos, como nefrite autoimune, encefalomielite, miocardite e lúpus (Miranda-Hernandez et al., 2011). Nos estudos de transplante, a deficiência em MyD88 resultou em uma sobrevivência superior do transplante, evidenciando o papel fundamental do MyD88 na indução da inflamação do aloenxerto e na prevenção da tolerância ao transplante (Braza et al., 2016). Essas descobertas, obtidas por meio de abordagens experimentais e clínicas, concedem importantes informações sobre o impacto do MyD88 na resposta imunológica e nas doenças relacionadas.

Diante do exposto anteriormente, torna-se fundamental avaliar o papel do MyD88 no LESj para ampliar a compreensão da doença. A hipótese desse estudo é que haja uma maior expressão desse gene *MYD88* em pacientes com LESj comparados a controles saudáveis.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a expressão do gene *MYD88* em pacientes com LESj e sua contribuição na patogênese da doença.

3.2 Objetivos específicos

1. Descrever os dados clínicos e demográficos dos pacientes do sexo feminino com LESj;
2. Verificar a expressão do gene *MYD88 in vitro* de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de pacientes do sexo feminino com LESj e controles saudáveis do sexo feminino frente a estímulos;
3. Comparar a expressão do gene *MYD88* entre pacientes com inatividade, atividade leve e atividade moderada com os controles saudáveis frente a estímulos.

4 METODOLOGIA

4.1 Desenho de estudo

Foram selecionados 10 pacientes do ambulatório de Reumatologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC- UFPE) e 10 controles saudáveis, da mesma região. As informações clínicas dos pacientes foram coletadas a partir de formulários no ambulatório de Reumatologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC- UFPE). A escolha dos participantes desta pesquisa seguiu os seguintes critérios de inclusão: I: os pacientes precisavam ter o diagnóstico de LESj confirmado pelos critérios SLICC/ACR; II: os controles saudáveis não podiam apresentar doença inflamatória ou autoimune. III: todos os participantes eram menores de 18 anos; IV: todos os participantes eram do sexo feminino. O grupo de pacientes foi classificado em dois grupos: pacientes com atividade moderada (SLEDAI= 6-10) e um único grupo unindo pacientes inativos (SLEDAI=0) e com atividade leve (SLEDAI= 1-5).

O estudo foi aprovado pelo comitê de ética da Universidade Federal de Pernambuco (CAAE: 96906618.2.0000.5208). Todos os participantes e responsáveis legais concordaram em participar do trabalho ao assinarem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

4.2 Isolamento de PBMC e cultura de células

O isolamento de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) foi feito a partir da coleta de 36ml de sangue dos pacientes e controles em tubos de EDTA e utilizando o método por centrifugação de densidade de sangue total Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare). Após retirar o anel de leucócitos foram isolados 2×10^6 células para cada condição de cultivo celular. Tais células foram distribuídas em poços de placa de cultura (Invitrogen, Life technology, USA), cultivadas em meio completo (RPMI 1640 + 5% de soro fetal bovino) e analisadas em três condições diferentes em triplicata biológica cada uma, sendo estas condições: células sem estímulo, com lipossacarídeo (LPS) e com LPS+ Adenosina trifosfato (ATP). Os estímulos foram utilizados para gerar um estado inflamatório nas células. Todos os poços foram deixados na estufa por 4 horas e os poços com estímulo receberam 1 μ g/ml LPS. Após esse período na estufa, a condição LPS+ATP recebeu o último estímulo, sendo o ATP (1mM) por 15 minutos. Ao finalizar essas etapas, os sobrenadantes foram retirados,

armazenados em eppendorffs e os poços foram lavados 3 vezes com 500 microlitros de tampão PBS (salina-fosfato) 1X. Posteriormente, foi adicionado 300 microlitros de tripsina aos poços e guardados na estufa por 10 minutos para possibilitar a remoção das células ao fundo. Por último, ao desativar a tripsina com 600 microlitros de meio completo, o conteúdo de cada poço foi recolhido e armazenado em eppendorffs contendo 400 microlitros de Trizol® (Invitrogen, USA) para futuro isolamento de mRNA.

4.3 Isolamento de mRNA e síntese de cDNA

O RNA total foi extraído com Trizol® (Invitrogen, USA), quantificadas no NanoDrop 2000, e padronizadas para concentração em um input de 500ng para síntese de cDNA. O cDNA foi feito com o kit GoScript™ Reverse Transcription System (Promega, USA) e posteriormente submetido ao termociclador para um único ciclo de 90 minutos, sendo cinco minutos a 25°C, 60 minutos a 42°C e 15 minutos a 70°C. Ao finalizar, foi adicionado água para se obter uma concentração final de 5 ng/ul de cDNA de cada amostra para realização do ensaio de expressão.

4.4 Ensaio de expressão gênica

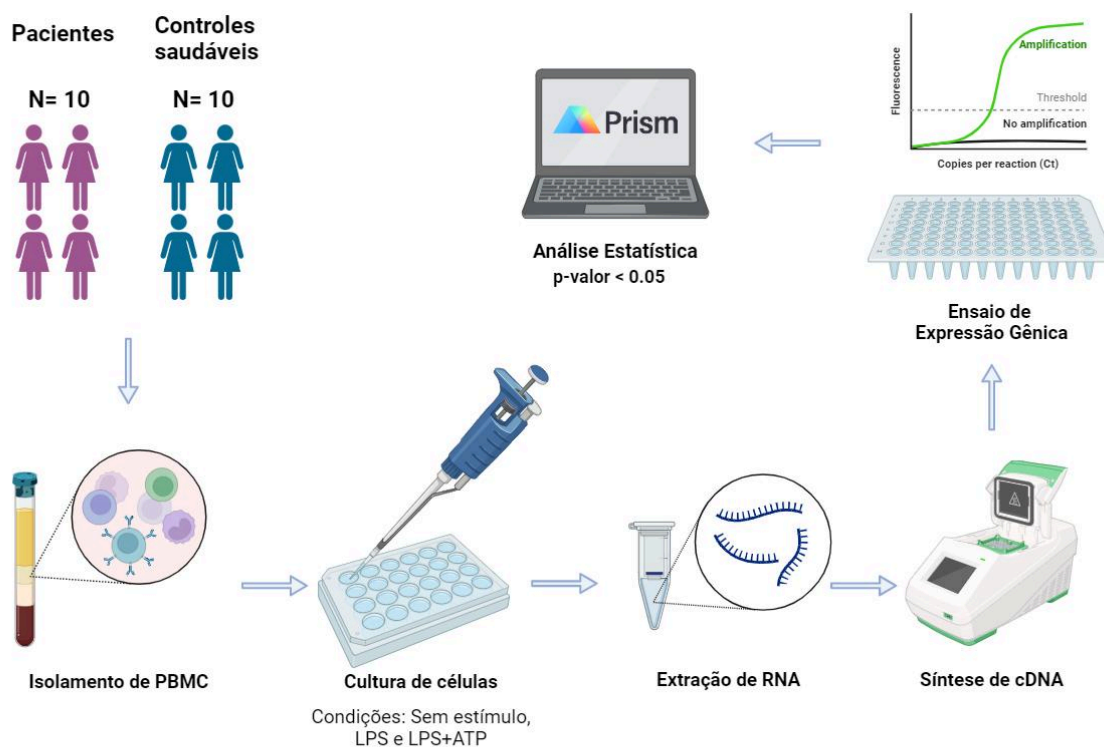
Os ensaios de expressão gênica foram feitos pelo método de PCR em tempo real em triplicata técnica utilizando sondas de expressão Taqman® no equipamento ABI 7500 (Thermo Fisher Scientific, Califórnia, EUA). O gene alvo foi o *MYD88* e os genes de referência foram *GAPDH* e *ACTB*. Utilizou-se do software geNorm para normalização dos genes de referência. A reação de PCR em tempo real foi ajustada para as seguintes condições: 95°C por 10 minutos, seguida de 95°C por 30 segundos e 60°C por um minuto e meio, esse ciclo se repete por 42 vezes. Após o ensaio de PCR em tempo real, os dados de CT (ciclo de threshold), número de ciclos necessário para detecção de fluorescência na amostra, foram organizados em planilhas do EXCEL 2016. Com a análise desses dados, a quantidade relativa (QR) do RNA mensageiro foi medida a partir das médias dos CTs. Já o fator de normalização (FN) foi calculado pela média geométrica das QRs dos genes de referência. Em seguida, para encontrar a quantidade relativa normalizada (QRN) de cada gene o QR foi dividido pelo FN. Por fim, esses valores foram utilizados para cálculo de Fold Change (FC), que representa o

valor de expressão de cada gene na amostra teste normalizado pelo valor das amostras do grupo controle.

4.5 Análise estatística

Para análise dos dados foi utilizado o software GraphPadPrism® versão 8.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Inicialmente, foram identificados e retirados os *outliers* (pontos fora da padrão) entre os dados. A análise de normalidade foi realizada a partir do teste Kolmogorov-Smirnov, os resultados positivos para normalidade foram estabelecidos como dados paramétricos e negativos como não paramétricos. A estatística descritiva foi feita com base na média e desvio padrão. Os resultados expressos em p foram obtidos através do teste T não pareado com correção de Welch para dados paramétricos e do teste Mann-Whitney para os dados não paramétricos. Valores com significância estatística foi considerado p-valor < 0.05 (Figura 10).

Figura 10: Metodologia aplicada na coleta, processamento e análise de dados



Fonte: elaborado pelo próprio autor pelo BioRender (2024)

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização clínica

O estudo foi realizado com 20 pessoas, sendo 10 pacientes e 10 controles saudáveis. A partir das informações clínicas dos pacientes, expostas na Tabela 2, foi verificado que o grupo de pacientes avaliado apresentou idade média de 16 anos, com desvio padrão de 1,05, e composto inteiramente por pessoas do sexo feminino. Além disso, a média de idade ao diagnóstico foi de $12,7 \pm 1,41$ anos. A respeito da atividade da doença, os pacientes foram divididos em dois grupos: atividade moderada e inatividade-atividade leve. Dentre os 10 pacientes do estudo, 30% dos pacientes se encontram em atividade moderada, 30% em atividade leve e 40% em inatividade.

Tabela 2: Características clínico-demográficas do grupo de estudo

Caraterística clínico-demográficas	Pacientes (n=10)	Controles saudáveis (n=10)
Idade; Média $\pm$ Desvio padrão	$16 \pm 1,05$	16 ± 0.75
Sexo; Feminino/Masculino	10/0 (100%/0%)	10/0 (100%/0%)
Idade ao diagnóstico; Média $\pm$ Desvio padrão	$12,7 \pm 1,41$	
Atividade moderada da doença; Sim / Não	3 / 7 (30%/70%)	

Fonte: elaborado pelo autor, 2024.

Dentre as 10 pacientes, 6 apresentaram alterações laboratoriais relatados, sendo eles: hipocomplementemia (20%), proteinúria (20%), hematúria (20%), aumento de DNA (20%), piúria (10%) e artrite (10%). Além disso, foi feita a descrição de cada paciente do grupo, evidenciando o SLEDAI, idade atual e idade ao diagnóstico de LESj (Tabela 3).

Tabela 3: Caracterização individual dos pacientes

	SLEDAI	Descrição do SLEDAI	Idade atual	Idade ao diagnóstico	Medicamentos
Paciente 1	8	Proteinúria e hematúria	15	12	Micofenolato, hidroxicloroquina, carbonato de cálcio + vitamina D, prednisona, losartana
Paciente 2	4	Proteinúria	17	13	Micofenolato, hidroxicloroquina, belimumabe, carbonato de cálcio + vitamina D, losartana e enalapril
Paciente 3	2	Hipocomplementemia	17	13	Micofenolato, hidroxicloroquina, carbonato de cálcio + vitamina D, losartana
Paciente 4	0	-	16	13	Micofenolato, carbonato de cálcio + vitamina D, losartana, enalapril, hidroclorotiazida
Paciente 5	0	-	15	12	Micofenolato, hidroxicloroquina, carbonato de cálcio + vitamina D, losartana
Paciente 6	10	Hematúria, piúria, aumento de DNA	17	16	Micofenolato, hidroxicloroquina, carbonato de cálcio + vitamina D, losartana
Paciente 7	0	-	16	11	Micofenolato, hidroxicloroquina
Paciente 8	6	Artrite e aumento de DNA	14	11	Metotrexato, hidroxicloroquina, carbonato de cálcio + vitamina D, enalapril
Paciente 9	2	Hipocomplementemia	16	13	Micofenolato, hidroxicloroquina, losartana, carbonato de cálcio + vitamina D
Paciente 10	0	-	17	13	Micofenolato, hidroxicloroquina, losartana, carbonato de cálcio + vitamina D, puran

Descrição de cada paciente, evidenciando SLEDAI, idade atual e idade ao diagnóstico. Fonte: elaborado pelo autor, 2024.

5.2 Análise de expressão do *MYD88*

Nas células sem estímulo, o gene *MYD88* está 2 vezes mais expresso no grupo de pacientes totais quando comparado ao grupo controle saudável (FC = 2.14), no entanto, não foi estatisticamente significativo ($p=0.1347$).

Nas células estimuladas com LPS, não houve diferença de expressão entre o grupo de pacientes totais e controles saudáveis, mas esse achado não alcançou significância estatística

(FC=1,2; $p=0,8148$). Da mesma forma, nas células estimuladas com LPS+ATP, não houve diferença de expressão entre os pacientes totais e controles saudáveis (FC=1,1; $p=0,8955$), e essa observação também não foi estatisticamente significativa. As diferenças de expressão entre o grupo de pacientes totais e controles saudáveis estão dispostas na figura 11.

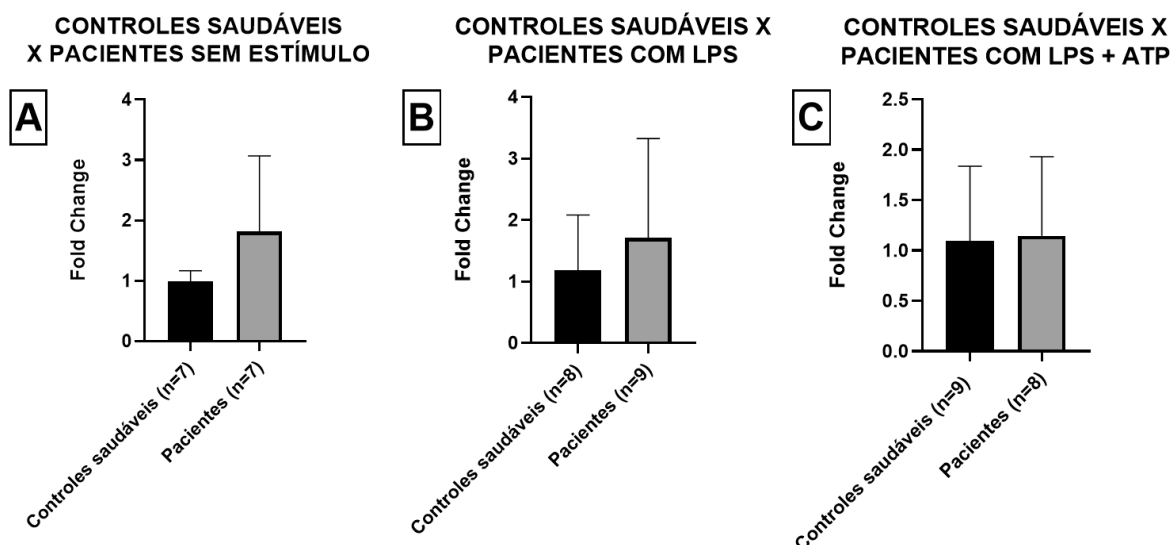
No contexto das células sem estímulo, foi analisado o grupo de pacientes com inatividade-atividade leve em comparação ao grupo controle. A expressão do gene *MYD88* foi 2 vezes maior nesse grupo quando comparados aos controles saudáveis (FC= 2.33; $p=0.0766$).

Na condição do estímulo de LPS, não houve diferença de expressão entre pacientes com inatividade-atividade leve e controles, mas o dado não foi estatisticamente significativo (FC= 1.36; $p=0.2999$).

Por último, nas células estimuladas com LPS+ATP, não houve diferença de expressão entre pacientes com inatividade-atividade leve e controles (FC=1.15; $p=0.4650$). Esse dado não apresentou significância estatística. As diferenças de expressão entre o grupo de pacientes inativos-atividade leve e controles saudáveis estão dispostas na Figura 12.

A relação de expressão entre pacientes com atividade moderada e controles, assim como entre pacientes com atividade moderada e com inatividade-atividade leve, não pôde ser realizada devido ao número reduzido de pacientes no grupo de atividade moderada ($n=3$), o que inviabilizou a realização de qualquer teste estatístico. Para futuras análises, seria necessário aumentar o tamanho da amostra para obter resultados significativos.

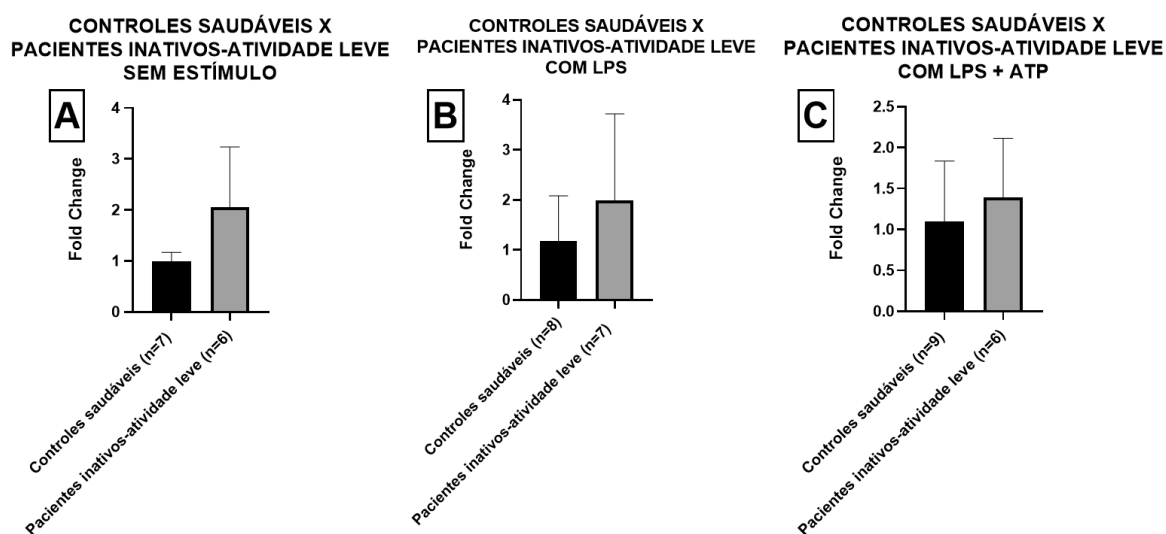
Figura 11: Expressão gênica relativa (Fold Change) do gene *MYD88* do grupo de pacientes totais e controles saudáveis



Os gráficos representam a diferença de expressão do *MYD88* em pacientes e controles saudáveis a partir de

diferentes estímulos *in vitro*. LPS= Lipossacarídeo; ATP= Adenosina trifosfato. A) Diferença de expressão entre controles saudáveis e pacientes nas células sem estímulo. B) Diferença de expressão entre controles saudáveis e pacientes nas células com estímulo de LPS. C) Diferença de expressão entre controles saudáveis e pacientes nas células com estímulo de LPS+ATP. Fonte: elaborado pelo próprio autor, 2024.

Figura 12: Expressão gênica relativa (Fold Change) do gene *MYD88* do grupo de pacientes inativos-atividade leve e controles saudáveis



Os gráficos representam a diferença de expressão do *MYD88* em pacientes inativos-atividade leve e controles saudáveis a partir de diferentes estímulos *in vitro*. LPS= Lipossacarídeo; ATP= Adenosina trifosfato. A) Diferença de expressão entre controles saudáveis e pacientes inativos-atividade leve nas células sem estímulo. B) Diferença de expressão entre controles saudáveis e pacientes inativos-atividade leve nas células com estímulo de LPS. C) Diferença de expressão entre controles saudáveis e pacientes inativos-atividade leve nas células com estímulo de LPS+ATP. Fonte: elaborado pelo próprio autor, 2024.

6 DISCUSSÃO

Dentre os dados clínicos dos pacientes, constatou-se que a faixa etária média foi de $16 \pm 1,05$ anos e que, em média, a idade ao início da doença foi de $12,7 \pm 1,41$ anos. O LESj acomete pacientes de diversas idades e um estudo feito por Ambrose (2016), no qual analisou 413 pacientes LESj, evidenciou uma idade média de 13 anos. Para Smith (2019), a idade do início da doença é, normalmente, aos 12,6 anos. Já segundo Olowu (2020), 10-17% dos pacientes com LESj manifestam a doença antes dos 16 anos.

Adolescentes com LESj apresentam algumas diferenças de pacientes mais novos, como títulos mais altos de anti-dsDNA, além de leucopenia, trombocitopenia e hipocomplementemia mais frequentes do que pacientes mais novos. Pacientes adolescentes tendem a apresentar um fenótipo mais clássico, parecido com o adulto (Charras, 2021).

Além da idade, optou-se analisar apenas pacientes do sexo feminino neste estudo, visando um grupo homogêneo de pacientes para análise. Essa escolha também se baseou em dados da literatura, os quais indicam uma predominância do sexo feminino no lúpus, com uma proporção conhecida de 4-5:1 (Schildt et al., 2021; Sestan et al., 2023).

Posteriormente, avaliou-se a expressão do gene *MYD88* nas células dos pacientes e dos controles saudáveis. Ao estudar as células sem estímulo, o estudo revelou que a expressão de *MYD88* nos pacientes foi maior em comparação ao grupo de controles saudáveis, mas sem significância estatística. Nas condições adicionais de estímulo com LPS e LPS+ATP, não foi observada diferença significativa na expressão entre o grupo de pacientes e os controles. Apesar da ausência de significância estatística em nossos dados, é importante ressaltar o papel relevante desempenhado por este gene no contexto do LES. Embora haja uma lacuna de estudos específicos avaliando o gene *MYD88* em LESj, já existem pesquisas que estabeleceram sua contribuição no LES adulto. Por exemplo, o estudo de Achek (2020) utilizou um peptídeo, o TIP3, para bloquear a via dependente de Myd88 do TLR4 em modelos de camundongos, resultando na redução dos sintomas inflamatórios e autoimunes nos modelos murinos com LES.

Da mesma forma, Zou (2020) sugeriu que o MyD88 fosse mais explorado como potencial alvo terapêutico em pacientes com LES. Seu grupo de estudo sintetizou um inibidor de MyD88, o TJ-M2010-5, na Universidade de Ciência e Tecnologia de Wuhan - China. Constatou-se que o uso desse inibidor prejudicou o desenvolvimento de células B, pois reduziu a ativação, proliferação e diferenciação celular, bem como a produção exacerbada de

autoanticorpos e citocinas inflamatórias *in vitro*. O mecanismo de inibição do MyD88 demonstrou, portanto, desempenhar um importante papel ao afetar as células B, que são um ponto chave da patogênese do LES. Concomitantemente, Tilstra (2020) evidenciou que a redução dos sintomas do LES em modelo murino foi observada após a deleção do gene *MYD88*. Essa redução de sintomas é atribuída ao papel do MyD88, TLR7 e TLR9 na produção de autoanticorpos pelas células B. Sabe-se que a sinalização via TLR7 resulta na produção de anti-Sm, enquanto a sinalização via TLR9 leva à produção de anti-dsDNA, os camundongos com a deleção do gene *MYD88* não apresentaram nenhum desses dois tipos de autoanticorpos. Assim, o estudo concluiu que o MyD88 apresenta papel importante na atividade das células B no LES.

O estudo de Teichmann (2013) sugeriu que a sinalização de MyD88 em células B e células dendríticas contribuem para a patogênese do lúpus, a partir de camundongos em modelo de Lúpus. Para esta pesquisa, foram empregadas técnicas genéticas que permitiram o bloqueio da expressão do gene *MYD88* (knockout) em células B, utilizando camundongos com o gene *MYD88* inativado, representados por “(-/-)”. Foi visto que em camundongos *MYD88* (-/-) não havia ANAs, enquanto em camundongos controles havia anti-dsDNA e anti-cromatina. A deleção do *MYD88* também amenizou as manifestações de nefrite lúpica.

Vale ressaltar que o MyD88 é uma proteína adaptadora dos TLRs, e já foi relacionado a outras doenças autoimunes. Um estudo de Kiripolsky (2020) ligou MyD88 à Síndrome de Sjögren, uma doença autoimune que afeta glândulas, evidenciando que camundongos com *MYD88* expresso apresentavam maior expressão de citocinas pró-inflamatórias nas glândulas salivares, comparados camundongos com *MYD88* knockout.

Com o objetivo de compreender a expressão do gene *MYD88* frente a estímulos de inflamação, as células, tanto do grupo de pacientes quanto do grupo de controle saudável, foram submetidas aos estímulos LPS e LPS+ATP. Os resultados não revelaram diferença de expressão entre eles. Entretanto, um estudo conduzido por Ciesielska, Matyjek e Kwiatkowska (2020) demonstrou que o uso do LPS pode sofrer algumas influências nesta via. Primeiramente, foi descrito que a duração da ligação entre o LPS e o TLR4 pode afetar o tempo de expressão da via de sinalização dependente de MyD88 e, conseqüentemente, ser refletido nos resultados de expressão gênica. Além disso, diversos fatores, como proteínas e enzimas, podem regular negativamente esta via de sinalização para prevenir uma produção exacerbada de mediadores pró-inflamatórios. Já a ativação das vias de sinalização de TLR por DAMPs, como o ATP, desempenha um papel importante em doenças autoimunes, como o

LES, a artrite reumatoide e a esclerodermia (Kiripolsky, 2020). Em indivíduos saudáveis, a ativação por DAMPs resulta em uma resposta inflamatória que media o reparo tecidual, porém, em indivíduos com autoimunidade, os DAMPs promovem uma ativação inapropriada das vias de resposta inflamatória e imune, contribuindo para sua cronificação (Kiripolsky, 2020). Portanto, destacamos que o tamanho da amostra em nosso estudo possivelmente não foi suficiente para evidenciar a diferença de expressão entre esses grupos, considerando que o *MYD88* pode ter sua atividade alterada em pacientes com LES.

Por último, para compreender se o SLEDAI pode interferir na expressão do *MYD88*, o grupo de pacientes foi dividido em atividade moderada e atividade leve e comparados com o controle saudável. Mediante isso, verificou-se que na condição sem estímulo, os pacientes com atividade leve apresentam maior expressão do gene *MYD88* quando comparado ao controle saudável. Mesmo não encontrando respaldo estatístico para tal informação, ressaltamos que isto pode ser promissor para compreender a influência deste gene na patogênese da doença. Segundo dados da literatura, pacientes na condição inativa podem apresentar alterações na expressão de genes importantes, tanto aumentando quanto diminuindo a expressão. São exemplos de genes afetados: *FYB*, *TACE*, *TNF RII*, *CD40*, *CD27*, entre outros, sendo esses relacionados à sinalização celular do sistema imune (Rus, 2004; Sandrin-Garcia, 2009). Assim, mesmo com a doença controlada, alguns genes podem permanecer em disfunção.

Por fim, é importante destacar algumas limitações do nosso estudo que podem ter influenciado nossos resultados: i) Devido à natureza rara da doença, o tamanho da nossa amostra foi reduzido; ii) Não foi possível obter uma distribuição equitativa entre pacientes com atividade moderada e com atividade leve, uma vez que os pacientes deste estudo recebem tratamento regular e estão sob acompanhamento médico, tornando incomum a presença de pacientes ativos no momento da coleta; iii) Foi necessário encontrar controles saudáveis na mesma faixa etária dos pacientes para evitar viés nos resultados. No entanto, houve responsáveis legais que não autorizaram a coleta de sangue desses indivíduos, dificultando a inclusão de um número maior de participantes no grupo controle. Assim, para estudos futuros, será necessário mitigar essas limitações.

7 CONCLUSÃO

1. Em relação aos dados clínicos-demográficos, verificou-se uma idade média de $16 \pm 1,05$ anos no grupo de 10 pacientes. E a média de idade ao diagnóstico foi de $13 \pm 1,41$. Além disso, o grupo de pacientes foi composto por 3 pessoas com LESj em atividade moderada (SLEDAI = 6-10) e 7 com inatividade a atividade leve (SLEDAI=0 e SLEDAI = 1- 5).
2. Na análise da expressão do gene *MYD88*, os pacientes com LESj apresentaram maior expressão de *MYD88* quando comparados ao grupo de controle saudável nas células sem estímulo, no entanto, os resultados não foram estatisticamente significativos.
3. Não observou-se diferenças de expressão nas células com os estímulos de LPS e LPS+ATP, entre o grupo de pacientes totais e indivíduos saudáveis, porém, esses dados não foram estatisticamente significativos.
4. Ao analisar pacientes inativos, a partir do SLEDAI, e compará-los aos controles saudáveis, os pacientes inativos com LESj apresentaram maior expressão de *MYD88* quando comparados ao grupo de controle saudável nas células sem estímulo, entretanto, os resultados não foram estatisticamente significativos.
5. Não foram observadas diferenças de expressão nas células com os estímulos de LPS e LPS+ATP entre pacientes inativos e os controles saudáveis, e tais dados não foram significativos estatisticamente.

REFERÊNCIAS

- ABAS, R. et al. The Evolving Role of Nucleotide-binding Oligomerisation Domain-like Receptor Pyrin Domain 3 Inflammasome Activation in Vascular Endothelial Cells: A Review. *Malaysian Journal of Medical Sciences*, v. 29, p. 8–17, 2022. DOI: 10.21315/mjms2022.29.2.2.
- ACHEK, A. et al. A peptide derived from the core β -sheet region of TIRAP decoys TLR4 and reduces inflammatory and autoimmune symptoms in murine models. *EBioMedicine*, v. 52, p. 102645–102645, 1 fev. 2020.
- AKIRA, S.; TAKEDA, K. Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews Immunology*, v. 4, 2004, p. 499-511.
- ALBERTO, C. et al. Incidence and clinical-laboratory aspects of systemic lupus erythematosus in a Southern brazilian city. *PubMed*, v. 51, n. 3, p. 231–9, 1 jun. 2011.
- ALURI, J.; COOPER, M. A.; SCHUETTPELZ, L. G. Toll-Like Receptor Signaling in the Establishment and Function of the Immune System. *Cells*, v. 10, p. 1374, 2021. DOI: 10.3390/cells10061374.
- AMANO, M. T. et al. Genetic analysis of complement C1s deficiency associated with systemic lupus erythematosus highlights alternative splicing of normal C1s gene. *Molecular Immunology*, v. 45, n. 6, p. 1693–1702, 1 mar. 2008.
- AMARANTE-MENDES, Gustavo P et al. Pattern Recognition Receptors and the Host Cell Death Molecular Machinery. *Frontiers in immunology*, 2018. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02379.
- AMBROSE, N. et al. Differences in disease phenotype and severity in SLE across age groups. *Lupus*, v. 25, n. 14, p. 1542–1550, 11 jul. 2016.
- ANVISA. Agência nacional de vigilância sanitária. Benlysta® (belimumabe):ampliação de uso. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/medicamentos/novos-medicamentos-e-indicacoes/benlysta-r-belimumabe-ampliacao-de-uso>>. Acesso em: 24 de ago. 2022.
- BAHÍLLO, M. P. et al. Incidence and prevalence of type 1 diabetes in children aged <15 yr in Castilla-Leon (Spain). *Pediatric Diabetes*, v. 8, p. 369–373, 2007.
- BERTSIAS, G. K. et al. Joint European League Against Rheumatism and European Renal Association–European Dialysis and Transplant Association (EULAR/ERA-EDTA) recommendations for the management of adult and paediatric lupus nephritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, v. 71, n. 11, p. 1771–1782, 31 jul. 2012. doi:10.1136/annrheumdis-2012-201940
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria conjunta nº 21, de 01 de novembro de 2021. Aprova Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas do Lúpus Eritematoso Sistêmico. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 01 de novembro de 2021. Seção 3: 3-9; Seção 7: 10-11.

BRAZA, F.; BROUARD, S.; CHADBAN, S.; GOLDSTEIN, D. R. Role of TLRs and DAMPs in allograft inflammation and transplant outcomes. *Nature Reviews Nephrology*, v. 12, 2016, p. 281-290.

BRUNNER, Hermine I et al. Safety and efficacy of intravenous belimumab in children with systemic lupus erythematosus: results from a randomised, placebo-controlled trial. *Annals of the Rheumatic Diseases*, v. 79, n. 10, p. 1340-1348, 2020. DOI: 10.1136/annrheumdis-2020-217101.

BOMBARDIER, C et al. Derivation of the sledai. A disease activity index for lupus patients. *Arthritis & Rheumatism*, 1992. DOI: 10.1002/art.1780350606.

BONNERT, T. P. et al. The cloning and characterization of human MyD88: a member of an IL-1 receptor related family 1 The nucleotide sequences reported in this paper have been submitted to the Genbank/EMBL Data Bank with accession numbers U84408 and U84409.1. *FEBS Letters*, v. 402, n. 1, p. 81–84, 3 fev. 1997.

CEN, X.; LIU, S.; CHENG, K. The Role of Toll-Like Receptor in Inflammation and Tumor Immunity. *Frontiers in Pharmacology*, v. 9, 6 ago. 2018.

CHANG, L-S et al. Diagnostic accuracy of the American College of Rheumatology-1997, the Systemic Lupus International Collaborating Clinics-2012, and the European League Against Rheumatism-2019 criteria for juvenile systemic lupus erythematosus: A systematic review and network meta-analysis. *Autoimmunity Reviews*, 2022. DOI: 10.1016/j.autrev.2022.103144.

CHENG, S et al. Evaluation of the 2019 EULAR/ACR classification criteria for systemic lupus erythematosus in children and adults. *Clin Rheumatol*, 2022. DOI: 10.1007/s10067-022-06293-x.

CHARRAS, A.; SMITH, E.; HEDRICH, C. M. Systemic Lupus Erythematosus in Children and Young People. *Current Rheumatology Reports*, v. 23, n. 3, 10 fev. 2021. doi: 10.1007/s11926-021-00985-0

CHAUDHARY, D.; ROBINSON, S.; ROMERO, D. L. Recent advances in the discovery of small molecule inhibitors of interleukin-1 receptor-associated kinase 4 (IRAK4) as a therapeutic target for inflammation and oncology disorders. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 58, 2015, p. 96-110.

CHEN, Lingfeng et al. Myeloid Differentiation Primary Response Protein 88 (MyD88): The Central Hub of TLR/IL-1R Signaling. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 63, n. 22, 2020, p. 13316-13329. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.0c00884.

CIESIELSKA, A.; MATYJEK, M.; KWIATKOWSKA, K. TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 78, n. 4, p. 1233–1261, 15 out. 2020.

DEGUINE, J.; BARTON, G. M. MyD88: a central player in innate immune signaling. *F1000Prime Reports*, v. 6, 2014, p. 97.

DELIZ-AGUIRRE, Rafael et al. MyD88 oligomer size functions as a physical threshold to trigger IL1R Myddosome signaling. *The Journal of Cell Biology*, v. 220, n. 7, 2021. DOI: 10.1083/jcb.202012071.

DENARDO, B. A. et al. Demography of a regional pediatric rheumatology patient population. Affiliated Children's Arthritis Centers of New England. *Journal of Rheumatology*, v. 21, p. 1553–1561, 1994.

EMAD, Y. et al. Antibodies to extractable nuclear antigens (ENAS) in systemic lupus erythematosus patients: correlations with clinical manifestations and disease activity. *Reumatismo*, 2018. DOI: 10.4081/reumatismo.2018.1027.

FAVA, A.; PETRI, M. Systemic lupus erythematosus: Diagnosis and clinical management. *Journal of Autoimmunity*, v. 96, n. 1, p. 1–13, jan. 2019.

FERREIRA, Juliana C. O. A.; TRINDADE, Vitor C.; ESPADA, Graciela; et al. Epidemiology and management practices for childhood-onset systemic lupus erythematosus patients: a survey in Latin America. *Clinical Rheumatology*, 2018. DOI: 10.1007/s10067-018-4254-4.

FREIHAT, L. A. et al. IRAK3 modulates downstream innate immune signalling through its guanylate cyclase activity. *Scientific Reports*, v. 9, p. 1-10, 2019. DOI: 10.1038/s41598-019-54110-3.

FUNAMI, K.; SASAI, M.; OHBA, Y.; OSHIUMI, H.; SEYA, T.; MATSUMOTO, M. Spatiotemporal mobilization of Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor molecule-1 in response to dsRNA. *Journal of Immunology*, v. 179, 2007, p. 6867-6872.

GAY, N. J.; SYMMONS, M. F.; GANGLOFF, M.; BRYANT, C. E. Assembly and localization of Toll-like receptor signalling complexes. *Nature Reviews Immunology*, v. 14, 2014, p. 546-558.

GEORGE, J.; MOTSHWENE, P. G.; WANG, H.; KUBARENKO, A. V.; RAUTANEN, A.; MILLS, T. C.; HILL, A. V.; GAY, N. J.; WEBER, A. N. Two human MYD88 variants, S34Y and R98C, interfere with MyD88-IRAK4-myddosome assembly. *Journal of Biological Chemistry*, v. 286, 2011, p. 1341-1353.

GLADMAN, D. D.; IBAÑEZ, D.; UROWITZ, M. B. Systemic lupus erythematosus disease activity index 2000. *The Journal of Rheumatology*, v. 29, n. 2, p. 288–291, 1 fev. 2002.

GONZÁLEZ, L. A. et al. Addressing health disparities as a function of ethnicity in systemic lupus erythematosus patients. *Lupus*, v. 31, n. 14, p. 1691–1705, 29 ago. 2022.

GORDON, C. et al. The British Society for Rheumatology guideline for the management of systemic lupus erythematosus in adults. *Rheumatology*, v. 57, n. 1, p. e1–e45, 6 out. 2017.

GUO, Xiuchen et al. MiR-525-5p inhibits diffuse large B cell lymphoma progression via the Myd88/NF-κB signaling pathway. *PeerJ*, v. 11, e16388, 6 Nov. 2023. DOI: 10.7717/peerj.16388.

HABIB, Nazia et al. Current Understanding of Asthma Pathogenesis and Biomarkers. *Cells*, v. 11, n. 17, 5 Sep. 2022. DOI: 10.3390/cells11172764.

HARDIMAN, G.; ROCK, F. L.; BALASUBRAMANIAN, S.; KASTELEIN, R. A.; BAZAN, J. F. Molecular characterization and modular analysis of human MyD88. *Oncogene*, v. 13, 1996, p. 2467-2475.

HARDIMAN, G. et al. Genetic Structure and Chromosomal Mapping of MyD88. *Genomics*, v. 45, n. 2, p. 332–339, out. 1997.

HARLEY, I. T. W. 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, 1 maio 2009

HARRY, Onengiya; YASIN, Shima; BRUNNER, Hermine. Childhood-Onset Systemic Lupus Erythematosus: A Review and Update. *The Journal of Pediatrics*, v. 196, p. 22–30.e2, 2018. DOI: 10.1016/j.jpeds.2018.01.045.

HEDRICH, C. M.; SMITH, E. M. D.; BERESFORD, M. W. Juvenile-onset systemic lupus erythematosus (jSLE) – Pathophysiological concepts and treatment options. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, v. 31, n. 4, p. 488–504, ago. 2017.

HIRAKI, L. T. et al. Ethnic differences in pediatric systemic lupus erythematosus. *Journal of Rheumatology*, v. 36, p. 2539–2546, 2009.

HOUGHTON, K. M. et al. Systemic lupus erythematosus in the pediatric North American Native population of British Columbia. *Journal of Rheumatology*, v. 33, p. 161–163, 2006.

HUANG, J. L.; YAO, T. C.; SEE, L. C. Prevalence of pediatric systemic lupus erythematosus and juvenile chronic arthritis in a Chinese population: a nationwide prospective population-based study in Taiwan. *Clinical and Experimental Rheumatology*, v. 22, p. 776–780, 2004.

HUEMER, C. et al. Incidence of pediatric rheumatic diseases in a regional population in Austria. *Journal of Rheumatology*, v. 28, p. 2116–2119, 2001.

JANEWAY, C. A. Jr. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 1989. DOI: 10.1101/SQB.1989.054.01.003.

JANSSENS, S.; BEYAERT, R. A universal role for MyD88 in TLR/IL-1R-mediated signaling. *Trends in Biochemical Sciences*, v. 27, 2002, p. 474-482.

KAIPAINEN-SEPPÄNEN, O.; SAVOLAINEN, A. Incidence of chronic juvenile rheumatic diseases in Finland during 1980–1990. *Clinical and Experimental Rheumatology*, v. 14, p. 441–444, 1996.

KAMPHUIS, Sylvia; SILVERMAN, Earl D. Prevalence and burden of pediatric-onset systemic lupus erythematosus. *Nature Reviews. Rheumatology*, v. 6, n. 9, 2010. DOI: 10.1038/nrrheum.2010.121.

KIRIPOLSKY, J. et al. Myd88 is required for disease development in a primary Sjögren's syndrome mouse model. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 102, n. 6, p. 1411–1420, 26 set. 2017.

KIRIPOLSKY, J. et al. Activation of Myd88-Dependent TLRs Mediates Local and Systemic Inflammation in a Mouse Model of Primary Sjögren's Syndrome. *Frontiers in Immunology*, v. 10, 9 jan. 2020.

KISSNER, T. L.; RUTHEL, G.; CISNEY, E. D.; ULRICH, R. G.; FERNANDEZ, S.; SAIKH, K. U. MyD88-dependent pro-inflammatory cytokine response contributes to lethal toxicity of staphylococcal enterotoxin B in mice. *Innate Immun*, v. 17, 2011, p. 451-462.

LAI, N-S et al. A Comparison of the Correlation of Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index 2000 (SLEDAI-2K) and Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Score (SLE-DAS) with Health-Related Quality of Life. *JCM*, 2021, v. 10, p. 2137. doi: 10.3390/jcm10102137.

LECH, M.; ANDERS, H.-J. The Pathogenesis of Lupus Nephritis. *Journal of the American Society of Nephrology*, v. 24, n. 9, p. 1357–1366, 8 ago. 2013.

LI, Z-J et al. Characteristics of childhood-onset systemic lupus erythematosus in pregnancy and its association with pregnancy outcomes: a retrospective comparative cohort study. *Reprod Biol Endocrinol*, 2022. DOI: 10.1186/s12958-022-00954-x.

LINNIK, M. D. et al. Relationship between anti-double-stranded DNA antibodies and exacerbation of renal disease in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, 2005. DOI: 10.1002/art.20980.

LOIARRO, M. et al. Mutational Analysis Identifies Residues Crucial for Homodimerization of Myeloid Differentiation Factor 88 (MyD88) and for Its Function in Immune Cells. *Journal of Biological Chemistry*, v. 288, n. 42, p. 30210–30222, 9 set. 2013.

LORD, K. A.; HOFFMAN-LIEBERMANN, B.; LIEBERMANN, D. A. Nucleotide sequence and expression of a cDNA encoding MyD88, a novel myeloid differentiation primary response gene induced by IL6. *Oncogene*, v. 5, 1990, p. 1095-1097.

LUO, F.; YE, Q.; SHEN, J. Systemic lupus erythematosus with trisomy X: a case report and review of the literature. *Journal of Medical Case Reports*, v. 16, n. 1, 19 jul. 2022. DOI: 10.1186/s13256-022-03478-5.

LYTHGOE, H et al. Evaluation of the ACR and SLICC classification criteria in juvenile-onset systemic lupus erythematosus: a longitudinal analysis. *Lupus*, 2017. DOI: 10.1177/0961203317700484.

MALLESON, P. N.; FUNG, M. Y.; ROSENBERG, A. M. The incidence of pediatric rheumatic diseases: results from the Canadian Pediatric Rheumatology Association Disease Registry. *Journal of Rheumatology*, v. 23, p. 1981–1987, 1996.

MASSIAS, J. S.; SMITH, E. M. D.; AL-ABADI, E.; et al. Clinical and laboratory characteristics in juvenile-onset systemic lupus erythematosus across age groups. *Lupus*, v. 29, 2020, p. 474-481. DOI: 10.1177/0961203320909156.

MIRANDA-HERNANDEZ, S.; GERLACH, N.; FLETCHER, J. M.; BIROS, E.; MACK, M.; KORNER, H.; BAXTER, A. G. Role for MyD88, TLR2 and TLR9 but not TLR1, TLR4 or TLR6 in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Immunology*, v. 187, 2011, p. 791-804.

MUSSARI, C. P. et al. Discovery of Potent and Orally Bioavailable Small Molecule Antagonists of Toll-like Receptors 7/8/9 (TLR7/8/9). *ACS Medicinal Chemistry Letters*, v. 11, n. 9, p. 1751–1758, 29 jul. 2020.

MUZNY, D. M. et al. The DNA sequence, annotation and analysis of human chromosome 3. *Nature*, v. 440, n. 7088, p. 1194–1198, abr. 2006.

NGUYEN, T. H. et al. Analysis of interleukin-1 receptor-associated kinase-3 (IRAK3) function in modulating expression of inflammatory markers in cell culture models: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*, v. 15, p. 1-24, 2020. DOI: 10.1371/journal.pone.0231762.

OLOWU, Wasio. Childhood-Onset Systemic Lupus Erythematosus. Definitions, 2 fev. 2020.

O'NEILL, L. A.; BOWIE, A. G. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews Immunology*, v. 7, 2007, p. 353-364.

O'NEILL, L. A.; GREENE, C. Signal transduction pathways activated by the IL-1 receptor family: ancient signaling machinery in mammals, insects, and plants. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 63, 1998, p. 650-657.

OTA, T. et al. Complete sequencing and characterization of 21,243 full-length human cDNAs. *Nature Genetics*, v. 36, n. 1, p. 40–45, 21 dez. 2003.

PAN, Lu et al. Childhood-onset systemic lupus erythematosus: characteristics and the prospect of glucocorticoid pulse therapy. *Frontiers in Immunology*, v. 14, p. 1128754, 10 Aug. 2023. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1128754.

PESCHKEN, C. A. et al. The 1,000 Canadian faces of lupus: determinants of disease outcome in a large multiethnic cohort. *Journal of Rheumatology*, v. 36, p. 1200–1208, 2009.

PESCHKEN, C. A. Health Disparities in Systemic Lupus Erythematosus. *Rheumatic Disease Clinics of North America*, set. 2020.

PETRI, Michelle et al. Derivation and validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Arthritis and Rheumatism*, v. 64, n. 8, 2012, p. 2677-2686. DOI: 10.1002/art.34473.

PHAN, T. G.; WONG, R. C. W.; ADELSTEIN, S. Autoantibodies to Extractable Nuclear Antigens: Making Detection and Interpretation More Meaningful. *Clin Vaccine Immunol*, 2002. DOI: 10.1128/CDLI.9.1.1-7.2002.

PICARD, C.; CASANOVA, J. L.; PUEL, A. Infectious diseases in patients with IRAK-4, MyD88, NEMO, or IkappaBalpha deficiency. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 24, 2011, p. 490-497.

PINHEIRO, S. V. B. et al. Pediatric lupus nephritis. *Brazilian Journal of Nephrology*, v. 41, n. 2, p. 252–265, jun. 2019. doi:10.1590/2175-8239-JBN-2018-0097.

PONGSAWAT RODSAWARD et al. The clinical significance of antinuclear antibodies and specific autoantibodies in juvenile and adult systemic lupus erythematosus patients. *Asian Pac J Allergy Immunol*, 2022. DOI: 10.12932/AP-211218-0465.

PONTILLO, A. et al. Inflammasome polymorphisms in juvenile systemic lupus erythematosus. *PubMed*, v. 48, n. 7, p. 434–7, 1 jan. 2015.

RAVELLI, A.; RUPERTO, N.; MARTINI, A. Outcome in juvenile onset systemic lupus erythematosus. *Current Opinion in Rheumatology*, v. 17, p. 568–573, 2005.

REES, F. 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, 9 ago. 2017.

REKVIG, O. P. The anti-DNA antibody: origin and impact, dogmas and controversies. *Nat Rev Rheumatol*, 2015. DOI: 10.1038/nrrheum.2015.69.

RODRIGUES, D. D.; DO NASCIMENTO, E. C.; CARVALHO, L. L.; SILVA, R. S. Diagnóstico clínico e laboratorial do lúpus eritematoso sistêmico. *Revista Patologia Tocantins*, v. 4, 2017, p. 15-20. DOI: 10.20873/uft.2446-6492.2017v4n2p15.

RUS, V. et al. Gene expression profiling in peripheral blood mononuclear cells from lupus patients with active and inactive disease. *Clinical Immunology*, v. 112, n. 3, p. 231–234, set. 2004.

SANDRIN-GARCIA, P. et al. Shared and Unique Gene Expression in Systemic Lupus Erythematosus Depending on Disease Activity. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1173, n. 1, p. 493–500, 1 set. 2009.

SCHILDT, E.; SESSIONS, K. L.; DE RANIERI, D. Juvenile Systemic Lupus Erythematosus Presenting with Esophagitis and Severe Oral Mucositis. *Case Reports in Rheumatology*, 2021, p. 1–4. DOI: 10.1155/2021/5868655.

SESTAN, M.; KIFER, N.; ARSOV, T.; et al. The Role of Genetic Risk Factors in Pathogenesis of Childhood-Onset Systemic Lupus Erythematosus. *Current Issues in Molecular Biology*, v. 45, n. 7, 2023, p. 5981-6002. DOI: 10.3390/cimb45070378. PMID: 37504294; PMCID: PMC10378459.

SMITH, E. M. D. et al. Juvenile-onset systemic lupus erythematosus: Update on clinical presentation, pathophysiology and treatment options. *Clinical Immunology*, v. 209, p. 108274, dez. 2019.

TAKEUCHI, O.; TAKEDA, K.; HOSHINO, K.; ADACHI, O.; OGAWA, T.; AKIRA, S. Cellular responses to bacterial cell wall components are mediated through MyD88-dependent signaling cascades. *International Immunology*, v. 12, 2000, p. 113-117.

TANAKA, Y. State-of-the-art treatment of systemic lupus erythematosus. *International Journal of Rheumatic Diseases*, v. 23, n. 4, p. 465–471, 5 mar. 2020. doi: 10.1111/1756-185X.13817

TARVIN, S. E.; O'NEIL, K. M. Systemic Lupus Erythematosus, Sjögren Syndrome, and Mixed Connective Tissue Disease in Children and Adolescents. *Pediatric Clinics of North America*, v. 65, n. 4, 2018, p. 711-737. DOI: 10.1016/j.pcl.2018.04.001.

TEICHMANN, LINO L. et al. Signals via the Adaptor MyD88 in B Cells and DCs Make Distinct and Synergistic Contributions to Immune Activation and Tissue Damage in Lupus. *Immunity*, v. 38, n. 3, p. 528–540, mar. 2013.

TILSTRA, J. S. et al. B cell–intrinsic TLR9 expression is protective in murine lupus. *Journal of Clinical Investigation*, v. 130, n. 6, p. 3172–3187, 11 maio 2020.

TRINDADE, V. C. et al. An Update on the Management of Childhood-Onset Systemic Lupus Erythematosus. *Pediatric Drugs*, v. 23, n. 4, p. 331–347, jul. 2021. doi:10.1007/s40272-021-00457-z

VACHVANICHSANONG, P.; DISSANEEWATE, P.; MCNEIL, E. Diffuse proliferative glomerulonephritis does not determine the worst outcome in childhood-onset lupus nephritis: a 23-year experience in a single centre. *Nephrology Dialysis Transplantation*, v. 24, p. 2729–2734, 2009.

VAGLIO, Augusto et al. Drug-induced lupus: Traditional and new concepts. *Autoimmunity reviews*, 2018. DOI: 10.1016/j.autrev.2018.03.016.

VILAR, M. J. P.; SATO, E. I. Estimating the incidence of systemic lupus erythematosus in a tropical region (Natal, Brazil). *Lupus*, v. 11, n. 8, p. 528–532, ago. 2002. DOI: 10.1191/0961203302lu244xx.

VON BERNUTH, H.; PICARD, C.; JIN, Z.; PANKLA, R.; XIAO, H.; KU, C. L.; CHRABIEH, M.; MUSTAPHA, I. B.; GHANDIL, P.; CAMCIOGLU, Y.; VASCONCELOS, J.; SIRVENT, N.; GUEDES, M.; VITOR, A. B.; HERRERO-MATA, M. J.; AROSTEGUI, J. I.; RODRIGO, C.; ALSINA, L.; RUIZ-ORTIZ, E.; JUAN, M.; FORTUNY, C.; YAGUE, J.; ANTON, J.; PASCAL, M.; CHANG, H. H.; JANNIERE, L.; ROSE, Y.; GARTY, B. Z.; CHAPEL, H.; ISSEKUTZ, A.; MARODI, L.; RODRIGUEZ-GALLEGU, C.; BANCHEREAU, J.; ABEL, L.; LI, X.; CHAUSSABEL, D.; PUEL, A.; CASANOVA, J. L. Pyogenic bacterial infections in humans with MyD88 deficiency. *Science*, v. 321, 2008, p. 691-696.

WEBBER, D. et al. Association of systemic lupus erythematosus (SLE) genetic susceptibility loci with lupus nephritis in childhood-onset and adult-onset SLE. *Rheumatology*, v. 59, n. 1, p. 90–98, 24 jun. 2019.

XU, Y.; TAO, X.; SHEN, B.; HORNG, T.; MEDZHITOV, R.; MANLEY, J. L.; TONG, L. Structural basis for signal transduction by the Toll/interleukin-1 receptor domains. *Nature*, v. 408, 2000, p. 111-115.

ZHANG, Y. et al. NLRP3 Inflammasome: Checkpoint Connecting Innate and Adaptive Immunity in Autoimmune Diseases. *Frontiers in Immunology*, v. 12, 11 out. 2021.

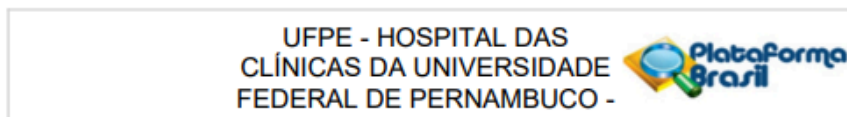
ZIMMERMANN, A. F. Lupus eritematoso sistêmico: perfil demográfico, clínico e auto-imune de 90 pacientes do Sul do Brasil. 1997. Disponível em: <http://educapes.capes.gov.br/handle/1884/41984>

ZOU, Z. et al. TJ-M2010-5, a novel MyD88 inhibitor, corrects R848-induced lupus-like immune disorders of B cells in vitro. *International Immunopharmacology*, v. 85, p. 106648, ago. 2020.

ANEXOS

ANEXO A

Cópia do parecer do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE



Continuação do Parecer: 3.040.585

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Outros	CARTA_RESPOSTA__LESj.docx	19/10/2018 15:00:01	PAULA SANDRIN GARCIA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Lupus_Juvenil_2018.docx	19/10/2018 14:59:05	PAULA SANDRIN GARCIA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TALE_LES_juvenil.docx	28/08/2018 10:25:58	PAULA SANDRIN GARCIA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_LES_juvenil.docx	28/08/2018 10:25:37	PAULA SANDRIN GARCIA	Aceito
Outros	confidencialidade_CEP_LES_juvenil.pdf	15/08/2018 15:51:31	PAULA SANDRIN GARCIA	Aceito
Outros	Lattes_Andre_Cavalcanti.docx	07/08/2018 14:17:16	PAULA SANDRIN GARCIA	Aceito
Outros	Lattes_Denise_Nascimento.docx	07/08/2018 14:16:51	PAULA SANDRIN GARCIA	Aceito
Outros	Lattes_Suelen_Lima.docx	07/08/2018 14:16:05	PAULA SANDRIN GARCIA	Aceito
Outros	Lattes_Paula_Sandrin.docx	07/08/2018 14:15:35	PAULA SANDRIN GARCIA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RECIFE, 27 de Novembro de 2018

Assinado por:
José Ângelo Rizzo
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Professor Moraes Rego, S/N, 3º andar do prédio principal (enfermarias)
Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.670-901
UF: PE Município: RECIFE
Telefone: (81)2126-3743 E-mail: cep@ufpe@gmail.com