

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR, EMBRIOLOGIA E
GENÉTICA

Manuela Nunes Drehmer

**MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DO FATOR DE
ATIVAÇÃO DE CÉLULAS B (BAFF) POR HORMÔNIOS
FEMININOS EM CÉLULAS DO SISTEMA IMUNITÁRIO
HUMANO**

Trabalho de Conclusão de Curso
submetido ao Centro de Ciências
Biológicas da Universidade Federal de
Santa Catarina para a obtenção do
Grau de Bacharel em Ciências
Biológicas.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª Sara Emelie
Löfgren

Florianópolis
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Nunes Drehmer, Manuela

Modulação da expressão gênica do fator de ativação
de células B (BAFF) por hormônios femininos em
células do sistema imunitário humano / Manuela
Nunes Drehmer ; orientadora, Sara Emelie Løfgren,
2017.

78 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de
Ciências Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas,
Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Ciências Biológicas. 2. Doença autoimune. 3.
estradiol. 4. progesterona. 5. imunogenética. I.
Løfgren, Sara Emelie . II. Universidade Federal de
Santa Catarina. Graduação em Ciências Biológicas.
III. Título.

Manuela Nunes Drehmer

**MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DO FATOR DE
ATIVACÃO DE CÉLULAS B (BAFF) POR HORMÔNIOS
FEMININOS EM CÉLULAS DO SISTEMA IMUNITÁRIO
HUMANO**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas e aprovado em sua forma final pelo Centro de Ciências Biológicas.

Florianópolis, 27 de junho de 2017.

Prof. Dr. Carlos Roberto Zanetti
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof.^a Dr.^a Sara Emelie Löfgren
Orientadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Dr.^a Yara Costa Netto Muniz
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof., Dr. Geison Souza Izídio
Universidade Federal de Santa Catarina

Emily Bruna Justino, Msc
Universidade Federal de Santa Catarina

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal de Santa Catarina, onde pude fazer minha graduação em Ciências Biológicas e que me ofereceu inúmeras oportunidades durante estes cinco anos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo a Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC), órgãos financiadores dos projetos realizados no laboratório.

Agradeço à minha orientadora Prof^ª. Dr^ª. Sara Emelie Löfgren pelo constante ensino, atenção, paciência, confiança e orientação durante esses anos de iniciação científica no LAPOGE.

A todos os integrantes e ex-integrantes do LAPOGE, que me acolheram e auxiliaram nesses anos, oferecendo oportunidades de aprendizado no mundo científico e crescimento profissional, além de me ensinarem a trabalhar em grupo.

A todo o corpo técnico do LAMEB pela vontade e disposição em ajudar nas pesquisas e trabalhos.

Aos sujeitos de pesquisa, que contribuírem com a realização da pesquisa.

À banca avaliadora, Prof.^a Dr.^a Yara Costa Netto Muniz, Prof., Dr. Geison Souza Izídio e a Mestre Emily Bruna Justino pela disponibilidade de poder avaliar esse trabalho. Agradeço por poder apresentar esse trabalho para profissionais que tanto admiro.

Aos meus amigos de vida e da graduação que fazem parte desta minha trajetória e do meu crescimento como pessoa, os quais permaneceram ao meu lado e transformaram fases difíceis em momentos de alegria e me estimularam durante o curso. Aos amigos que, mesmo distantes por conta da correria do dia a dia, mantiveram sua amizade sincera e acolhedora.

Aos professores da UFSC, que puderam transmitir vários conhecimentos e por proporcionar a aquisição de visões de mundo diferentes, ensinando a respeitar todas as formas de vida e por instigarem minha admiração por essa área da ciência.

E, principalmente, a minha família, que possuem a arte de amar incondicionalmente e são meu porto seguro. Que me deram suporte e educaram, transmitindo os mais valiosos saberes. Que compartilharam comigo cada vitória e cada derrota, que acreditaram em mim e me fizeram acreditar que sou capaz de realizar os meus sonhos.

A todos aqueles que contribuíram e contribuem para que a conclusão deste trabalho se tornasse possível e que, de alguma forma, participaram da minha formação como pessoa e bióloga. Muito obrigada!

RESUMO

Um dos principais fatores de risco para várias doenças autoimunes é o sexo feminino. Atualmente, muita consideração se tem dado ao envolvimento dos hormônios femininos na sua etiologia. O fator de ativação das células B (BAFF) é um fator chave na sobrevivência e maturação de células B e é sabidamente superexpresso em diversos pacientes com doença autoimune, embora o mecanismo por trás desta alteração não esteja esclarecido. Em modelos murinos, a expressão de BAFF pode ser regulada positivamente pelo tratamento exógeno com estrógeno em esplenócitos; no entanto, nenhuma evidência dessa relação estava disponível em seres humanos. Neste estudo, leucócitos de indivíduos homens e mulheres saudáveis foram recolhidos e cultivados na presença ou ausência de estrógeno ou progesterona. A expressão do gene *TNFSF13B* que codifica o fator BAFF foi determinada por PCR quantitativo e comparada entre o grupo de células tratado e não tratado. Na presença de estrógeno, a expressão de BAFF foi aumentada em mais de cinco vezes em ambos os sexos. Quando expostas a progesterona, as células de origem feminina apresentaram expressão aumentada, enquanto as células de origem masculina tiveram uma redução significativa na expressão de BAFF. Nossos resultados sugerem que os hormônios femininos podem modular a expressão de BAFF, uma citocina chave nas vias autoimunes, em células imunitárias humanas. Estes dados podem contribuir para a compreensão da etiologia, bem como o viés sexual característico de várias doenças autoimunes.

Palavras-chave: Doença autoimune, estradiol, progesterona, imunogenética.

ABSTRACT

Among several autoimmune diseases, one of the main risk factor is the female gender, and much consideration has been given to the involvement of female hormones in their etiology. B-cell activating factor (BAFF) is a key factor in survival and maturation of B cells and is overexpressed in several autoimmune patients although the mechanism behind this feature is unclear. In murine models, BAFF expression could be upregulated by exogenous estrogen treatment in splenocytes; however, no evidence of this relationship was available in humans. In this study, leukocytes from healthy male and females were collected and cultivated in the presence or absence of estrogen or progesterone. BAFF gene expression was accessed by quantitative PCR and compared between treated and untreated group of cells. In the presence of estrogen, BAFF expression was upregulated by more than 5 times in both genders. When exposed to progesterone, the female-originated cells showed increased expression, while the cells of male origin a significant down- regulation of BAFF. Our results suggest that female hormones can modulate the expression of BAFF, a key cytokine in autoimmune pathways, in human immune cells. These data might contribute to the understanding of the etiology as well as the gender bias featured by several autoimmune disorders.

Keywords: Autoimmune disease, estradiol, progesterone, immunogenetics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principais classes de linfócitos e suas funções na imunidade adaptativa.	20
Figura 2. Inflamação mediada por autoanticorpos que causam lesões teciduais as quais podem acarretar no desenvolvimento de doenças autoimunes.	24
Figura 3. Fatores etiológicos envolvidos na patogênese de Lúpus Eritematoso Sistêmico.	30
Figura 4. Modelo que retrata o envolvimento de BAFF na tolerância imune periférica.	38
Figura 5. Modelo de placa para cultura de células fabricada em poliestireno Livre de <i>DNase/RNase</i>	49
Figura 6. Níveis normalizados da expressão relativa da molécula de mRNA do gene <i>TNFSF13B</i> (BAFF).	55
Figura 7. Níveis de expressão relativa do mRNA do gene <i>TNFSF13B</i> (BAFF) após 36h do grupo de células não estimuladas (CTRL) e após tratamento com 0,1 μ M de Estradiol (E2).	56
Figura 8. Níveis de expressão relativa do mRNA do gene <i>TNFSF13B</i> (BAFF) após 36h do grupo de células não estimuladas (controle) e após tratamento com 0,1 ou 1 μ M de progesterona (PG).	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Critérios <i>do American College of Rheumatology</i> para o diagnóstico de Lúpus Eritematoso Sistêmico.	29
Tabela 2. Reagentes do kit <i>High Capacity cDNA Reverse Transcription</i> utilizados na preparação do Master Mix.	51
Tabela 3. Programa de ciclagem da RT-PCR.	51
Tabela 4. Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores (<i>primers</i>) utilizados na qPCR para o gene <i>TNFSF13B</i> que codifica a citocina BAFF.	52
Tabela 5. Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores (<i>primers</i>) utilizados na qPCR para o gene de referência TBP.	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BAFF	Fator de Ativação de Células B
BCR	Receptor de Células B
cDNA	DNA complementar
CEPSH	Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
E2	Estradiol
ER	Receptor de Estrógeno
ERE	Elemento Responsivo de Estrógeno
IFN	do inglês <i>Interferon</i>
iPR	Receptor de Progesterona Intracelular
LAPOGE	Laboratório de Polimorfismos Genéticos
LES	Lúpus Eritematoso Sistêmico
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
mPR	Receptor de Membrana de Progesterona
NF-κB	Fator Nuclear kappa B
NK	do inglês <i>Natural Killer</i>
PG	Progesterona
PR	Receptor de Progesterona
PRRs	Receptores de Reconhecimento de Padrões
RT-PCR	Transcrição reversa seguida de PCR convencional
TCR	Receptor de Células T
Th	<i>T-helper</i>
TNF	Fator de Necrose Tumoral
Treg	T regulatórios
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	SISTEMA IMUNOLÓGICO	19
1.2	TOLERÂNCIA IMUNOLÓGICA E AUTOIMUNIDADE ..	21
1.3	DOENÇAS AUTOIMUNES	23
1.4	LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO	25
1.4.1	Considerações gerais	25
1.4.2	Patogênese de LES	26
1.4.3	Manifestações Clínicas	27
1.4.4	Etiologia de LES	30
1.4.4.1	Fatores Ambientais	31
1.4.4.2	Fatores Hormonais	31
1.4.4.2.1	<i>Progesterona</i>	33
1.4.4.2.2	<i>Estrógenos</i>	34
1.4.4.3	Fatores Genéticos	36
1.5	GENE <i>TNFSF13B</i> E SEU CONTEXTO GENÔMICO	36
1.5.1	BAFF e Regulação Imune	37
2	JUSTIFICATIVA	41
3	Hipótese	43
4	OBJETIVOS	45
4.1	OBJETIVO GERAL	45
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	45
5	MATERIAL E MÉTODOS	47
5.1	ASPECTOS ÉTICOS	47
5.2	CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS	47
5.3	PROCESSAMENTO DO MATERIAL BIOLÓGICO	47
5.4	CULTURA CELULAR DE LEUCÓCITOS	48
5.5	EXTRAÇÃO E ISOLAMENTO DO RNA	50
5.6	SÍNTESE DE cDNA (DNA COMPLEMENTAR)	50
5.7	AMPLIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS POR qPCR	52
5.8	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	54
5.9	ANÁLISE DA SEQUÊNCIA GÊNICA DE <i>TNFSF13B</i> PARA O ELEMENTO RESPONSIVO DE ESTRÓGENO	54
6	RESULTADOS	55
7	DISCUSSÃO	59
8	PRINCIPAIS RESULTADOS	63
9	CONCLUSÃO	65
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

APÊNDICE A – Artigo científico referente ao presente trabalho publicado na revista científica *Biochemical Genetics* 77
APÊNDICE B – Artigo científico relacionado ao tema do trabalho, publicado na revista científica *Lupus* 78

1 INTRODUÇÃO

1.1 SISTEMA IMUNOLÓGICO

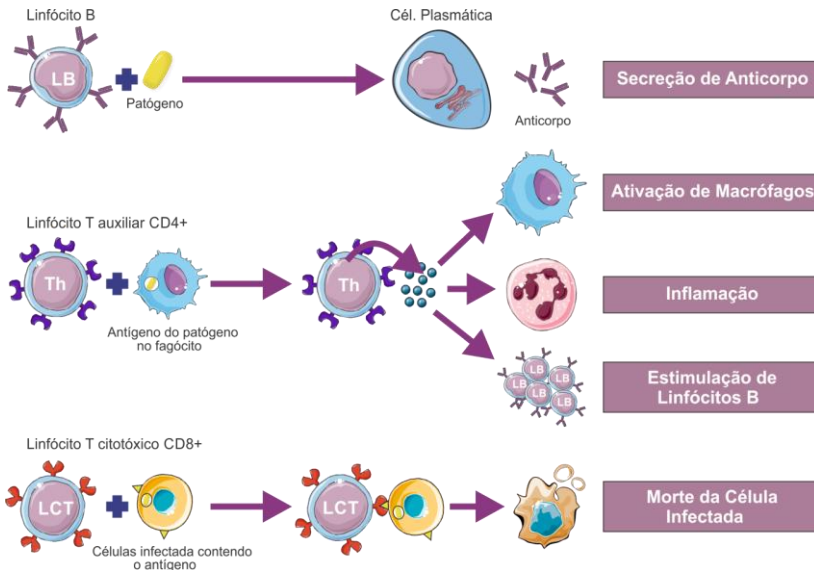
O sistema imunológico é constituído por uma rede complexa de células e moléculas, que estão distribuídas por todo o organismo. Este sistema tem como função primordial a defesa contra infecções e transformações malignas de células, através da neutralização de uma ampla variedade de microrganismos patogénicos ou de células anormais (LETTRE; RIOUX, 2008; MARTÍNEZ; ALVAREZ-MON, 1999). Esta tarefa ocorre devido à sua capacidade de reconhecer, especificamente, determinadas estruturas moleculares, ou antígenos, e de desenvolver uma resposta imune que resulta na eliminação ou inativação destes agentes patogénicos (MARTÍNEZ; ALVAREZ-MON, 1999).

A resposta imunológica em vertebrados pode ser dividida em imunidade inata e adaptativa. Na primeira, geralmente há uma resposta imediata e inespecífica contra agentes infecciosos (GREGERSEN; BEHRENS, 2006). É representada por barreiras físicas, químicas e biológicas. A imunidade inata identifica agentes nocivos que induzem um processo inflamatório, com o objetivo de impedir a sua difusão e ativar a imunidade adaptativa. As principais células efetoras do sistema imune inato são os macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e células NK (células exterminadoras naturais, do inglês *Natural Killer Cell*) (CRUVINEL et al., 2008; DORIA et al., 2012; SOUZA et al., 2010). Através de uma variedade de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), que são expressos na superfície celular, nos compartimentos intracelulares ou na corrente sanguínea, o sistema imune inato pode efetuar diversos mecanismos de defesa. Dentre eles, pode-se citar a fagocitose e endocitose por macrófagos e neutrófilos através da opsonização e liberação de mediadores inflamatórios, que ativam as vias de sinalização proinflamatórias. Além disso, ativa proteínas do sistema complemento; a síntese de citocinas e induz a apoptose celular (CRUVINEL et al., 2008; JANEWAY; MEDZHITOV, 2002).

A imunidade adaptativa, em contraste com a inata, está envolvida, principalmente, com o desenvolvimento da defesa de longa duração e da memória imunológica contra as ameaças que podem ser encontradas repetidamente (HENGEVELD; KERSTEN, 2015). Ela é responsável por uma resposta imune específica e pela produção de anticorpos direcionados contra um patógeno em particular ou seus produtos. O reconhecimento do agente patogénico é realizado por meio

dos receptores de antígenos, presentes na superfície dos linfócitos T (TCR, do inglês *T cell receptor*) e dos linfócitos B (BCR, do inglês *B cell receptor*) (DORIA et al., 2012). As principais classes de linfócitos e suas funções estão representadas na **Figura 1**.

Figura 1. Principais classes de linfócitos e suas funções na imunidade adaptativa.



Fonte: Adaptado de (KUMAR et al., 2010).

Os linfócitos B desenvolvem-se a partir de precursores na medula óssea e, quando maduros, representam uma baixa taxa da população de linfócitos periféricos circulantes. Também estão presentes nos tecidos linfoides periféricos, como os linfonodos, o baço e os tecidos linfoides associados à mucosa (KUMAR et al., 2010). Os linfócitos B, além de se diferenciarem em células secretoras de anticorpos (células plasmáticas), possuem funções efetoras. Eles são capazes de apresentar antígenos para os linfócitos T auxiliares (LT CD4⁺), desencadeando sua coestimulação, e de expressar citocinas pró-inflamatórias ou anti-inflamatórias, que modulam as respostas dos linfócitos T (CHOI; MOREL, 2017).

Os linfócitos T desenvolvem-se a partir de precursores no timo. A maioria dos linfócitos T maduros encontra-se na corrente sanguínea, enquanto a outra parcela está localizada nas zonas de linfócitos T dos órgãos linfoides periféricos (KUMAR et al., 2010). São razoavelmente

heterogêneos e se diferenciam em várias classes de células funcionais, as quais são especializadas em diferentes atividades.

Os linfócitos T CD8 reconhecem antígenos apresentados por moléculas de MHC de classe I (Complexo Principal de Histocompatibilidade, do inglês *Major Histocompatibility Complex*), se diferenciam em linfócitos T citotóxicos CD8⁺ que, basicamente, causam a apoptose de células-alvo que apresentam fragmentos peptídicos do patógeno. Os linfócitos T CD4 reconhecem os antígenos apresentados por uma molécula do MHC de classe II e podem se dividir em subpopulações de células efetoras que possuem diferentes funções imunes, baseados em seus padrões de produção de citocinas.

Os linfócitos T auxiliares (Th) secretam citocinas que induzem respostas imunes, como a proliferação e diferenciação de linfócitos B, que irão produzir anticorpos contra o patógeno em questão. Podem ser classificadas como: linfócitos Th1, que produzem interleucina 2 (IL2), fator de necrose tumoral (TNF) e interferon- γ (IFN- γ). São responsáveis por promover a imunidade celular através da ação de linfócitos T contra patógenos intracelulares. Os linfócitos Th são responsáveis pela produção de diversas interleucinas encarregadas de promover a imunidade humoral. Esta, por sua vez, atua no ambiente extracelular através da ação de anticorpos produzidos pelos linfócitos B, que são direcionados contra patógenos extracelulares. Os linfócitos Th17, os quais produzem citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina-17 (IL17), elementos importantes na indução da inflamação.

As outras células T CD4 são denominadas linfócitos T regulatórios (Treg), cuja função é suprimir as respostas das células T ao invés de ativá-las. Elas produzem citocinas que possuem papel crucial na indução e manutenção da tolerância periférica e prevenção da autoimunidade. As células Treg inibem a produção e proliferação de citocinas nos linfócitos T, a produção de anticorpos pelos linfócitos B, a atividade citotóxica das células NK e a manutenção das células dendríticas, resultando na indução da tolerância. Esta limitação da resposta imune é uma característica importante na prevenção de respostas autoimunes (MURPHY et al., 2010; TAN; PEEVA; ZANDMAN-GODDARD, 2014).

1.2 TOLERÂNCIA IMUNOLÓGICA E AUTOIMUNIDADE

Nos mecanismos de defesa desempenhados pelo sistema imune, é de extrema importância que este tenha a capacidade de diferenciar os

componentes próprios dos não-próprios (SAWANT; VIGNALI, 2014; SOUZA et al., 2010). Para isso, os linfócitos são normalmente apresentados a antígenos do próprio corpo, antígenos de microrganismos comensais e antígenos alimentares, e a geração de uma resposta imune contra eles deve ser eliminada, ou ocorrer de forma controlada (JOSEFOWICZ; LU; RUDENSKY, 2012). Essa exposição prévia a autoantígenos dá ao sistema imune a capacidade de distingui-los dos não-próprios. Este mecanismo, denominado tolerância imunológica, ocorre nos órgãos linfoides centrais, como o timo (linfócitos T) e medula óssea (linfócitos B), e nos órgãos linfoides periféricos, de modo a assegurar que ocorra a deleção ou inativação funcional dos linfócitos T e B autorreativos (SAWANT; VIGNALI, 2014; SOUZA et al., 2010).

Após a migração dos precursores de linfócitos T (LT) para o timo, ocorrem inúmeras modificações destas células nesta região. Durante a maturação, há a interação entre as células apresentadoras de antígenos, localizadas no microambiente tímico, com os linfócitos T. Este contato celular é primordial para que ocorra a proliferação, diferenciação celular, expressão de moléculas de superfície (CD4 e CD8), e a criação de um conjunto de receptores de linfócitos T (TCR). Desta forma, os linfócitos que expressaram os TCRs com êxito passam para o processo de seleção positiva, que se baseia na capacidade de ligação do TCR com o complexo do MHC (SOUZA et al., 2010).

Durante a seleção positiva, os LT que apresentam TCRs capazes de se ligar ao MHC e ao peptídeo próprio (autoantígeno) com baixa intensidade são estimulados a sobreviver e migram para os órgãos linfoides periféricos, onde prosseguem com a maturação e se diferenciam em linfócitos T CD4⁺ ou T CD8⁺. Os LT, cujo TCR é incapaz de reconhecer o MHC e o autoantígeno, morrem por apoptose.

O processo de seleção negativa ocorre posteriormente e é quando os LT expressam TCRs que se ligam fortemente ao MHC e ao autoantígeno. Deste modo, estas células sofrem apoptose, evitando assim a maturação de LT autorreativos (SOUZA et al., 2010; STRITESKY; JAMESON; HOGQUIST, 2012). Além disso, o timo pode desempenhar outro papel essencial na manutenção da tolerância imunológica, através da produção de uma população de linfócitos Tregs (ITOH et al., 1999).

Os linfócitos B (LB) também são expostos a autoantígenos durante seu processo de maturação e seleção. Isto se dá através das imunoglobulinas de membrana, ou dos receptores de células B, os quais podem reconhecer os autoantígenos que possuem alta afinidade na medula óssea. Assim, as células podem sofrer apoptose ou, ainda, pode

ocorrer um rearranjo gênico das cadeias das imunoglobulinas, apresentando uma nova especificidade antigênica (SOUZA et al., 2010). Quando os LB autorreativos maduros interagem com autoantígenos no órgão linfóide periférico, pode haver uma contribuição para que a tolerância seja mantida através da deleção clonal dos linfócitos que possuem esta alta afinidade aos autoantígenos (PILLAI; MATTOO; CARIAPPA, 2011; SOUZA et al., 2010).

A perda da tolerância imunológica pode gerar eventos patológicos, como uma doença autoimune. Apesar de a tolerância central eliminar os linfócitos T e B autorreativos de alta afinidade, os linfócitos de baixa afinidade desenvolvem-se e são identificadas no repertório imunológico do órgão linfóide periférico, podendo dar início a um quadro de autoimunidade em níveis patológicos, se o estímulo for forte o suficiente (SHLOMCHIK; CRAFT; MAMULA, 2001). Alguns autoantígenos são intracelulares e não são encontrados pelos linfócitos.

Quando ocorre uma morte tecidual, ou um quadro inflamatório, há uma eliminação inadequada de elementos celulares, que pode provocar a ativação dos linfócitos T e B autorreativos. Desta forma, linfócitos B autorreativos podem internalizar estes autoantígenos e produzir autoanticorpos. Além disso, podem agir como células apresentadoras de antígeno, que irão desencadear a desregulação de muitos outros tipos de células imunes, como linfócitos T autorreativos, células dendríticas, macrófagos e neutrófilos (MOREL, 2017; MURPHY et al., 2010). Com isso, o sistema imune passa a produzir uma resposta contra células e tecidos do próprio organismo, provocando quadros inflamatórios e lesões teciduais que podem acarretar no desenvolvimento de doenças autoimunes (LETTRE; RIOUX, 2008).

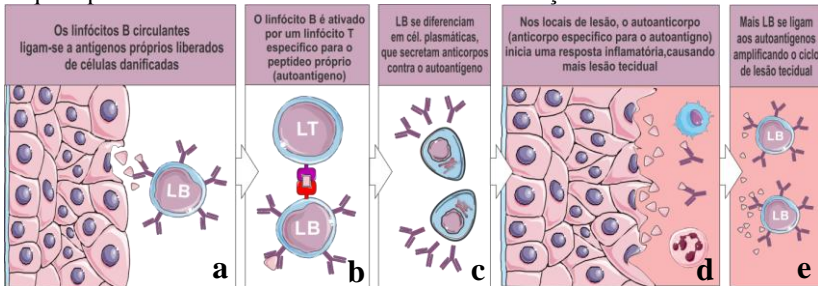
1.3 DOENÇAS AUTOIMUNES

As doenças autoimunes incluem mais de 70 desordens, que afetam aproximadamente 5% da população ocidental. Elas têm sido associadas a uma ampla variedade de distúrbios imunológicos, que incluem: o aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias e diminuição das citocinas anti-inflamatórias e o aumento do número de linfócitos B e produção de autoanticorpos. Subjacente a estas alterações imunológicas, há um defeito na eliminação de linfócitos B e T autorreativos (LLEO et al., 2010; MOUNTZ et al., 1994).

Em geral, as doenças autoimunes são caracterizadas pela presença constante de autoantígenos e, por isso, tendem a evoluir para

um quadro inflamatório crônico. Este estado crônico, por sua vez, provoca a liberação de mais autoantígenos como resultado da lesão tecidual. O autoantígeno pelo qual a resposta imune é dirigida e o mecanismo pelo qual o tecido portador do antígeno é lesado determinam, em conjunto, a patologia e a expressão clínica da doença. Assim, conforme ilustrado na **Figura 2**, os linfócitos B autorreativos podem incorporar e processar este autoantígeno para o qual são específicos, revelando uma nova variedade de epítomos que podem, agora, ser apresentados para um linfócito T. Os linfócitos T autorreativos que respondem a este autoantígeno podem recrutar linfócitos B, que poderá resultar na produção de autoanticorpos (MURPHY et al., 2010).

Figura 2. Inflamação mediada por autoanticorpos que causam lesões teciduais as quais podem acarretar no desenvolvimento de doenças autoimunes.



Os autoantígenos, particularmente aqueles intracelulares, estimulam linfócitos B somente quando liberados de células em processo de morte celular (a). O resultado é a ativação de linfócitos T e B autorreativos e a eventual secreção de autoanticorpos (b e c). Esses autoanticorpos podem mediar à lesão tecidual por meio de várias funções efetoras (d). Um mecanismo de retroalimentação positiva é estabelecido, pois os autoantígenos adicionais recrutam e ativam outros linfócitos B autorreativos (e), podendo dar início novamente ao ciclo (a).
Fonte: Adaptado de (MURPHY et al., 2010).

As doenças autoimunes são extremamente heterogêneas e, por isso, clinicamente são classificadas de acordo com os tecidos e órgãos que são acometidos durante a resposta imune desregulada. Quando a doença é órgão-específica, a resposta imune é direcionada a um autoantígeno expresso em apenas um tecido ou órgão específico, como a Esclerose Múltipla e a Diabetes *Melitus*. Nas doenças sistêmicas, a resposta é dirigida contra autoantígenos expressos em todo o organismo, podendo ocorrer lesões que afetam múltiplos órgãos e tecidos, como é o

caso do Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) (GREGERSEN; BEHRENS, 2006; MARRACK; KAPPLER; KOTZIN, 2001).

1.4 LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO

1.4.1 Considerações gerais

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é considerado um protótipo de doença autoimune crônica, caracterizado pela perda da autotolerância do sistema imunológico. Esta perda provoca a produção e proliferação de autoanticorpos que são dirigidos contra os componentes nucleares do indivíduo, particularmente DNA, histonas e ribonucleoproteínas (BOODHOO; LIU; ZUO, 2016; MARRACK; KAPPLER; KOTZIN, 2001; MOREL, 2017). A presença destes autoanticorpos e a deposição de imunocomplexos com a subsequente infiltração de neutrófilos, hiperativação de linfócitos B e T autorreativos, liberação de conteúdos apoptóticos e a desregulação do sistema imune resultam em um quadro inflamatório crônico e lesão tecidual de múltiplos órgãos e tecidos, tais como pele, articulações, coração, rins, pulmões e o sistema nervoso central (ABDEL GALIL; EZZELDIN; EL-BOSHY, 2015; CERVERA et al., 2013; MORAWSKI; BOLLAND, 2017).

Pelo fato do antígeno reconhecido ser sistêmico, as manifestações clínicas de LES possuem uma ampla heterogeneidade e podem se apresentar de diferentes formas e grau de severidade. As manifestações mais prevalentes são a artrite, manifestações cutâneas, glomerulonefrite e vasculite (CERVERA et al., 2013; PALAGINI et al., 2013). A doença apresenta um progresso variável, alternando períodos de remissão e exacerbação, podendo ocasionar comorbidades ou mesmo ser fatal (CERVERA et al., 2013).

O LES é uma doença cosmopolita e sua prevalência varia de acordo com o gênero, idade, etnia e região geográfica, o que demonstra se tratar de uma patologia complexa, de origem multifatorial (DANCHENKO; SATIA; ANTHONY, 2006). A prevalência na população ocidental varia entre 4,8-180 casos para cada 100.000 habitantes (KUNZ, 2013). No Brasil, os dados epidemiológicos de lúpus são escassos.

Há uma grande dificuldade em identificar os fatores de risco que contribuem para o desenvolvimento da doença. As variantes de susceptibilidade genética tem demonstrado ter uma influência modesta na manifestação da doença (LETTRE; RIOUX, 2008). Neste contexto, é

acredita-se que o principal fator de risco para um indivíduo desenvolver uma doença autoimune como lúpus é o indivíduo ser do sexo feminino (ZANDMAN-GODDARD; PEEVA; SHOENFELD, 2007). Durante a idade reprodutiva, a doença acomete nove mulheres para cada homem (SCHWARTZMAN-MORRIS; PUTTERMAN, 2012).

1.4.2 Patogênese de LES

Existem diversos fatores que contribuem com o início e progressão da autoimunidade em LES. Inicialmente, ocorre a perda da autotolerância e a geração de linfócitos T e B autorreativos e a subsequente diferenciação dos linfócitos B em células plasmáticas, que secretam níveis elevados de autoanticorpos os quais podem desencadear a autoimunidade. A presença de autoanticorpos em pacientes de LES, incluindo anti-dsDNA, anti-SSA (Ro), anti-SSB, anti-Sm e anti-RNPs, pode ser detectada antes dos sinais clínicos se manifestarem (ZHARKOVA et al., 2017).

Os linfócitos T também passam pelo processo de tolerância para restringir a autorreatividade. Tem-se demonstrado em muitas linhagens autoimunes que os linfócitos T também são requisitados para a produção de autoanticorpos, indicando que a perda da tolerância em linfócitos T pode desempenhar um papel importante no desenvolvimento de LES. Além disso, estas células estimulam a inflamação através da secreção de citocinas pró-inflamatórias, ativando células dendríticas e linfócitos B (CRISPÍN et al., 2008; ZHARKOVA et al., 2017).

A desregulação dos linfócitos T regulatórios (Tregs) também pode contribuir para a perda da tolerância dos linfócitos, provocando sua hiperativação. Em pacientes de LES, observa-se a redução do número e função diminuída dos linfócitos Tregs (ZHARKOVA et al., 2017).

Pacientes diagnosticados com LES apresentam apoptose celular desregulada, e a remoção deficiente deste material, o que permite que componentes intracelulares, incluindo compostos nucleares, sejam expostos livremente no organismo e por um período mais longo do que o normal (KUMAR et al., 2010; PARK et al., 2014). Evidências sugerem que o aumento de restos celulares de células apoptóticas, mais precisamente detritos nucleares, fornecem uma fonte de autoantígenos que induzem a hiperativação de linfócitos B autorreativos. Estes passam a produzir autoanticorpos nucleares. Estes detritos são resultantes da fagocitose por macrófagos e neutrófilos, porém em pacientes de LES o processo fagocitário dos macrófagos é defeituoso.

Estudos em modelos de murinos sugerem uma deficiência nas proteínas de superfície das células fagocitárias, que estão envolvidas na remoção de detritos nucleares circulantes. Assim, os autoanticorpos se ligam aos detritos das células apoptóticas do tecido-alvo e provocam o desenvolvimento de imunocomplexos (ICs), que ali se depositam. Estes ICs são capturados pelos linfócitos B e células dendríticas e ativam receptores intracelulares que induzem a produção de citocinas pró-inflamatórias, resultando na propagação da resposta inflamatória crônica dos órgãos e lesão tecidual. Além disso, o sistema complemento também é ativado, gerando produtos que recrutam células inflamatórias para o tecido-alvo, ampliando sua lesão. A coexistência da perda da tolerância imunológica, a formação de ICs e a ativação do sistema complemento geram respostas inflamatórias que podem causar significativas lesões teciduais, resultando nos sintomas de LES (KUMAR et al., 2010; PARK et al., 2014; ZHARKOVA et al., 2017; ZHOU et al., 2009).

1.4.3 Manifestações Clínicas

O LES caracteriza-se por apresentar manifestações clínicas heterogêneas que afetam praticamente qualquer tecido do corpo e, por isso, é considerada uma doença sistêmica (AGMON-LEVIN et al., 2012). A doença inicia-se com uma fase pré-clínica, caracterizada pela presença de autoanticorpos que são comuns a outras doenças autoimunes e provocam sintomas constitucionais, que são inespecíficos e comuns a várias patologias, como fadiga, febre, falta de apetite, perda de peso, mialgia e dor articular. Além disso, de forma concomitante a estes, prossegue-se para uma fase clínica que provoca sintomas relacionados a lesões órgão-específicas que envolve, principalmente, as articulações, pele, sistema cardiopulmonar, rins, sistema gastrointestinal, sistema hepatológico e sistema nervoso central, constituindo a forma sistêmica da doença (BERTSIAS; CERVERA; BOUMPAS, 2012; MILLS, 1994). Vários autoanticorpos foram associados não apenas à ocorrência da doença, mas também às suas manifestações específicas. A presença de determinados autoanticorpos predizem alguns fenótipos de lúpus (AGMON-LEVIN et al., 2012).

A maioria dos pacientes com LES eventualmente tem algum tipo de manifestação cutânea. Uma das manifestações mais específicas e que se tornou o símbolo da doença é o *rash* malar ou dermatite em forma “asa de borboleta”, que muitas vezes é decorrente da alta

fotosensibilidade dos pacientes, ou seja, é exacerbada pela exposição solar (MOURA FILHO et al., 2014; WALLING; SONTHEIMER, 2009).

Devido a grande heterogeneidade das manifestações de LES, cada paciente possui características distintas. A natureza dinâmica da doença torna o diagnóstico e tratamento desafiadores e, por isso, foram desenvolvidos critérios estabelecidos pelo Colégio Americano de Reumatologia (do inglês, *American College of Rheumatology*) para a classificação mais adequada de LES. Para estabelecer o diagnóstico, é preciso observar a presença de pelo menos quatro dos onze critérios observados na **Tabela 1** em duas ocasiões distintas no período de seis meses (BERTSIAS; CERVERA; BOUMPAS, 2012; SMITH; SHMERLING, 1999).

Tabela 1. Critérios *do American College of Rheumatology* para o diagnóstico de Lúpus Eritematoso Sistêmico.

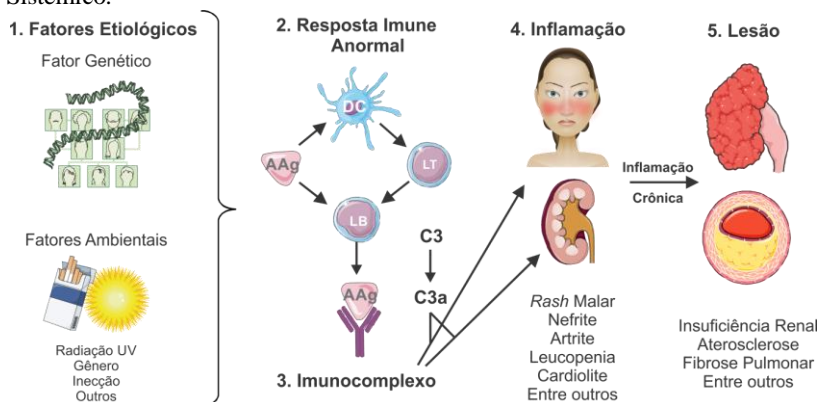
Critério	Definição
Eritema (<i>rash</i>) Malar	Eritema constante, plano ou elevado, nas bochechas e nariz, frequentemente na forma de asa de borboleta
Eritema Discóide	Erupção cutânea avermelhada, elevada e em forma de disco, com escamações ceratóticas
Fotossensibilidade	Erupção cutânea resultante de uma reação incomum à luz solar; pode provocar resultar na piora de uma erupção existente
Úlcera Oral	Ferida oral ou nasofaríngea, geralmente indolor, observada por um médico
Artrite	Artrite que envolve duas ou mais articulações periféricas, caracterizada por sensibilidade, inchaço ou dor
Serosite	Inflamação no tecido que envolve os pulmões (pleurite) ou inflamação das membranas que envolvem o coração (pericardite)
Distúrbio Renal	Presença de proteína (proteinúria), matriz celular ou modelos celulares (eritrócitos) na urina
Distúrbio Neurológico	Convulsões ou psicoses
Distúrbio Hematológico	Anemia hemolítica (baixas doses de eritrócitos), leucopenia (baixas doses de leucócitos), linfopenia (baixas doses de linfócitos ou trombocitopenia (baixas doses de plaquetas)
Distúrbio Imunológico	Teste positivo para anti-dsDNA, anti-Sm ou anticorpos antifosfolípidos
Anticorpos Antinucleares	Teste positivo para anticorpo antinuclear

Fonte: Adaptado de (SMITH; SHMERLING, 1999).

1.4.4 Etiologia de LES

Embora a etiologia de LES permaneça relativamente idiopática, sabe-se que é uma doença de causa multifatorial, a qual envolve a interação de fatores genéticos, ambientais, e hormonais, que geram disfunções fisiológicas que acarretam no desenvolvimento da doença (**Figura 3**) (TSOKOS et al., 2016; ZANDMAN-GODDARD; PEEVA; SHOENFELD, 2007).

Figura 3. Fatores etiológicos envolvidos na patogênese de Lúpus Eritematoso Sistêmico.



A interação entre genes suscetíveis e fatores ambientais pode resultar em respostas imunes anormais (1), que variam entre diferentes pacientes. Estas respostas podem incluir a maior ativação da imunidade inata e das células do sistema imune adaptativo (linfócitos B e T) (2). Assim, autoanticorpos são produzidos pelos linfócitos B e, desta forma, ligam-se aos autoantígenos e formam imunocomplexos os quais se depositam no tecido lesado por períodos prolongados de tempo (3), permitindo o desenvolvimento da inflamação e da doença (4). A deposição e acúmulo de imunocomplexos no tecido alvo provocam a ativação do sistema complemento, levando a liberação de citocinas que ativam múltiplas células teciduais e causam o influxo de linfócitos T e B, macrófagos e células dendríticas, que estimulam a lesão tecidual. No contexto da inflamação crônica, o acúmulo destes fatores contribui para o estabelecimento de danos irreversíveis nos tecidos (5). DC: células dendríticas; AAg: autoanticorpo; LT: linfócito T; LB: linfócito B; C3 e C3a: moléculas do sistema complemento.

Fonte: Adaptado de (KASPER et al., 2015)

1.4.4.1 Fatores Ambientais

As disfunções fisiológicas podem ser exacerbadas por fatores exógenos. As exposições ambientais podem incluir agentes infecciosos, principalmente vírus, exposição à radiação ultravioleta (UV) e fatores comportamentais, como a dieta e tabagismo (SARZI-PUTTINI et al., 2005).

Provavelmente, o fator ambiental mais discutido é a luz ultravioleta. Os pacientes possuem uma sensibilidade à luz UV que provoca uma erupção cutânea fotossensível. Isso se dá através da apoptose de queratinócitos e a consequente exposição de autoantígenos, que induzem a produção de autoanticorpos os quais podem conduzir uma resposta autoimune, resultando em lesões cutâneas características de LES (D'CRUZ, 2000).

O uso de medicamentos específicos pode induzir o desenvolvimento de LES, principalmente se seu uso for prolongado. Assim como o tabagismo, que possui diversos componentes tóxicos que podem afetar a função imune (SARZI-PUTTINI et al., 2005). Estudos também sugerem que fatores étnicos e socioeconômicos podem influenciar a severidade e desenvolvimento da doença. LES mostrou-se ser mais frequente em indivíduos não caucasianos. Nos Estados Unidos, por exemplo, LES é mais comum em afro-americanos que, em geral, possuem uma forma mais grave doença (ARBUCKLE et al., 2003; DANCHENKO; SATIA; ANTHONY, 2006). No âmbito socioeconômico, a dificuldade de acesso aos serviços de saúde apropriados pode resultar no agravamento da doença (BOODHOO; LIU; ZUO, 2016).

1.4.4.2 Fatores Hormonais

O LES é uma doença que apresenta um forte viés sexual, acometendo em média nove mulheres para cada homem (TEDESCHI; BERMAS; COSTENBADER, 2013). Dentre os pacientes masculinos, observa-se que há manifestações da doença mais severas, como o maior comprometimento renal, neurológico, anemia hemolítica e hipertensão arterial, além da manifestação mais precoce da doença (GARCIA et al., 2005; TEDESCHI; BERMAS; COSTENBADER, 2013).

A maior incidência de LES no sexo feminino ainda não está elucidada. Em relação ao âmbito genético, pesquisadores buscaram entender este forte viés sexual através de estudos sobre a dose dupla do

cromossomo X em mulheres, sendo que a presença de um segundo cromossomo poderia contribuir com a patogênese de LES (TEDESCHI; BERMAS; COSTENBADER, 2013). Nas mulheres, uma cópia do cromossomo X é inativada, com o intuito de fornecer compensação de dosagem gênica entre mulheres XX e homens XY. Desta forma, qualquer mutação genética associada ao cromossomo X irá ser expressa em 50% das células femininas. Enquanto nos homens, que não são submetidos à inativação, todas as células podem expressar esta mutação, tornando o sexo masculino mais susceptível às doenças associadas a mutações genéticas no cromossomo X. Porém, até o momento, não se encontrou genes e/ou variantes genéticas nesse cromossomo que podem ser associadas com o desenvolvimento de LES o que poderia explicar a magnitude do risco aumentado em mulheres (PENNELL; GALLIGAN; FISH, 2012).

Outro aspecto que tem sido cada vez mais considerado é a influência exercida pelos hormônios sexuais femininos. Evidências epidemiológicas demonstram que mulheres em idade fértil são mais frequentemente afetadas de que homens. Antes da puberdade e após a menopausa, a proporção entre homens e mulheres com LES mostrou-se ser bem mais equilibrada (2:1 em média). Esse padrão indica que algum fator associado à reprodução feminina pode ter forte influência provavelmente devido à ação dos hormônios sexuais femininos (CUTOLO et al., 2004; TEDESCHI; BERMAS; COSTENBADER, 2013). Outras evidências incluem as alterações na severidade da doença durante a gravidez e períodos específicos do ciclo menstrual e o fato de que entre indivíduos do sexo masculino que se submetem a tratamento intensivo com estrógeno para mudança de sexo possuem uma prevalência de LES semelhante às mulheres (RUBTSOV et al., 2010). Desta forma, estudos sugerem que os estrógenos podem aumentar a resposta imune enquanto androgênios e progesterona parecem suprimi-la (RUBTSOV et al., 2011).

Os hormônios sexuais desempenham um papel importante na função das células do sistema imunológico inato e adaptativo. Muitos relatos indicam que diferentes populações de células imunológicas expressam receptores específicos para os hormônios sexuais. Os hormônios esteroides clássicos se difundem através da membrana celular para que possam interagir com seus receptores. O complexo hormônio/receptor se desloca para o núcleo celular, onde ele passa a induzir uma resposta transcricional (RUBTSOV et al., 2011).

Efeitos imunoregulatórios sobre o sistema imune inato podem ser exercidos por hormônios sexuais, como o recrutamento de neutrófilos,

macrófagos e células apresentadoras de antígenos para o local no qual estes hormônios estão sendo produzidos e expressos, e a regulação da atividade das células NK. No sistema imune adaptativo, este efeito imunoregulador também está presente. Os esteroides sexuais afetam a apresentação de antígenos por células dendríticas e macrófagos, o número de linfócitos T e podem aumentar a ativação e sobrevivência de linfócitos B autorreativos e a subsequente secreção de anticorpos (RUBTSOV et al., 2011; TEDESCHI; BERMAS; COSTENBADER, 2013).

Notavelmente, estrógenos, androgênios e progesterona são encontrados em ambos os sexos, porém os níveis hormonais são distintos, o que resulta em diferentes efeitos (ORTONA et al., 2015). A maioria dos dados disponíveis é a respeito do estrógeno. Além da produção endógena, muita discussão vem sendo levantada sobre o impacto da administração exógena de estrógeno. O uso de contraceptivos orais, terapia de reposição hormonal, preparação para fertilização *in vitro* e outras fontes que podem desempenhar um papel adicional no desencadeamento de LES e de outras doenças autoimunes (TAN; PEEVA; ZANDMAN-GODDARD, 2014).

1.4.4.2.1 Progesterona

A progesterona (PG) é um hormônio esteroide feminino derivado da molécula de colesterol. É sintetizada pelas glândulas adrenais, pelo corpo lúteo ovariano, testículos, cérebro e na placenta durante a gestação. Além de realizar funções fisiológicas durante a fase lútea do ciclo menstrual e na manutenção da gravidez, a progesterona atua na regulação de respostas imunes (TAN; PEEVA; ZANDMAN-GODDARD, 2014).

A PG desempenha a sua função imunológica através da interação com receptores específicos, os receptores de progesterona (PRs, do inglês *Progesterone Receptors*). Estes receptores encontram-se em células de tecidos sexuais e não-sexuais, incluindo células imunológicas. Dois destes receptores são intracelulares (iPR) e três são receptores de membrana (mPR) (TAN; PEEVA; ZANDMAN-GODDARD, 2014). Nas células imunes, observa-se uma ampla distribuição de PRs nos granulócitos, células NK, células dendríticas e linfócitos T e B, o que indica que este hormônio influencia o sistema imune inato e adaptativo (ORTONA et al., 2015). Os iPRs são expressos em linfócitos e, quando é ativado por baixas concentrações de PG, parece suprimir a produção

de anticorpos em ambos os sexos. Além disso, PG pode suprimir a resposta imunológica dos linfócitos Th1 e Th17 e, em contraste, favorece a secreção de citocinas pelos linfócitos Th2. Estudos *in vitro* indicam que PG pode inibir as funções dos macrófagos e das células NK. Ao inibir as células NK, há uma diminuição da secreção de IFN- γ por estas células. Poucos estudos examinaram os efeitos de PG nas respostas imunes mediadas por linfócitos B. Sabe-se que, através de iPR, a PG pode suprimir a via de diferenciação destas células, porém muito mais pesquisas são necessárias para esclarecer o impacto deste hormônio sobre este grupo celular (HUGHES, 2012).

1.4.4.2.2 *Estrógenos*

O estrógeno é o principal hormônio sexual feminino e, além do seu papel fundamental no comportamento e reprodução, possui também uma função imunoreguladora. O principal hormônio estrogênico, o 17 β -estradiol (E2), é sintetizado a partir da aromatização de precursores de andrógenos (hormônio sexual masculino) no ovário e em outros tecidos e é capaz de regular respostas imunes em vários níveis, incluindo o desenvolvimento celular, a proliferação, a produção de citocinas e anticorpos e no processo apoptótico (MARINO; GALLUZZO; ASCENZI, 2006; ORTONA et al., 2015).

O E2 desempenha sua função fisiológica e imunoreguladora através da difusão passiva pela membrana celular das células alvo, influenciando a sinalização celular através da interação com receptores de estrógeno (ERs, do inglês *Estrogen Receptors*) específicos, localizados intracelularmente (MARINO; GALLUZZO; ASCENZI, 2006). Os ERs são membros da família de receptores nucleares que regulam a expressão de uma ampla gama de genes. Essa família inclui duas isoformas, ER α (Receptor de estrógeno alfa, do inglês *Estrogen Receptor alpha*) e ER β (Receptor de estrógeno beta, do inglês *Estrogen Receptor beta*). Estudos sugerem que a ativação do ER α acarreta um efeito imunoestimulante, enquanto que a ativação do ER β parece ter um efeito imunossupressor (MARINO; GALLUZZO; ASCENZI, 2006; ORTONA et al., 2015). Os ERs são expressos em níveis elevados nas células do sistema reprodutor feminino, porém também são encontrados em linfócitos B e T, monócitos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e células NK (BOUMAN; JAN HEINEMAN; FAAS, 2005; PENNELL; GALLIGAN; FISH, 2012).

Os ERs funcionam como fatores de transcrição que são ativados por ligante, como o E2. Desta forma, a sinalização celular pode ocorrer através da via clássica, onde o E2 se liga às isoformas de ERs e forma um complexo E2/ER, o qual sofre um processo de modificações estruturais. O complexo é translocado para o núcleo celular, onde se liga a uma sequência nucleotídica denominada de elemento responsivo de estrógeno (ERE, do inglês *Estrogen Responsive Element*), localizado na região promotora do gene alvo (PENNELL; GALLIGAN; FISH, 2012). Desde a identificação dos EREs, vários estudos computacionais têm sido realizados para identificar genes alvos que possuam esta sequência nucleotídica nas regiões promotoras. Além disso, o complexo E2/ER pode influenciar a expressão de genes que não possuem em suas regiões promotoras a sequência exata ERE, através da interação com outros fatores de transcrição, como o NF- κ B, potencializando a ligação desse fator à região regulatória dos seus genes alvo. Este modo de ação permite aumentar significativamente o repertório de genes regulados por estradiol (VRTAČNIK et al., 2014).

Há também alterações provocadas por estradiol que acontecem de forma rápida, e dificilmente estão associadas com a transcrição de genes alvo. As ações não genômicas do estradiol estão relacionadas à ativação de cascatas de proteínas quinases, que provocam a fosforilação de fatores de sinalização intracelular, tendo um efeito direto no metabolismo celular (VRTAČNIK et al., 2014).

A relação entre o estradiol e o desenvolvimento de doenças autoimunes é complexa. Em LES, o estradiol provavelmente possui um papel patogênico que contribui com a severidade da doença e sua exacerbação. O estradiol induz a produção de citocinas, maturação de linfócitos B, produção de autoanticorpos e respostas do linfócito T CD4⁺ do tipo Th2 (PENNELL; GALLIGAN; FISH, 2012). Um estudo que tratou células mononucleares do sangue periférico com estradiol exógeno revelou um aumento da secreção de autoanticorpos anti-DNA e de IgG (Imunoglobulina G) nos linfócitos B. Curiosamente, a administração exógena de testosterona reduziu a secreção de anticorpos anti-DNA, indicando que o antagonismo dos andrógenos pode inibir a secreção destes autoanticorpos (GRIMALDI, 2006). Em modelos murinos, a administração exógena de estradiol mostrou relação significativa com o desenvolvimento de manifestações semelhantes às de doenças autoimunes (ELBOURNE; KEISLER; MCMURRAY, 1998).

1.4.4.3 Fatores Genéticos

Evidências de um componente genético são ratificadas por estudos que afirmam que um indivíduo que tenha casos de LES na família tem mais chance de desenvolver a doença do que aquele que não possui familiares acometidos. Outro indício genético é a maior taxa de LES entre gêmeos monozigóticos do que em gêmeos dizigóticos (AMUR; PAREKH; MUMMANENI, 2012). Além disso, através de diversos estudos de caso-controle, descobriram-se diversos genes com polimorfismos que estão associados com o desenvolvimento da doença. Porém, fatores de susceptibilidade genética muitas vezes têm uma influência modesta sobre a doença, com *odds-ratio* tipicamente variando entre 1.15-2.0 (MOSER et al., 2009)

A interação complexa entre os fatores ambientais e genéticos desempenham um papel importante para o desenvolvimento de LES. Em um indivíduo com o genótipo susceptível, a exposição a fatores ambientais e moduladores, como hormônios sexuais, podem, em conjunto, iniciar um processo autoimune (WHITACRE, 2001). Destes, há genes que codificam proteínas com ação imunoreguladoras, como o gene *TNFSF13B* que, em interação com os hormônios sexuais, pode desregular a resposta imune.

1.5 GENE TNFSF13B E SEU CONTEXTO GENÔMICO

O gene *TNFSF13B* é membro da superfamília de ligantes de fatores de necrose tumoral, e está localizado no braço longo do cromossomo 13 (13q33.3), contendo 6 *exons* e 5 *introns*, que correspondem a 39kb. A região promotora contém 1020pb e pode ser ativada por muitos fatores de transcrição, como membros NF- κ B (LAHIRI et al., 2012). Ele é responsável por codificar uma citocina da família TNF, o fator de ativação de células B, também conhecido como BAFF (do inglês, *B cell activating factor*). Esta citocina é expressa por células mononucleares sanguíneas, pelo baço e linfonodos através da regulação de múltiplas moléculas. As principais células que produzem o BAFF são os macrófagos, monócitos, células dendríticas, astrócitos, neutrófilos e também linfócitos T ativados (LAHIRI et al., 2012; TANGYE et al., 2006). BAFF é uma proteína transmembrana do tipo 2 que, sob condições normais, pode ser expressa na superfície celular ou pode ser clivada por uma protease, resultando em uma molécula solúvel,

biologicamente ativa (HENGEVELD; KERSTEN, 2015; WEI; CHANG; WEI, 2015).

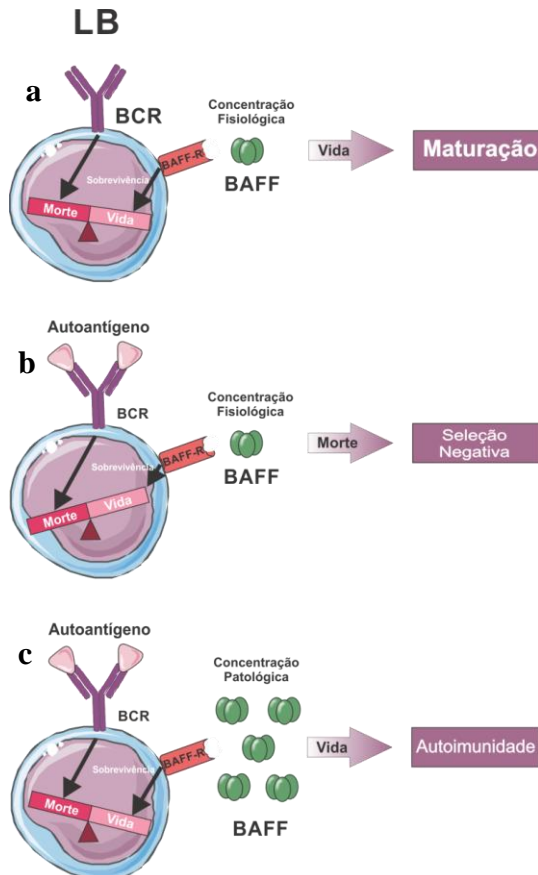
1.5.1 BAFF e Regulação Imune

A molécula BAFF possui um papel primordial na homeostase, sobrevivência, crescimento e maturação dos linfócitos B periféricos e, conseqüentemente, na produção de anticorpos (LAHIRI et al., 2012; LIED; BERSTAD, 2011). A primeira evidência de que BAFF possui um impacto na sobrevivência dos linfócitos B decorreu de uma pesquisa *in vitro* com linfócitos B do sangue periférico humano, que foram cultivados na presença e ausência da molécula BAFF solúvel. As culturas tratadas com a citocina em estudo apresentaram-se mais viáveis e capazes de produzirem anticorpos (KALLED, 2005). BAFF também é requerido para que ocorra a transição de linfócitos B imaturos em linfócitos B maduros. Além disso, a sua expressão nos tecidos linfóides periféricos é essencial para manter a sobrevivência dos linfócitos B maduros em longo prazo.

Estudos em modelos murinos demonstraram que, ao inibir o acesso de BAFF pelos linfócitos B maduros, ocorre a depleção destas células (BRINK, 2006). Por outro lado, a administração de BAFF, ou a sua alta expressão, em murinos aumentou o nível de imunoglobulinas no sangue (MACKAY; BROWNING, 2002). Embora a maioria dos estudos sobre BAFF foquem na sua função estimuladora de linfócitos B, ele também pode coestimular a ativação de linfócitos T. Estudos em humanos e murinos demonstraram que BAFF pode melhorar a resposta *in vitro* dos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ (TANGYE et al., 2006; WEI; CHANG; WEI, 2015).

Pesquisas feitas com modelos murinos demonstraram que, quando BAFF é expresso em taxas elevadas, o equilíbrio entre sobrevivência e apoptose pode ser perturbado e, portanto, linfócitos B podem sobreviver a sinais de morte que são desencadeados por autoantígenos. Como resultado deste contexto, tem-se o aparecimento de células autorreativas. Em murinos com elevadas concentrações de BAFF, observa-se o desenvolvimento de manifestações autoimunes. Assim, acredita-se que BAFF precisa ser cuidadosamente regulado para que a sobrevivência de linfócitos B seja mantida sem que a autoimunidade seja desencadeada (MACKAY; BROWNING, 2002). Este mecanismo está ilustrado na **Figura 4**.

Figura 4. Modelo que retrata o envolvimento de BAFF na tolerância imune periférica.



Na figura (a) os níveis fisiológicos de BAFF podem superar os sinais de morte que são desencadeados por um sinal fraco do receptor de células B (BCR). Nestas condições, os linfócitos B sobrevivem e amadurecem. Na figura (b) os linfócitos recebem um sinal forte de morte através do BCR, que interagiu com um autoantígeno. Assim, estes linfócitos não podem ser resgatados pela sobrevivência induzida por BAFF a níveis fisiológicos e sofrem apoptose. Na imagem (c), a elevada produção de BAFF pode superar os fortes sinais de morte que são desencadeados pela ligação do autoantígeno ao BCR. Os linfócitos autorreativos sobrevivem e amadurecem. Este mecanismo leva à autoimunidade. LB: linfócitos B; BCR: Receptor de células B; BAFF: fator ativador de células B. **Fonte:** Adaptado de (MACKAY; BROWNING, 2002).

Desta forma, sabendo da importância de BAFF no desenvolvimento da autoimunidade patogênica, foi desenvolvida uma terapia imunobiológica para o tratamento de LES. Esta terapia inclui anticorpos monoclonais que inibem o efeito de determinadas citocinas. O Belimumab, também conhecido como Benlysta[®], é um anticorpo monoclonal que reconhece e inibe, especificamente, a atividade biológica de BAFF. Assim, este medicamento reduz seletivamente o número de linfócitos B e células plasmáticas de curta duração e os títulos de anticorpos anti-dsDNA em pacientes com LES. Atualmente, este é o único medicamento disponível e aprovado pela FDA (do inglês *Food and Drug Administration*) para o tratamento específico de LES em humanos (DING, 2008; NAVARRA et al., 2011).

Esta terapia anti-BAFF pelo Belimumab demonstrou eliminar parcialmente os linfócitos B circulantes. Com isso, a função de modular as respostas inflamatórias e imunitárias não é totalmente perdida. Esta redução de linfócitos B circulantes reflete a baixa eficácia deste medicamento durante o tratamento de LES. Além do mais, as redes que regem a sobrevivência de linfócitos B são muito complexas, e o bloqueio de receptores alvos de BAFF para fins terapêuticos pode ser insuficiente para inibir a função de linfócitos B autorreativos, podendo ocorrer a progressão da doença em alguns pacientes (DING, 2008). Esta baixa eficácia terapêutica do Belimumab pode ser um reflexo da ampla variedade de manifestações clínicas que LES apresenta, provavelmente devido as diferentes vias etiológicas que acarretam no desenvolvimento da doença.

Modelos murinos têm contribuído para melhor compreender os mecanismos moleculares que conduzem o desenvolvimento de LES. Estudos que utilizaram modelos animais de autoimunidade mostraram que a administração exógena de hormônios sexuais femininos pode regular a expressão da doença. Em linhagens de ratos suscetíveis a lúpus, a administração de E2 acelera o desenvolvimento da doença, enquanto que a diminuição de E2 (após ovariectomia), ou a administração de antagonistas de ER, podem retardar o curso da doença (HUGHES; CLARK, 2007). Além do fator hormonal, há o quesito genético, em que a deleção do gene que codifica a citocina BAFF prejudica o desenvolvimento dos linfócitos B durante a fase de transição em modelos murinos. Em contraposição, a alta expressão de BAFF induz a autoimunidade destes animais, que desenvolvem distúrbios autoimunes semelhantes ao LES e a Síndrome de Sjögren (PANCHANATHAN; CHOUBEY, 2013).

Alguns estudos têm relatado que, em modelos murinos, a expressão de BAFF pode ser induzida pela sinalização de estrógeno e interferon. Os níveis de BAFF foram mais elevados em células isoladas de murinos do sexo feminino do que em murinos do sexo masculino. Além disso, o tratamento de células esplênicas com E2 aumentou em três vezes a expressão de BAFF. Estas observações sugerem que a expressão de BAFF depende de fatores hormonais, como o estradiol. Em adição, modelos femininos de murinos que possuem uma deficiência no gene que codifica o receptor de estrógeno (ESR1, do inglês *Estrogen receptor 1*) apresentaram, nas células esplênicas, níveis menores de BAFF, sugerindo que a expressão desta citocina pelas células imunológicas depende da expressão do ER (PANCHANATHAN; CHOUBEY, 2013). Assim sendo, a sinalização de estradiol em células imunológicas pode estimular a regulação positiva de BAFF. Por sua vez, o aumento de níveis séricos de BAFF contribui com o desenvolvimento de lúpus em modelos murinos. Ao realizar pesquisas sobre o assunto, tivemos conhecimento que tal efeito nunca tinha sido testado em células humanas.

Vários estudos relataram que a progesterona também possui efeitos imunomoduladores, porém sua função é normalmente imunossupressora. O tratamento com PG possui efeito direto em células dendríticas de ratos, inibindo a secreção de citocinas pró-inflamatórias. Além disso, diminui a capacidade destas células de estimularem a proliferação de linfócitos T. Foi ainda relatado um efeito semelhante em macrófagos (BUTTS et al., 2008). Porém, não foram localizados estudos em modelos animais que avaliam a influência da PG na expressão de BAFF. Foi identificado apenas um estudo de associação genômico amplo (GWAS, do inglês *Genome-wide Association Studies*) por microarranjo de DNA em humanos, que revelou uma regulação positiva de BAFF mediante estímulo de progesterona em células sanguíneas do cordão umbilical fetal, especificamente, mas não em células adultas (LEE et al., 2012).

2 JUSTIFICATIVA

Doenças autoimunes são normalmente crônicas e podem afetar o bem estar físico e psicológico do paciente, trazendo um prejuízo social e profissional em vários graus. Por serem doenças complexas e devido à heterogeneidade de sinais e sintomas, seu diagnóstico e tratamento tendem a ser difíceis, especialmente no caso de LES. Não há no momento tratamentos específicos eficientes, sendo as opções terapêuticas baseadas, principalmente, em corticoides e imunossuppressores inespecíficos, com eficácia variada e diversos efeitos colaterais associados (MANZI et al., 2012). Recentemente, o primeiro medicamento, e o único disponível e aprovado para o tratamento específico de LES em humanos, é o Belimumab, um anticorpo monoclonal, que tem como alvo específico o BAFF (NAVARRA et al., 2011). No entanto, a eficácia do medicamento é limitada a apenas uma fração dos pacientes, provavelmente devido à grande heterogeneidade das manifestações clínicas, que ocorrem como consequência das diferentes vias etiológicas envolvidas no desenvolvimento da doença (DING, 2008).

Uma dessas vias etiológicas está muito provavelmente ligada a fatores hormonais. Estudos recentes relatam que o estradiol pode modular a expressão de BAFF em camundongos (PANCHANATHAN; CHOUBEY, 2013), entretanto tais efeitos são desconhecidos em células humanas. Sabendo da importância de BAFF na modulação do sistema imunológico e as consequências que a sua exacerbação pode causar nos quadros de autoimunidade, no presente estudo, tivemos como objetivo, primeiramente, investigar se homens e mulheres em condições normais expressam quantidades diferenciadas de BAFF, o que poderia explicar, parcialmente, a maior susceptibilidade das mulheres em desenvolver essas doenças. Em adição, tratamos leucócitos humanos de origem feminina e masculina *in vitro* com estradiol e progesterona, a fim de investigar o possível impacto desses hormônios na expressão do gene codificador de BAFF e, assim, poder contribuir para o conhecimento das vias etiológicas de LES e outras doenças autoimunes, um entendimento essencial para o desenvolvimento de tratamentos mais específicos. Em adição, pode contribuir para o conhecimento, atualmente bastante contraditório de acordo com a literatura, da segurança e efeitos de tratamentos exógenos baseados em hormônios, como anticoncepcionais e reposição hormonal, em pacientes com LES e outras doenças autoimunes.

3 Hipótese

O gene *TNFSF13B*, responsável por codificar a citocina BAFF, tem sua expressão induzida pelo estradiol. No caso da progesterona, seu efeito vai depender da dose administrada, sendo que em doses baixas a expressão de BAFF aumenta e, em doses elevadas, esta expressão é suprimida.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Analisar a influência de hormônios femininos, estrógeno e progesterona, na expressão do gene *TNFSF13B* (BAFF), envolvido no desenvolvimento de Lúpus Eritematoso Sistêmico, em leucócitos de homens e mulheres.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar se há diferenças na expressão gênica do *TNFSF13B* entre leucócitos isolados de homens e mulheres em condições normais;
- Analisar, comparativamente, a expressão de BAFF nos leucócitos humanos em condições normais com os leucócitos tratados com hormônios femininos estrógeno e progesterona *in vitro*;
- Analisar essa influência em diferentes condições de concentração e tempos de incubação *in vitro*;
- Analisar se sequência ERE está presente na região promotora do gene *TNFSF13B*, caso a expressão seja induzida pelo estrógeno.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 ASPECTOS ÉTICOS

Este trabalho é um projeto do Laboratório de Polimorfismos Genéticos (LAPOGE/CCB/UFSC) e seu protocolo de estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina (CEPSH-UFSC, número 423,535).

5.2 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

O grupo amostral do presente estudo é constituído por 34 indivíduos saudáveis, sendo 11 homens e 23 mulheres. A diferença do número amostral entre os sexos foi devido à disponibilidade de filtros. As amostras sanguíneas foram doadas para o banco de sangue do Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago (HU-UFSC), vinculado à Universidade Federal de Santa Catarina. Para prevenir reações biológicas, foram removidos os leucócitos sanguíneos com o auxílio de um filtro leucocitário específico, que normalmente é descartado. No presente estudo, foram coletados estes filtros leucocitários, que foram devidamente transportados para o Laboratório de Polimorfismos Genéticos (LAPOGE) do Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), onde ocorreu a extração leucocitária dos filtros para efetuar a posterior análise biológica. Todas as mulheres eram adultas pré-menopáusicas, pois estas se apresentavam em idade reprodutiva, e ambos os sexos tinham idades similares (média de 28,1 anos para mulheres e 30,4 anos para homens).

5.3 PROCESSAMENTO DO MATERIAL BIOLÓGICO

Os indivíduos doaram cerca de 450 mL de sangue periférico para o banco de sangue. Os leucócitos foram removidos do sangue com o auxílio do filtro Leukotrap[®] Pall RCM1. Eles possuem barreiras físicas no seu interior, que consistem em pequenos poros localizados em toda a extensão da fibra, formando uma estrutura semelhante a um labirinto (BORDIN; FABRON JR, 1997). Como os leucócitos possuem maior diâmetro (15 µm), eles ficam retidos nestes poros, enquanto os

componentes sanguíneos menores, como eritrócitos (7 μm) e plaquetas (2 μm) conseguem percorrer o filtro sem maiores impedimentos (VENDRUSCOLO et al., 2012).

Para isolar os leucócitos retidos no filtro, foi utilizado uma solução que lisa os eritrócitos residuais, o Tampão de Lise ACK (do inglês, *ammonium-chloride-potassium*) (Thermo Fisher Scientific®). Desta forma, o filtro foi lavado com esta solução na direção contrária a filtração com o intuito de lisar os eritrócitos e extrair os leucócitos integralmente. Esta solução foi centrifugada a 500 x *g* durante 10 minutos, a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o material contendo os leucócitos foi lavado com PBS (Tampão Fosfato-Salino) e, novamente, centrifugado a 500 x *g* por 10 minutos em temperatura ambiente, formando um precipitado de células leucocitárias.

5.4 CULTURA CELULAR DE LEUCÓCITOS

As células leucocitárias extraídas do filtro de um determinado indivíduo foram, então, ressuspensas ao meio de cultura. Primeiramente, preparou-se uma solução com 45,5 mL de meio de cultura RPMI (do inglês, *Rosewell Park Memorial Institute*) sem vermelho de fenol, pois esta substância assemelha-se a ação de alguns hormônios esteroides (BERTHOIS; KATZENELLENBOGEN; KATZENELLENBOGEN, 1986). Em seguida, este meio de cultura foi suplementado com 4 mL de soro fetal bovino (SFB) (especialmente filtrado para remover qualquer traço hormonal potencialmente presente no soro) e 0,5 mL de antibiótico PEST e armazenado na geladeira.

Nos tubos estéreis com o precipitado leucocitário, foi adicionado 15 mL do meio de cultura suplementado. Uma fração dos leucócitos foi imediatamente recolhida em microtubos e armazenada em Trizol para a extração de RNA, com o intuito de ser o grupo amostral de controle 0h. Numa placa com seis poços para cultura celular, foi adicionado 2 mL da solução contendo os leucócitos em cada poço, em uma concentração de 10^6 células/mL. Em seguida, esta placa foi armazenada em estufa a 37°C e com 5% de CO₂ por um período de 12h para aclimação. As células foram aclimatadas com o intuito de eliminar o efeito causado pela exposição prévia dos hormônios do indivíduo (LÖFGREN, 2012). Após 12h de aclimação, acrescentou-se 2,46 μL de 17 β -estradiol (E2) no primeiro poço; 2,83 μL de progesterona (PG1) no segundo poço e 283 μL de progesterona (PG2) no terceiro poço, seguida da sua homogeneização. Ao final, as amostras tiveram as seguintes

concentrações: E2 (0,1 μM); PG (0,1 μM) e PG (1 μM). O grupo de controle de 12h foi recolhido para a extração de RNA, enquanto no controle de 36h adicionou-se a solução com meio de cultura. Na **Figura 5** está esquematizada a placa utilizada para os ensaios *in vitro*. A placa foi novamente armazenada na estufa a 37°C e com 5% de CO₂ por 24h.

Figura 5. Modelo de placa para cultura de células fabricada em poliestireno Livre de *DNase/RNase*.

E2 (0,1 μM): Estradiol; PG (0,1 μM): progesterona de baixa concentração; PG (1 μM): progesterona de alta concentração; CTRL 12h: controle de 12 horas; CTRL 36h: controle de 36 horas.

O E2 foi utilizado nesta quantidade de acordo com a nossa própria padronização anterior (dados não publicados) e devido ao seu uso extensivo em estudos de estimulação experimental *in vitro* (NEBEL et al., 2010; SHEN et al., 2010; YAHATA et al., 2001). Na PG, por outro lado, relatou-se que é um hormônio que causa um efeito contrastante no sistema imunológico em baixas e altas concentrações (HUGHES, 2012).

Todas as amostras recolhidas no momento de 0h, 12h e 36h (estimulados com hormônio ou não) foram centrifugadas a 800 x g durante cinco minutos. O sobrenadante foi descartado e acrescentou-se 1 mL do Trizol Tri-Reagent[®] (Cat. no. T9424, Sigma) para a extração de RNA (Ácido ribonucleico). Esta solução foi homogeneizada com o intuito de lisar as células e os tubos foram armazenados a -80°C. Todos os hormônios e reagentes utilizados foram adquiridos da companhia Sigma Aldrich.

5.5 EXTRAÇÃO E ISOLAMENTO DO RNA

A extração de RNA foi realizada através de Trizol Tri-Reagent[®], utilizando o protocolo de acordo com as instruções do fabricante. Nas amostras armazenadas com Trizol, adicionou-se 200 μL de clorofórmio seguida da sua homogeneização. Após uma rápida incubação, as amostras são centrifugadas a 12.000 x g por 15 minutos a 4°C. Com o fim desta etapa, observou-se a formação de três fases: uma fase inferior, orgânica e de coloração rosa contendo proteína; uma interfase esbranquiçada, com DNA (Ácido desoxirribonucleico); e uma fase aquosa, incolor, onde estava o RNA. A fase inferior e a interfase foram armazenadas para futuras análises.

A fase aquosa foi transferida para um microtubo estéril, onde se adicionou 500 μL de isopropanol e foi agitada manualmente por inversão. Em seguida, as amostras foram incubadas em temperatura ambiente e centrifugadas a 12.000 x g por 10 minutos a 4°C. Formou-se no fundo e na lateral do microtubo um precipitado de RNA, o *pellet*. O sobrenadante foi removido, lavou-se o *pellet* de RNA com 1 mL de etanol 75% e foi homogeneizado com o auxílio de um vórtex. Depois, as amostras foram centrifugadas a 7.500 x g por um período de cinco minutos a 4°C. Após este período, removeu-se o sobrenadante e o *pellet* de RNA foi seco brevemente com o auxílio de um bloco de aquecimento com o intuito de não diminuir a sua solubilidade.

No final do processo, o *pellet* de RNA foi ressuspendido em 50 μL *UltraPure Distilled Water DNase, RNase, free* (Cat. no. 10977-015, Invitrogen). Para facilitar a dissolução do RNA, o *pellet* foi homogeneizado com a água por pipetagem, incubado no bloco de aquecimento por um período de 10 a 15 minutos numa temperatura entre 55-60 °C. Em seguida, a concentração das amostras foi determinada pela leitura da absorbância em 260 nm ($A_{260\text{ nm}} = 1$, equivalente a 40 μg RNA/ μL) no espectrofotômetro NanoVue[®] (GE Healthcare Life Sciences). A razão entre as leituras em 260 nm e 280 nm foi utilizada como um indicativo da pureza do RNA ($A_{260/280}$: 1,8 \geq 2,0). As amostras foram armazenadas a -80°C. Ao todo, foram obtidas 204 amostras de RNA.

5.6 SÍNTESE DE cDNA (DNA complementar)

Para análise de expressão, as amostras de RNA foram transcritas em cDNA através da reação de Transcrição Reversa (RT-PCR, do inglês

Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction). Todas as etapas deste processo ocorreram no gelo. Para que a concentração de RNA das amostras totalizassem 500 ng em 10 μL de água, elas foram diluídas em *UltraPure Distilled Water DNase, RNase, free*.

Para a transcrição reversa, foi preparado um Master Mix utilizando os reagentes do kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Cat. no. 4368814, Thermo Fisher Scientific®) de acordo com o protocolo do fabricante (**Tabela 2**).

Tabela 2. Reagentes do kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* utilizados na preparação do Master Mix.

Reagente	Quantidade
RT Buffer 10X	2,0 μL
dNTP Mix (100 mM) 25X	0,8 μL
RT Random Primers 10X	2,0 μL
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1,0 μL
Inibidor de RNase	1,0 μL
Nuclease-free H ₂ O	3,2 μL
Total	10 μL

Fonte: Adaptado de (BIOSYSTEMS, 2016).

Em uma placa de 96 poços, foi adicionado 10 μL do Master Mix e 10 μL de amostra de RNA anteriormente diluída, seguida da sua homogeneização. A placa foi selada por um filme adesivo e colocada no termociclador Veriti (Thermo Fisher Scientific®). O programa de ciclagem para a transcrição reversa está apresentado na **Tabela 3**. Após a conclusão da RT-PCR, as amostras de cDNA foram ressuspensas em 50 μL de *UltraPure Distilled Water DNase, RNase, free* e armazenadas a -20°C .

Tabela 3. Programa de ciclagem da RT-PCR.

Passo	Temperatura	Tempo
1° Passo	25°C	10 minutos
2° Passo	42°C	60 minutos
3° Passo	99°C	5 minutos
4° Passo	5°C	5 minutos

Fonte: Adaptado de (BIOSYSTEMS, 2016)

5.7 AMPLIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS POR qPCR

A expressão gênica do *TNFSF13B* foi realizada utilizando o *Master Mix Fast SYBR® Green* PCR (Cat. no. 4385612, Thermo Fisher Scientific®). Os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados (**Tabela 4**) possuem como alvo as duas variantes conhecidas do gene (NM_001145645.2, NM_006573.4), assim como a variante da transcrição predita (XM_005254029), e amplificou um fragmento de 210 pares de base.

Tabela 4. Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados na qPCR para o gene *TNFSF13B* que codifica a citocina BAFF.

Gene	Sequência dos <i>primers</i>
<i>TNFSF13B</i>	<i>Forward Primer</i> (Senso)
	5' CTGGCTGCAACCTTGCTGCT3'
	<i>Reverse Primer</i> (Antissenso)
	5' TGGTTCAAAGATTTTCAGTCCCGC 3'

Ao mensurar a expressão de RNA, podem ocorrer diversos erros ao longo do protocolo experimental que provocam uma quantidade ineficiente de material inicial, diferenças na atividade transicional e presença de inibidores em diferentes amostras (NYGARD et al., 2007). Para controlar essas variáveis os níveis de RNA foram normalizados através da utilização de um gene de referência. Os genes de referência são expressos constantemente em células de diferentes tecidos e sob diferentes condições experimentais. Uma vez que o gene de referência é exposto aos mesmos processos de preparação que o gene de interesse, pode-se normalizar as diferenças na quantidade e quantidade do material inicial, na preparação do RNA e na síntese de cDNA em amostras individuais (DHEDA et al., 2004; NYGARD et al., 2007). Para normalizar a expressão do gene *TNFSF13B*, foi utilizado o gene de referência TBP (Proteína de ligação TATA-box, do inglês *TATA box binding protein*), com os *primers* descritos na **Tabela 5**.

Tabela 5. Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados na qPCR para o gene de referência TBP.

Gene	Sequência dos <i>primers</i>
TBP	<i>Forward Primer</i> (Senso)
	5' CACGAACCACGGCACTGATT 3'
	<i>Reverse Primer</i> (Antissenso)
	5' TCACAGCTCCCCAC CATGTT 3'

Antes de amplificar as amostras através da reação de qPCR, a especificidade das reações foi confirmada pela análise de curvas de dissociação dos *primers*. Para a realização da curva de eficiência foi avaliada a amplificação de um *pool* de todos os cDNAs utilizando-se diluições seriadas (curva padrão: 1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16).

Para amplificar as amostras, as reações de qPCR foram realizadas em um volume final de 20 μ L contendo 8 μ L de água *MiliQ*, 0,5 μ L dos *primers* senso e antissenso, 10 μ L de *Master Mix Fast SYBR[®] Green* e 1 μ L de amostra de cDNA. A placa utilizada continha 96 poços e, em cada poço, foi aplicado 20 μ L deste *Master Mix*. Após selar a placa com filme adesivo óptico compatível com a qPCR, esta placa foi rapidamente centrifugada para eliminar qualquer indício de bolhas de ar e, em seguida, as amostras foram amplificadas pela 7900HT PCR quantitativa em tempo real (qPCR) (Thermo Fisher Scientific[®]). O programa de ciclagem da qPCR submeteu as amostras a uma desnaturação inicial a 95°C por 20 segundos e, em seguida, a 40 ciclos de: 95°C por 1 segundo e 60°C por 20 segundos. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

Na quantificação relativa foi analisado os valores de Cq (*Quantification Cycle*) do gene *TNFSF13B* em relação com os valores de Cq do gene de referência (TBP). Os níveis de expressão foram calculados através da fórmula $2^{-\Delta\Delta Cq}$, onde $\Delta\Delta Cq = \Delta Cq_1$ (amostras tratadas) – ΔCq_2 (controle). Os valores de ΔCq_1 e ΔCq_2 foram obtidos através da fórmula ΔCq_1 (amostras tratadas) = $Cq_{\text{gene-alvo}} - Cq_{\text{gene-referência}}$; ΔCq_2 (controle) = $Cq_{\text{gene-alvo}} - Cq_{\text{gene-referência}}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

5.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O teste não-paramétrico *Wilcoxon Matched-Pairs* foi utilizado para comparar as diferenças estatísticas nos níveis de expressão, utilizando-se o *software GraphPad Prism 7* (disponível em <http://www.graphpad.com>), que também construiu os gráficos de expressão gênica. Este teste foi escolhido pelo fato das amostras não possuírem uma distribuição normal. As diferenças entre os grupos experimentais foram consideradas significativas quando as variações de expressão gênica atingiram valores de $p \leq 0.05$.

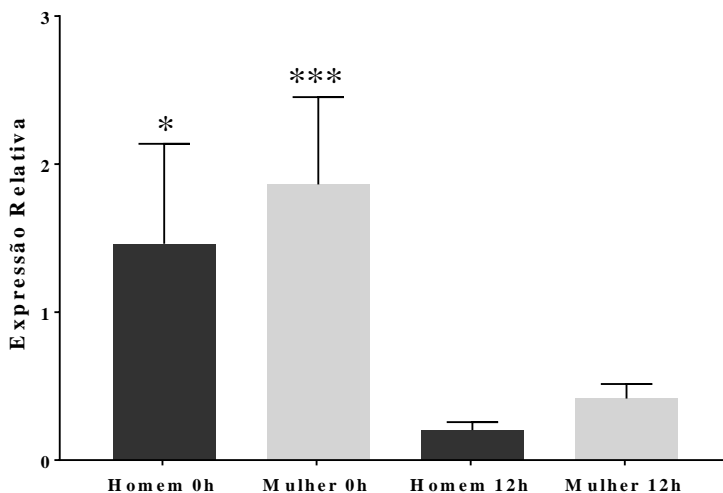
5.9 ANÁLISE DA SEQUÊNCIA GÊNICA DE *TNFSF13B* PARA O ELEMENTO RESPONSIVO DE ESTRÓGENO

A sequência do gene, com cerca de 5kb, foi analisada usando o *Ensembl* (disponível em ensembl.org), buscando-se uma possível sequência ERE completa ou uma porção que se combina com fatores de transcrição e se ligam a locais baseados na literatura (ASABA et al., 2015; BOURDEAU et al., 2004; DRISCOLL et al., 1998).

6 RESULTADOS

Em condições normais (RNA extraído no tempo zero), não foi possível detectar diferença entre homens e mulheres quanto à expressão de BAFF pelas células imunes ($p = 0,1748$) (**Figura 6**). Após 12h de aclimação em meio de cultura RPMI sem vermelho de fenol e suplementado com soro fetal bovino filtrado, a expressão de BAFF pelos leucócitos diminuiu em ambos os sexos, com valor de $p = 0,0156$ para as células masculinas e $p = 0,0007$ para as células femininas.

Figura 6. Níveis normalizados da expressão relativa da molécula de mRNA do gene *TNFSF13B* (BAFF).

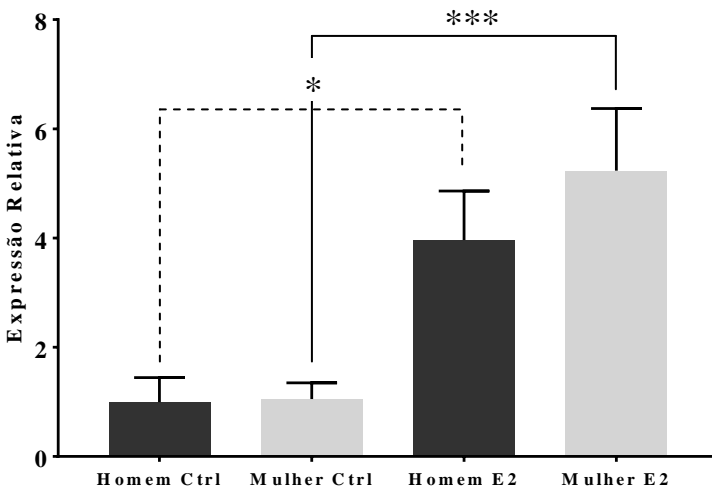


Níveis normalizados da expressão relativa da molécula de mRNA do gene *TNFSF13B* (BAFF) em leucócitos de homens (barra cinza escuro) e mulheres (barra cinza claro) no momento da coleta sanguínea (0h) e após 12h em cultura com RPMI sem vermelho de fenol e soro fetal bovino (SFB) filtrado. A diferença na expressão gênica entre os grupos é mostrada no eixo Y. Os dados representam valores médios com erro padrão da média (SEM, do inglês *Standard Error of Mean*). * $p \leq 0,05$ e *** $p \leq 0,001$ foram considerados significativos.

Quando os leucócitos foram estimulados com estradiol, os níveis de expressão de BAFF aumentaram cinco vezes nos leucócitos ($p < 0,0001$). Analisando as amostras por sexo, observou-se que, as células masculinas tratadas com estradiol, quando comparadas com as amostras

controle masculinas, tiveram um aumento na expressão de BAFF, com valor de $p = 0,0322$. Este aumento também foi visualizado nas células femininas tratadas com estradiol, quando comparadas com as amostras controle femininas, com valor de $p = 0,0003$. Apesar de ambos os sexos apresentarem uma regulação positiva de BAFF, a expressão foi mais acentuada nos leucócitos femininos (**Figura 7**).

Figura 7. Níveis de expressão relativa do mRNA do gene *TNFSF13B* (BAFF) após 36h do grupo de células não estimuladas (CTRL) e após tratamento com 0,1 μ M de Estradiol (E2).

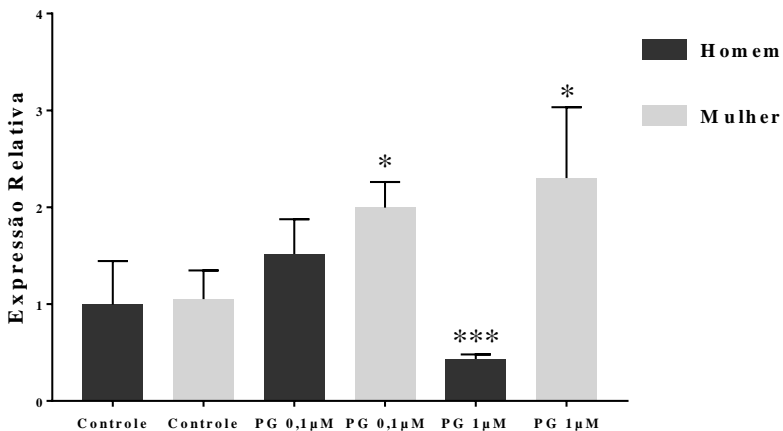


Níveis de expressão relativa do mRNA do gene *TNFSF13B* (BAFF) após 36h (12h de aclimação + 24h com ou sem estimulação estrogênica) em leucócitos de homens (barra cinza escuro) e mulheres (barra cinza claro) no grupo de células não estimuladas (CTRL) e após tratamento com 0,1 μ M de Estradiol (E2). A diferença na expressão gênica entre os grupos é mostrada no eixo Y. Os dados representam valores médios com erro padrão da média (SEM, do inglês *Standard Error of Mean*). * $p \leq 0,05$ e *** $p \leq 0,001$ foram considerados significativos, em relação aos respectivos controles não estimulados.

Para explicar o aumento da expressão de BAFF mediante estímulo de estradiol, buscou-se na região promotora do gene *TNFSF13B* a sequência ERE. Porém, de acordo com nossa análise, esta sequência canônica não está presente, sendo possível localizar apenas a metade de ERE.

Quando as células leucocitárias foram estimuladas com a menor concentração de progesterona (0,1 μM), foi detectado um modesto efeito regulatório positivo nas células femininas, quando comparadas com as amostras de controle femininas ($p = 0,0135$). Nos leucócitos masculinos, não foi possível observar diferenças estatísticas significativas em comparação com as amostras de controle masculinas ($p = 0,2402$). Nos leucócitos estimulados com concentrações mais elevadas de progesterona (1 μM) observou-se que o efeito era dependente de sexo, uma vez que apenas os leucócitos femininos responderam à estimulação e exibiram uma regulação positiva de BAFF ($p = 0,0149$), enquanto que os leucócitos masculinos mostraram uma redução significativa na expressão de BAFF ($p = 0,001$) (**Figura 8**).

Figura 8. Níveis de expressão relativa do mRNA do gene *TNFSF13B* (BAFF) após 36h do grupo de células não estimuladas (controle) e após tratamento com 0,1 ou 1 μM de progesterona (PG).



Níveis de expressão relativa do mRNA do gene *TNFSF13B* (BAFF) após 36h (12h de aclimatação + 24h com ou sem estimulação estrogênica) em leucócitos de homens (barra cinza escuro) e mulheres (barra cinza claro) no grupo de células não estimuladas (controle) e após tratamento com 0,1 ou 1 μM de progesterona (PG). A diferença na expressão gênica entre os grupos é mostrada no eixo Y. Os dados representam valores médios com erro padrão da média (SEM, do inglês *Standard Error of Mean*). * $p \leq 0,05$, e *** $p \leq 0,001$ foram considerados significativos, em relação aos controles não estimulados.

7 DISCUSSÃO

Para se responder ao objetivo geral do presente estudo uma das primeiras respostas obtidas foi sobre se havia diferença natural na expressão de *TNFSF13B* entre homens e mulheres. E, embora a expressão tenha sido ligeiramente maior nas mulheres, não foi possível detectar uma diferença estatística nos ensaios deste trabalho. Uma vez que há provavelmente uma variação nos níveis hormonais dos indivíduos analisados, os leucócitos foram aclimatados em cultura celular durante um período de 12h. A intenção foi de padronizar a expressão gênica (LÖFGREN, 2012), fato que, de acordo com o resultado deste trabalho, ocorreu.

Quando as células foram, então, tratadas com estradiol, pode ser detectado um aumento significativo de mais de cinco vezes na expressão do gene que codifica o BAFF em leucócitos femininos. Nos leucócitos masculinos, apesar do aumento da expressão ter sido menor, ela também foi significativa. Um estudo recente indica que a administração exógena de estradiol aumentou três vezes a expressão de BAFF em esplenócitos de camundongos. Além disso, a expressão também foi mais elevada nas fêmeas (PANCHANATHAN; CHOUBEY, 2013).

Apesar do estradiol ser considerado primariamente hormônio feminino, com funções que regulam a reprodução e comportamento do indivíduo, tanto os receptores de estrógeno quanto os receptores de progesterona foram detectados em diferentes tecidos no sexo masculino e em células imunes localizadas no sangue periférico, como linfócitos e células NK (LUETJENS et al., 2006; PIERDOMINICI et al., 2010). Nas células imunes, a expressão de ER tem sido muito investigada. Os níveis ER α e ER β variam conforme o tipo celular, ER α possui maior expressão em linfócitos T, enquanto ER β se sobressai em linfócitos B. Quando se avalia o parâmetro sexual, a expressão de ER α e ER β nos linfócitos femininos não foi significativamente diferente dos linfócitos masculinos (PHIEL et al., 2005). Os níveis semelhantes de ER em homens e mulheres compactuam com o nosso resultado, que demonstrou que os níveis de BAFF perante estímulo estrogênico aumentaram em ambos os sexos, sem diferenças significativas. O fato do receptor ser igualmente expresso em ambos os sexos possibilita que a transcrição do gene *TNFS13B* seja igualitária em leucócitos masculinos e femininos, o que resulta numa expressão equivalente de BAFF.

O Estradiol pode influenciar a expressão gênica através da sua ligação com receptores de estrógeno (ER). Formado o complexo E2/ER,

este interage com sequências ERE localizadas na região reguladora do gene-alvo, recrutando uma série de proteínas coativadoras que provocam a acetilação de histonas, remodelação da cromatina e recrutamento da maquinaria transcricional, como RNA polimerase II, que resulta na transcrição gênica (BOURDEAU et al., 2004; DRISCOLL et al., 1998; VRTAČNIK et al., 2014). Procurou-se a sequência ERE nas regiões reguladoras do gene que poderia explicar o aumento da expressão induzida pelo estradiol. De acordo com nossa análise, não há uma sequência ERE canônica ou conhecida na proximidade deste gene. No entanto, foi revelado que numerosos genes-alvos conhecidos contêm elementos responsivos cuja sequência varia consideravelmente de uma sequência ERE tradicional. A presença da metade da sequência de ERE é capaz de se ligar ao ER e cooperar com a sinalização celular, embora com uma afinidade reduzida quando comparada com o ERE completo (LONE et al., 2004). Além disso, a resposta ao estradiol pode ser conduzida através da ligação do complexo E2/ER com a metade da sequência ERE em combinação com outros fatores de transcrição, como a proteína estimulante-1 (Sp1, do inglês *Stimulating-protein-1*), o fator nuclear kappa B (NF-κB, do inglês *Nuclear Factor kappa B*) e a proteína ativadora-1 (AP-1, do inglês *Activator Protein 1*), resultando em uma variedade ainda mais complexa (ASABA et al., 2015; LONE et al., 2004). Um mecanismo alternativo é o fato de que os ERs ativados por estradiol podem ativar a transcrição do gene-alvo através da associação indireta com o DNA. Isso ocorre porque os ERs possuem a capacidade de interagir e influenciar a atividade de outros fatores de transcrição, como os citados acima, sem se ligar diretamente ao gene-alvo e sem a presença obrigatória de uma sequência ERE.

Observou-se, também, uma regulação positiva induzida pela progesterona em leucócitos tratados com baixas concentrações de PG (0,1 μM). Os leucócitos femininos tiveram uma expressão modestamente maior em relação aos leucócitos masculinos, contudo não houve uma diferença significativa entre os sexos. Porém, na presença de PG em concentração mais alta (1 μM), a expressão relativa de BAFF nos leucócitos comportou-se de maneira contrastante, dependendo do sexo de origem. Enquanto os leucócitos femininos exibiram uma tendência para o aumento da expressão, os leucócitos de origem masculina responderam ao contrário, com uma redução estatisticamente significativa da expressão de BAFF.

Um efeito semelhante foi observado em células dendríticas plasmocitóides (pDCs, do inglês *Plasmacytoid Dendritic Cells*) expostas

a PG, onde o tratamento induziu o aumento da expressão de *Interferon- α* (IFN- α) através da transcrição de vários genes imunes (HUGHES, 2012). O estudo indica que este aumento de expressão foi maior em pDCs sanguíneas de mulheres saudáveis do que em homens (HUGHES, 2012). Células dendríticas de murinos fêmeas, quando expostas a PG, mostraram ser mais sensíveis aos efeitos pró-inflamatórios da progesterona quando comparadas com as células de murinos machos (BUTTS et al., 2008). Em outro estudo, que utilizou modelos animais de autoimunidade, o tratamento de ratos machos castrados com progesterona mostrou que este hormônio desempenhou um papel protetivo contra o desenvolvimento de doenças autoimunes (HUGHES; CLARK, 2007).

Estes dados corroboram com nossos resultados, uma vez que a expressão de BAFF em leucócitos masculinos decaiu significativamente, apesar do mecanismo por trás dessa regulação negativa ainda não estar elucidado. Além disso, a resposta imunomoduladora de PG na via de IFN- α parece ser dependente da dose administrada. Em doses baixas houve um aumento na produção de IFN- α , enquanto as doses elevadas podem inibir a produção por pCDs em humanos e ratos (HUGHES, 2012). Nossos resultados também exibiram este padrão em leucócitos masculinos, onde baixas doses de PG aumentaram a expressão de *TNFSF13B*, enquanto doses mais elevadas diminuíram a expressão.

A progesterona é um hormônio sexual feminino que também possui receptores nas células imunes do sangue periférico (LUETJENS et al., 2006; PIERDOMINICI et al., 2010). No caso dos PRs, existem dados escassos e inconsistentes quanto à sua expressão em homens e são bastante limitados aos tecidos reprodutivos (LUETJENS et al., 2006). Pode ser que a variação nos níveis de BAFF entre os sexos, em resposta ao estímulo de PG, seja devido aos diferentes níveis ou padrões de expressão dos PRs pelos leucócitos de homens e mulheres.

A expressão elevada de BAFF pode ser observada em amostras séricas de pacientes com LES e outras doenças autoimunes, como LES, Síndrome de Sjögren e Artrite Reumatoide (PERS et al., 2005). Notavelmente, todas estas doenças possuem um viés sexual (WHITACRE, 2001). Contudo, apenas uma porção dos pacientes apresentam os níveis sanguíneos de BAFF elevados (CHEEMA et al., 2001). Provavelmente, a eficácia do medicamento Belimumab na redução dos sinais e sintomas de LES está restrita a apenas uma fração dos pacientes devido a esta característica sérica de BAFF (DING, 2008).

Há mais de um século atrás, quando as primeiras descrições de doenças autoimunes foram registradas, observou-se que as mulheres são mais frequentemente afetadas que os homens. As diferenças sexuais mais marcantes são observadas na Síndrome de Sjögren, doença tireoídiana autoimune e Lúpus Eritematoso Sistêmico (WHITACRE, 2001). Vários estudos recentes têm demonstrado que a interação de diversos componentes, como predisposição genética (cromossomos sexuais, epigenética, microquimerismo e herança paterna), hormônios sexuais podem constituir a base para o desenvolvimento do dimorfismo sexual descrito em doenças autoimunes (LOCKSHIN, 2006). Além da diferença na prevalência entre mulheres e homens, também é relatado que os dois sexos apresentam diferenças nas manifestações da doença (WHITACRE, 2001).

Neste contexto, o papel dos hormônios sexuais na modulação de várias respostas imunes e no desencadeamento e desenvolvimento de doenças autoimunes têm se tornado cada vez mais relevante (HUGHES, 2012; ZANDMAN-GODDARD; PEEVA; SHOENFELD, 2007). Desta forma, é interessante considerar os resultados obtidos neste trabalho sobre o efeito dos hormônios sexuais femininos na expressão de BAFF, principalmente em relação ao uso de contraceptivos orais (CO) baseados em estrógeno e/ou progesterona e reposição hormonal em pacientes de doenças autoimunes.

O uso de CO em pacientes com LES está associado com o aumento do risco de acentuar as erupções características de LES. Em mulheres pacientes de LES com acometimento renal, foi demonstrado que, após serem medicadas com CO, houve uma exacerbação de nefrite lúpica (JUNGERS et al., 1982). Porém, há relatos de resultados contrastantes, onde não houve diferenças significativas nas taxas de erupções entre pacientes usuários de CO com pacientes não usuários (DUARTE; INÊS, 2010). A segurança destes contraceptivos tem sido estabelecida de uma maneira geral, porém estas inconsistências fazem com seja necessário analisar as respostas individuais e os contextos biológicos que estas substâncias exógenas se inserem para que seu uso seja adequado conforme o histórico da paciente. Pode ser que a utilização de hormônios femininos exógenos em pacientes de LES que possuem expressão elevada de BAFF ou que seja responsiva ao tratamento com Belimumab deva ser analisada com maior cautela.

8 PRINCIPAIS RESULTADOS

- Em condições normais, os leucócitos femininos expressaram níveis modestamente maiores de BAFF do que os leucócitos masculinos, porém essa diferença entre os sexos foi estaticamente insignificante.
- Mediante estímulo com estradiol, foi observado um aumento de cinco vezes na expressão de BAFF nos leucócitos. Essa regulação positiva foi observada em células de origem masculina e feminina, porém mais acentuada em células de origem feminina.
- Em doses baixas, a progesterona induziu um aumento modesto dos níveis de BAFF nos leucócitos de ambos os sexos, sem diferenças significativas entre homens e mulheres.
- Altas doses de progesterona levaram a um aumento significativo da expressão de BAFF em leucócitos femininos porém menor do que estradiol.
- Em doses altas de progesterona, foi possível observar diferenças entre os sexos. Enquanto nos leucócitos femininos a progesterona parece estimular a expressão de BAFF, nos leucócitos masculinos ela tende a ter um efeito supressor, provocando a diminuição da expressão.
- Mesmo na ausência de elementos responsivos ao estrôgenio canônicos na sequência regulatória do gene, os resultados obtidos sugerem que o estradiol pode induzir indiretamente a transcrição de genes importantes no desenvolvimento da autoimunidade como o *TNFSF13B*.

9 CONCLUSÃO

O estradiol pode induzir, indiretamente, a transcrição de gene *TNFSF13B*, responsável por codificar a citocina BAFF, e aumentar sua expressão em até cinco vezes. Com isso, confirmou-se que este hormônio possui um papel relevante na modulação do sistema imunológico, mais precisamente na via de BAFF.

A progesterona, por sua vez, possui seu efeito dependente de dose. Em doses baixas, induz um aumento modesto em ambos os sexos. Porém, sob doses elevadas, as mulheres apresentam aumento na expressão, enquanto nos homens este hormônio possui efeito supressor.

Os dados gerados neste estudo contribuem para a compreensão das vias etiológicas envolvidas nas doenças autoimunes, principalmente nas questões relacionadas com seu viés sexual, como no caso de LES. Além disso, apoiam o modelo científico de que os hormônios sexuais femininos podem modular o sistema imunológico, possivelmente incluindo a via de BAFF, de modo a aumentar o risco de desenvolver uma doença autoimune em indivíduos geneticamente susceptíveis. Nossos resultados também podem contribuir com o embasamento científico na discussão sobre o uso de estrógeno e progesterona exógenos por pacientes com doenças autoimunes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL GALIL, S. M.; EZZELDIN, N.; EL-BOSHY, M. E. The role of serum IL-17 and IL-6 as biomarkers of disease activity and predictors of remission in patients with lupus nephritis. **Cytokine**, v. 76, n. 2, p. 280–287, 2015.

AGMON-LEVIN, N. et al. Systemic lupus erythematosus one disease or many? **Autoimmunity Reviews**, v. 11, n. 8, p. 593–595, 2012.

AMUR, S.; PAREKH, A.; MUMMANENI, P. Sex differences and genomics in autoimmune diseases. **Journal of Autoimmunity**, v. 38, n. 2–3, p. J254–J265, 2012.

ARBUCKLE, M. R. et al. Rapid clinical progression to diagnosis among African-American men with systemic lupus erythematosus. **Lupus**, v. 12, n. 2, p. 99–106, 2003.

ASABA, J. et al. Estrogen receptor signal in regulation of B cell activation during diverse immune responses. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 68, p. 42–47, 2015.

BERTHOIS, Y.; KATZENELLENBOGEN, J. A.; KATZENELLENBOGEN, B. S. Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen: implications concerning the study of estrogen-responsive cells in culture. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 83, n. 8, p. 2496–500, 1986.

BERTSIAS, G.; CERVERA, R.; BOUMPAS, D. T. Systemic Lupus Erythematosus: Pathogenesis and Clinical Features. **Eular On-line Course on Rheumatic Diseases**, n. 1909, p. 476–505, 2012.

BIOSYSTEMS, A. **High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits ProtocolDesign**, 2016.

BOODHOO, K. D.; LIU, S.; ZUO, X. Impact of sex disparities on the clinical manifestations in patients with systemic lupus erythematosus. **Medicine**, v. 95, n. 29, p. e4272, 2016.

BORDIN, J. O.; FABRON JR, A. Aplicação clínica de filtros leucocitários. **Rev Ass Med Brasil**, p. 205–208, 1997.

BOUMAN, A.; JAN HEINEMAN, M.; FAAS, M. M. Sex hormones and the immune response in humans. **Human Reproduction Update**, v. 11, n.

4, p. 411–423, 2005.

BOURDEAU, V. et al. Genome-wide identification of high-affinity estrogen response elements in human and mouse. **Molecular Endocrinology**, v. 18, n. 6, p. 1411–1427, 2004.

BRINK, R. Regulation of B cell self-tolerance by BAFF. **Seminars in Immunology**, v. 18, n. 5, p. 276–283, 2006.

BUTTS, C. L. et al. Inhibitory Effects of Progesterone Differ in Dendritic Cells from Female and Male Rodents. **Gend Med**, v. 5, n. 4, p. 434–447, 2008.

CERVERA, R. et al. Direct cost of management and treatment of active systemic lupus erythematosus and its flares in Spain: the LUCIE Study. **Revista clínica española**, v. 213, n. 3, p. 127–37, 2013.

CHEEMA, G. S. et al. Elevated Serum B Lymphocyte Stimulator Levels in Patients With Systemic Immune-Based Rheumatic Diseases. **Arthritis & Rheumatism**, v. 44, n. 6, p. 1313–1319, 2001.

CHOI, S.-C.; MOREL, L. B cell contribution of the CD4⁺ T cell inflammatory phenotypes in systemic lupus erythematosus. **Autoimmunity**, v. 50, n. 1, p. 37–41, 2017.

CRISPÍN, J. C. et al. Expanded Double Negative T Cells in Patients with Systemic Lupus Erythematosus Produce IL-17 and Infiltrate the Kidneys. **J Immunol**, v. 181, n. 12, p. 8761–8766, 2008.

CRUVINEL, W. M. et al. Natural regulatory T cells in rheumatic diseases. **Rev Bras Reumatol**, v. 48, n. 6, p. 342–355, 2008.

CUTOLO, M. et al. Sex hormones influence on the immune system: basic and clinical aspects in autoimmunity. **Lupus**, v. 13, n. 9, p. 635–638, 2004.

D'CRUZ, D. Autoimmune diseases associated with drugs, chemicals and environmental factors. **Toxicology Letters**, v. 112–113, p. 421–432, 2000.

DANCHENKO, N.; SATIA, J. A.; ANTHONY, M. S. Epidemiology of systemic lupus erythematosus: a comparison of worldwide disease burden. **Lupus**, v. 15, n. 5, p. 308–318, 2006.

DHEDA, K. et al. Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. **BioTechniques**, v. 37, n. 1, p. 112–119, 2004.

- DING, C. Belimumab, an anti-BLyS human monoclonal antibody for potential treatment of inflammatory autoimmune diseases. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 8, n. 11, p. 1805–1814, 2008.
- DORIA, A. et al. Autoinflammation and autoimmunity: Bridging the divide. **Autoimmunity Reviews**, v. 12, n. 1, p. 22–30, 2012.
- DRISCOLL, M. D. et al. Sequence requirements for estrogen receptor binding to estrogen response elements. **The Journal of biological chemistry**, v. 273, n. 45, p. 29321–29330, 1998.
- DUARTE, C.; INÊS, L. Oral contraceptives and systemic lupus erythematosus: What should we advise to our patients? **Acta Reumatologica Portuguesa**, v. 35, n. 2, p. 133–140, 2010.
- ELBOURNE, K. B.; KEISLER, D.; MCMURRAY, R. W. Differential effects of estrogen and prolactin on autoimmune disease in the NZB/NZW F1 mouse model of systemic lupus erythematosus. **Lupus**, v. 7, n. 6, p. 420–427, 1998.
- GARCIA, M. et al. Male systemic lupus erythematosus in a Latin-American inception cohort of 1214 patients. **Lupus**, v. 14, p. 938–946, 2005.
- GREGERSEN, P. K.; BEHRENS, T. W. Genetics of autoimmune diseases — disorders of immune homeostasis. **Nature Reviews Genetics**, v. 7, n. 12, p. 917–928, 2006.
- GRIMALDI, C. M. Sex and systemic lupus erythematosus: the role of the sex hormones estrogen and prolactin on the regulation of autoreactive B cells. **Current opinion in rheumatology**, v. 18, p. 456–461, 2006.
- HENGEVELD, P. J.; KERSTEN, M. J. B-cell activating factor in the pathophysiology of multiple myeloma: a target for therapy? **Blood Cancer Journal**, v. 5, n. 2, p. e282, 2015.
- HUGHES, G. C. Progesterone and Autoimmune Disease. **Autoimmun Rev**, v. 11, p. 1–28, 2012.
- HUGHES, G. C.; CLARK, E. Regulation of dendritic cells by female sex steroids: Relevance to immunity and autoimmunity*. **Autoimmunity**, v. 40, n. 6, p. 470–481, 2007.
- ITOH, M. et al. Thymus and Autoimmunity: Production of CD25 +CD4+ Naturally Anergic and Suppressive T Cells as a Key Function of the

Thymus in Maintaining Immunologic Self-Tolerance. **J Immunol**, v. 162, n. 9, p. 5317–5326, 1999.

JANEWAY, C. A.; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annual Review of Immunology**, v. 20, n. 1, p. 197–216, 2002.

JOSEFOWICZ, S. Z.; LU, L. F.; RUDENSKY, A. Y. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. **Annu Rev Immunol**, v. 30, p. 531–564, 2012.

JUNGERS, P. et al. INFLUENCE OF ORAL CONTRACEPTIVE THERAPY ON THE ACTIVITY OF SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS. **Arthritis & Rheumatism**, v. 25, n. 6, p. 618–623, 1982.

KALLED, S. L. The role of BAFF in immune function and implications for autoimmunity. **Immunological Reviews**, v. 204, p. 43–54, 2005.

KASPER, D. L. et al. Harrison's Principles of Internal Medicine. In: **Harrison's Principles of Internal Medicine**. 19. ed. Nova Iorque: McGraw-Hill Education, 2015. v. Iip. 2124–2126.

KUMAR, V. et al. **Robbins e Cotran: Patologia - Bases patológicas das doenças**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

KUNZ, M. Lupus erythematosus. Part I: epidemiology, genetics and immunology. **Journal of the German Society of Dermatology**, v. 11, n. 8, p. 709–720, 2013.

LAHIRI, A. et al. The complexity of the BAFF TNF-family members: Implications for autoimmunity. **Journal of Autoimmunity**, v. 39, n. 3, p. 189–198, 2012.

LEE, J. H. et al. Progesterone promotes differentiation of human cord blood fetal T cells into T regulatory cells but suppresses their differentiation into Th17 cells. **J Immunol**, v. 187, n. 4, p. 1778–1787, 2012.

LETTRE, G.; RIOUX, J. D. Autoimmune diseases: Insights from genome-wide association studies. **Human Molecular Genetics**, v. 17, n. R2, p. 116–121, 2008.

LIED, G. A.; BERSTAD, A. Functional and Clinical Aspects of the B-Cell-Activating Factor (BAFF): A Narrative Review. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 73, p. 1–7, 2011.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

LLEO, A. et al. Definition of human autoimmunity - autoantibodies versus autoimmune disease. **Autoimmunity Reviews**, v. 9, n. 5, p. 259–266, 2010.

LOCKSHIN, M. D. Sex Differences in Autoimmune Disease. **Orthopedic Clinics of North America**, v. 37, n. 4, p. 629–633, 2006.

LÖFGREN, S. E. **Functional Role of Genetic Polymorphisms Associated with Systemic Lupus Erythematosus**. [s.l.] Uppsala University, 2012.

LONE, R. O. et al. Genomic Targets of Nuclear Estrogen Receptors. **Molecular Endocrinology**, v. 18, n. 8, p. 1859–1875, 2004.

LUETJENS, C. M. et al. Tissue expression of the nuclear progesterone receptor in male non-human primates and men. **Journal of Endocrinology**, v. 189, n. 3, p. 529–539, 2006.

MACKAY, F.; BROWNING, J. L. BAFF: A fundamental survival factor for B cells. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 7, p. 465–475, jul. 2002.

MANZI, S. et al. Effects of belimumab, a B lymphocyte stimulator-specific inhibitor, on disease activity across multiple organ domains in patients with systemic lupus erythematosus: combined results from two phase III trials. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 71, n. 11, p. 1833–1838, 2012.

MARINO, M.; GALLUZZO, P.; ASCENZI, P. Estrogen Signaling Multiple Pathways to Impact Gene Transcription. **Current Genomics**, v. 7, p. 497–508, 2006.

MARRACK, P.; KAPPLER, J.; KOTZIN, B. L. Autoimmune disease : why and where it occurs. **Nature Medicine**, v. 7, n. 8, p. 899–905, 2001.

MARTÍNEZ, A. C.; ALVAREZ-MON, M. O sistema imunológico (I): Conceitos gerais, adaptação ao exercício físico e implicações clínicas / Immunological system: general concepts, exercise adaptation and its clinical implications. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 5, n. 3, p. 120–125, 1999.

MILLS, J. A. Systemic lupus erythematosus. **The New England Journal of Medicine**, v. 330, n. 26, p. 1871–1879, 1994.

MORAWSKI, P. A.; BOLLAND, S. Expanding the B Cell-Centric View of Systemic Lupus Erythematosus. **Trends in Immunology**, v. xx, p. 1–10, 2017.

MOREL, L. Immunometabolism in systemic lupus erythematosus. **Nature Reviews Rheumatology**, 2017.

MOSER, K. L. et al. Recent insights into the genetic basis of systemic lupus erythematosus. **Genes Immun.**, v. 10, n. 5, p. 373–379, 2009.

MOUNTZ, J. D. et al. Autoimmune disease: A Problem of Defective Apoptosis. **Arthritis & Rheumatism**, v. 37, n. 10, p. 1415–1420, 1994.

MOURA FILHO, J. P. et al. Lupus erythematosus: Considerations about clinical, cutaneous and therapeutic aspects. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 89, n. 1, p. 118–125, 2014.

MURPHY, K. et al. **Imunobiologia de Janeway**. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

NAVARRA, S. V. et al. Efficacy and safety of belimumab in patients with active systemic lupus erythematosus: A randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. **The Lancet**, v. 377, n. 9767, p. 721–731, 2011.

NEBEL, D. et al. Differential regulation of chemokine expression by estrogen in human periodontal ligament cells. **Journal of Periodontal Research**, v. 45, n. 6, p. 796–802, 2010.

NYGARD, A. B. et al. Selection of reference genes for gene expression studies in pig tissues using SYBR green qPCR. **BMC Mol Biol**, v. 8, p. 67, 2007.

ORTONA, E. et al. Sex hormones and gender disparity in immunity and autoimmunity. **Ital J Gender-Specific Med**, v. 1, n. 2, p. 45–50, 2015.

PALAGINI, L. et al. Depression and systemic lupus erythematosus: a systematic review. **Lupus**, v. 22, n. 5, p. 409–16, 2013.

PANCHANATHAN, R.; CHOUBEY, D. Murine BAFF expression is up-regulated by estrogen and interferons: Implications for sex bias in the development of autoimmunity. **Molecular Immunology**, v. 53, n. 1–2, p. 15–23, 2013.

PARK, J. W. et al. Bone marrow analysis of immune cells and apoptosis in

patients with systemic lupus erythematosus. **Lupus**, v. 23, p. 975–985, 2014.

PENNELL, L. M.; GALLIGAN, C. L.; FISH, E. N. Sex affects immunity. **Journal of Autoimmunity**, v. 38, n. 2–3, p. J282–J291, 2012.

PERS, J. O. et al. BAFF overexpression is associated with autoantibody production in autoimmune diseases. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1050, n. 33, p. 34–39, 2005.

PHIEL, K. L. et al. Differential estrogen receptor gene expression in human peripheral blood mononuclear cell populations. **Immunology Letters**, v. 97, n. 1, p. 107–113, 2005.

PIERDOMINICI, M. et al. Estrogen receptor profiles in human peripheral blood lymphocytes. **Immunology Letters**, v. 132, n. 1–2, p. 79–85, 2010.

PILLAI, S.; MATTOO, H.; CARIAPPA, A. B cells and Autoimmunity. **Curr Opin Immunol**, v. 23, n. 6, p. 721–731, 2011.

RUBTSOV, A. V. et al. Genetic and hormonal factors in female-biased autoimmunity. **Autoimmunity Reviews**, v. 9, n. 7, p. 494–498, 2010.

RUBTSOV, A. V. et al. Genetic and hormonal factors in female-biased autoimmunity. **Autoimmun Rev**, v. 9, n. 7, p. 494–498, 2011.

SARZI-PUTTINI, P. et al. Environment and systemic lupus erythematosus: an overview. **Autoimmunity**, v. 38, n. 7, p. 465–72, 2005.

SAWANT, D. V.; VIGNALI, D. A. A. Once a Treg, always a Treg? **Immunological Reviews**, v. 259, n. 1, p. 173–191, 2014.

SCHWARTZMAN-MORRIS, J.; PUTTERMAN, C. Gender differences in the pathogenesis and outcome of lupus and of lupus nephritis. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2012, 2012.

SHEN, H. et al. Gender-dependent expression of murine Irf5 gene: Implications for sex bias in autoimmunity. **Journal of Molecular Cell Biology**, v. 2, n. 5, p. 284–290, 2010.

SHLOMCHIK, M. J.; CRAFT, J. E.; MAMULA, M. J. From T to B and back again: positive feedback in systemic autoimmune disease. **Nature reviews. Immunology**, v. 1, n. 2, p. 147–153, 2001.

SMITH, E. .; SHMERLING, R. . The American College of Rheumatology criteria for the classification of systemic lupus erythematosus : Strengths , weaknesses, and opportunities for improvement. **Lupus**, v. 8, p. 586–595, 1999.

SOUZA, A. W. S. DE et al. Sistema imunitário: parte III. O delicado equilíbrio do sistema imunológico entre os pólos de tolerância e autoimunidade. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 11, p. 665–679, 2010.

STRITESKY, G. L.; JAMESON, S. C.; HOGQUIST, K. A. Selection of self-reactive T cells in the thymus. **Annu Rev Immunol**, v. 30, n. 7, p. 95–114, 2012.

TAN, I. J.; PEEVA, E.; ZANDMAN-GODDARD, G. Hormonal modulation of the immune system - A spotlight on the role of progestogens. **Autoimmunity Reviews**, v. 14, n. 6, p. 536–542, 2014.

TANGYE, S. G. et al. BAFF, APRIL and human B cell disorders. **Seminars in Immunology**, v. 18, n. 5, p. 305–317, 2006.

TEDESCHI, S. K.; BERMAS, B.; COSTENBADER, K. H. Sexual disparities in the incidence and course of SLE and RA. **Clinical Immunology**, v. 149, n. 2, p. 211–218, 2013.

TSOKOS, G. C. et al. New insights into the immunopathogenesis of systemic lupus erythematosus. **Nat Rev Rheumatol**, v. 12, n. 12, p. 716–730, 2016.

VENDRUSCOLO, C. P. et al. Avaliação da eficácia de diferentes protocolos de preparo do Plasma Rico em Plaquetas para uso em Medicina Equina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 2, p. 106–110, 2012.

VRTAČNIK, P. et al. The many faces of estrogen signaling. **Biochemia Medica**, v. 24, n. 3, p. 329–342, 2014.

WALLING, H. W.; SONTHEIMER, R. D. Cutaneous lupus erythematosus: issues in diagnosis and treatment. **American journal of clinical dermatology**, v. 10, n. 6, p. 365–381, 2009.

WEI, F.; CHANG, Y.; WEI, W. The role of BAFF in the progression of rheumatoid arthritis. **Cytokine**, v. 76, n. 2, p. 537–544, 2015.

WHITACRE, C. C. Sex differences in autoimmune disease. **Nature**

immunology, v. 2, n. 9, p. 777–780, 2001.

YAHATA, T. et al. Selective coactivation of estrogen-dependent transcription by CITED1 CBP/p300-binding protein. **Genes and Development**, v. 15, n. 19, p. 2598–2612, 2001.

ZANDMAN-GODDARD, G.; PEEVA, E.; SHOENFELD, Y. Gender and autoimmunity. **Autoimmunity Reviews**, v. 6, n. 6, p. 366–372, 2007.

ZHARKOVA, O. et al. Pathways leading to an immunological disease: systemic lupus erythematosus. **Rheumatology**, v. 56, n. suppl_1, p. i55–i66, 2017.

ZHOU, Y. et al. T cell CD40LG gene expression and the production of IgG by autologous B cells in systemic lupus erythematosus. **Clinical immunology**, v. 132, n. 3, p. 362–70, 2009.

**APÊNDICE A – Artigo científico referente ao presente trabalho
publicado na revista científica *Biochemical Genetics***


Author's personal copy

Biochem Genet
DOI 10.1007/s10528-016-9752-y



ORIGINAL ARTICLE

BAFF Expression is Modulated by Female Hormones in Human Immune Cells

Manuela N. Drehmer¹ · Dalila G. Suterio¹ ·
Yara C. N. Muniz¹ · Iliada R. de Souza¹ ·
Sara E. Löfgren¹ 

Received: 30 March 2016 / Accepted: 8 June 2016
© Springer Science+Business Media New York 2016

Abstract Among several autoimmune diseases, one of the main risk factors is the female gender, and much consideration has been given to the involvement of female hormones in their etiology. B-cell activating factor (BAFF) is a key factor in survival and maturation of B cells and is overexpressed in several autoimmune patients although the mechanism behind this feature is unclear. In murine models, BAFF expression could be upregulated by exogenous estrogen treatment in splenocytes; however, no evidence of this relationship was available in humans. Here, leukocytes from healthy male and female individuals were collected and cultivated in the presence or absence of estrogen or progesterone. BAFF gene expression was accessed by quantitative PCR and compared between treated and untreated group of cells. In the presence of estrogen, BAFF expression was upregulated by more than 5 times in both genders. When exposed to progesterone, the female-originated cells showed increased expression, while the cells of male origin a significant down-regulation of BAFF. Our results suggest that female hormones can modulate the expression of BAFF, a key cytokine in autoimmune pathways, in human immune cells. These data might contribute to the understanding of the etiology as well as the gender bias featured by several autoimmune disorders.

Keywords Autoimmune disease · BAFF · Gene expression · Female hormones · Expertise in immunology · Immunogenetics

APÊNDICE B – Artigo científico relacionado ao tema do trabalho, publicado na revista científica *Lupus*

Lupus (2016) 0, 1–5
<http://lup.sagepub.com>

PAPER

Estrogen receptor alpha gene (*ESR1*) polymorphism can contribute to clinical findings in systemic lupus erythematosus patients

MN Drehmer¹, D Andrade¹, IA Pereira², AR Marrero¹, YCN Muniz¹, IR de Souza¹ and SE Löfgren¹

¹Federal University of Santa Catarina, Department of Cell Biology, Embryology and Genetics, Florianópolis, Brazil; and ²University Hospital, Rheumatology division, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil

Background: Estrogens have a modulatory effect on several immune responses, many of which are correlated to autoimmune diseases. Estrogens act through binding to their receptors, and an overexpression of these receptors has been identified in patients with different autoimmune diseases. Here we analyzed the association of a putative functional genetic variant in the main estrogen receptor (ER α) gene (*ESR1*), and the susceptibility to clinical findings and severity of SLE. **Methods:** A total of 426 individuals (266 healthy controls and 160 SLE patients) were genotyped for the polymorphism rs2234693 in the *ESR1* gene. Allele and genotype frequencies were calculated and analyzed between cases and controls using Unphased software. **Results:** The SNP rs2234693 was not associated with SLE per se but the minor allele rs2234693-C was correlated with the presence of nephritis and discoid skin rash. On the other hand, the rs2234693-CC genotype was correlated with the absence of arthritis as well as anti-ANA and anti-RNP autoantibodies. The comprehensive clinical analysis of these patients revealed a more severe status of the disease, characterized by a younger age of onset and higher number of organs involved when compared to European populations. **Conclusions:** Minor allele rs2234693-C was associated with renal and cutaneous involvement, as well as the absence of arthritis, anti-ANA and anti-RNP autoantibodies. *Lupus* (2016) 0, 1–5.

Key words: Systemic lupus erythematosus; *ESR1*; estrogen receptor gene; female hormone; genetic association

Introduction

The prevalence of several autoimmune diseases (ADs) differs in relation to gender, with women usually more susceptible, especially during child-bearing age. Systemic lupus erythematosus (SLE) is a good example in which about 80% to 90% of the patients are female.¹ The molecular reasons underlying this higher frequency in women are unclear; however, much attention has been given to the influence of female hormones in immune-related pathways and its role in AD susceptibility.²

Estrogens are the most important female hormones, produced endogenously mostly during the reproductive years. The effect of estrogens are mediated through estrogen receptors (ER- α and

ER- β), which are ligand-dependent transcription factors and currently well known to influence the expression of numerous target genes, including several that are immune related.³ Deficiency of ER α in lupus-prone murine strains prolonged survival, reduced proteinuria, and reduced the renal pathology score, compared to wild-type mice.⁴ In addition, analysis of peripheral blood mononuclear cells from patients with SLE has shown increased levels of ER α messenger RNA (mRNA) expression compared to healthy controls, although there are some controversies among studies.² This higher expression can cause different responsiveness to this hormone leading to an overactive estrogen signaling pathway, with a possible etiological role. In the context of ADs not only the endogenous estrogens are relevant but their exogenous administration is another important issue. Although there are some controversies, the use of estrogen-based oral contraceptive and hormonal replacement therapy is considered safe in SLE patients.^{1,5} It is well known that SLE is a heterogeneous disease, with different

Correspondence to: SE Löfgren, Federal University of Santa Catarina, Department of Cell Biology, Embryology and Genetics, Centro de Ciências Biológicas (CCB), Sala 301B, Florianópolis, 88040-900, Brazil.

E-mail: sara.emelie@gmail.com

Received 16 May 2016; accepted 16 August 2016

© The Author(s). 2016. Reprints and permissions: <http://www.sagepub.co.uk/journalsPermissions.nav>

10.1177/0961203116668041