

UFRRJ

**INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

DISSERTAÇÃO

**Papel dos linfócitos B-1 na imunopatogênese do Lúpus
eritematoso sistêmico**

Amanda Couto Silva

2021



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**PAPEL DOS LINFÓCITOS B-1 NA IMUNOPATOGENESE DO LÚPUS
ERITEMATOSO SISTÊMICO**

AMANDA COUTO SILVA

Sob a Orientação da Professora

Débora Decote Ricardo de Lima

E Co-orientação do Professor

Célio Freire Geraldo de Lima

Dissertação submetida como requisito
parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências, no curso de Pós-
Graduação em Ciências Veterinárias

Seropédica, RJ

Setembro de 2021

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica
elaborada com os dados
fornecidos pelo(a) autor(a)

S586p Silva, Amanda Couto 1995-
Papel dos linfócitos B-I na imunopatogênese
do Lúpus eritematoso sistêmico / Amanda Couto
Silva. Seropédica, 2021. 86 f. .

Orientadora: Débora Decote Ricardo de Lima .
Coorientadora: Célio Freire Geraldo de Lima .
Dissertação (Mestrado) . Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, Programa de pós
graduação em Ciências Veterinárias, 2021.

1. Linfócitos B-I. 2. Lúpus eritematoso sistêmico
3. Imunomodulação. 4. Autoimunidade. I. Lima, Débora
Decote Ricardo de 1965 orient. II. Lima, Célio
Freire Geraldo de 1968 coorient. III Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de pós
graduação em Ciências Veterinárias. IV. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



ATA Nº 4164 / 2021 - PPGCV (12.28.01.00.00.00.50)

Nº do Protocolo: 23083.067814/2021-90

Seropédica-RJ, 20 de setembro de 2021.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
AMANDA COUTO SILVA

Tese submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestra em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 20/09/2021

Conforme deliberação número 001/2020 da PROPPG, de 30/06/2020, tendo em vista a implementação de trabalho remoto e durante a vigência do período de suspensão das atividades acadêmicas presenciais, em virtude das medidas adotadas para reduzir a propagação da pandemia de Covid-19, nas versões finais das teses e dissertações as assinaturas originais dos membros da banca examinadora poderão ser substituídas por documento(s) com assinaturas eletrônicas. Estas devem ser feitas na própria folha de assinaturas, através do SIPAC, ou do Sistema Eletrônico de Informações (SEI) e neste caso a folha com a assinatura deve constar como anexo ao final da tese/dissertação.

(Assinado digitalmente em 20/09/2021 16:16)
DEBORA DECOTE RICARDO DE LIMA
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DMIV (12.28.01.00.00.00.54)
Matricula: 1222756

(Assinado digitalmente em 20/09/2021 14:53)
LUCIA HELENA PINTO DA SILVA
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DMIV (12.28.01.00.00.00.54)
Matricula: 1545840

(Assinado digitalmente em 21/09/2021 14:23)
HELOISA D1 AVILA DA SILVA BIZARRO
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 009.090.326-96

Para verificar a autenticidade deste documento entre em <https://sipac.ufrrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: **4164**, ano: **2021**, tipo: **ATA**, data de emissão: **20/09/2021** e o código de verificação: **bd66321f83**

Agradecimentos

Meus agradecimentos aos meus pais Roselene Camilo Couto da Silva e Rogério Henrique da Silva pelo apoio e incentivo durante as minhas escolhas profissionais e pessoais. Tenho sorte de ter pais presentes, acolhedores e que estão comigo para o que der e vier. Amo muito vocês.

Meus agradecimentos a minha orientadora Débora Decote Ricardo de Lima e o coorientador Célio Freire Geraldo de Lima, por toda paciência, oportunidades, conhecimentos concedidos e compreensão, todos fundamentais para minha formação profissional e pessoal.

Agradeço a Julia Talarico Matos que me acompanhou em todo o mestrado, me dando apoio, incentivo e que foi fundamental para a realização desse trabalho. No início do mestrado ganhei uma IC que iria me acompanhar e no fim ganhei uma grande amiga que pretendo levar para o resto da vida. Você foi um presente.

Ao meu noivo, Thiago de Oliveira pelo companheirismo e compreensão. Obrigada por estar presente em todos os momentos. Fico muito feliz em ter alguém ao meu lado tão incrível que me incentiva a ir atrás dos meus sonhos.

A técnica de laboratório e amiga Renata de Sant'Anna Rezende Ribeiro por todas as conversas, paciência, companhia, risadas e ajuda técnica em todos esses anos. Sentirei sua falta.

Aos companheiros do Laboratório de Imunologia e Virologia da Rural por todos os momentos de descontração, cafezinhos e ajuda. E aos companheiros do Laboratório de imunomodulação da UFRJ, em especial a Isabel F. La Rocque de Freitas, Luciana Conde, Brenda Alves de Sousa e ao Elias Barbosa por toda a paciência e colaboração no desenvolvimento e execução das técnicas utilizadas na confecção desse trabalho.

A professora Christina Maeda Takiya do Laboratório de Imunologia Celular e de Imunopatologia da UFRJ, que foi essencial para a análise histológica. Obrigada pela supervisão e auxílio no meio da pandemia. Agradeço ao Anderson Nocchi Nicacio, e a professora Adriana Ventura que também foram importantes para execução desta técnica.

A pessoas queridas como a Neide Arruda, Amanda Faustino, e Thiago Vidotto que contribuíram para a construção desta dissertação. E aos meus grandes amigos Carolina Van der Meer, Keila Samira, Amanda, Larissa Calderaro, Nicolli, Pedro, Thayná, Rafa, Tainá e Gabi que me dão apoio, trazendo alegria e motivação nos dias difíceis.

Por fim, agradeço ao meu cachorro Oddy por todos os momentos felizes nesses 12 anos e ser o motivo de eu estar na Rural hoje.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 agradeço o financiamento desta pesquisa.

“A beleza de ser um eterno aprendiz”

- Gonzaguinha

RESUMO

SILVA, Amanda Couto. **Papel dos linfócitos B-1 na imunopatogênese do Lúpus eritematoso sistêmico.** 2021. 86p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2021.

O Lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença autoimune crônica que acomete cães, gatos, cavalos, humanos e primatas. A patogênese é multifatorial, estando associado a fatores genéticos, hormonais e ambientais. O LES leva a deposição de complexos imunes em articulações e diversos órgãos resultando em manifestações clínicas. A participação dos linfócitos T e B é crucial para a patogênese da doença. Linfócitos B-1, uma subpopulação de células B, possuem características que podem contribuir com a patogênese de doenças autoimunes pois são capazes de secretar citocinas como IL-10 exercendo uma ação moduladora tanto da resposta inflamatória aguda como crônica, apresentam antígenos as células T, participam da imunidade inata e adaptativa e são as principais produtoras de anticorpos naturais. O entendimento do papel das células B-1 na imunopatogênese do LES pode abrir frentes de estudos sobre estratégias de imunoterapias que possibilitem o controle dessa doença complexa e multifatorial. O presente trabalho avaliou o papel das células B-1 na imunopatogênese do LES utilizando o modelo de indução pelo pristane. LES foi induzido em camundongos fêmeas BALB/c, XID (deficientes em B-1) e XID repopulados com B-1. Os animais foram avaliados por seis meses. Verificamos que, BALB/c pristane e XID repopulados com B-1 apresentaram sinais característicos da doença como, formação de lipogranulomas e esplenomegalia. Em destaque, BALB/c pristane também apresentou ascite, edema articular, artrite, lesão renal com deposição de imunocomplexo. No baço, os animais BALB/c tiveram maior porcentagem de células B (CD19⁺, IgM⁺), BALB/c pristane de T CD8 (CD3⁺,CD8⁺), enquanto XID pristane teve aumento T CD4 (CD3⁺,CD4⁺). No lavado peritoneal, após indução com pristane houve diminuição de células B (CD19⁺, IgM⁺) e aumento de B1a (CD19⁺ IgM⁺ CD5⁺) em BALB/c pristane. No sangue periférico, BALB/c apresentou maior quantidade de linfócitos, XID apresentou um perfil neutrofilico, e em todos os grupos com LES houve aumento de monócitos. As citocinas IL-10, IL-6 e IFN- γ foram aumentadas nos BALB/c e XID repopulados. Com base nesses resultados, sugerimos que a presença de células B-1 pode contribuir com o desenvolvimento do LES.

Palavras-chave: Linfócitos B-1; lúpus eritematoso sistêmico; imunomodulação; autoimunidade

ABSTRACT

SILVA, Amanda Couto. **Role of B1 cells in the immunopathogenesis of systemic lupus erythematosus**. 2021. 86p. Dissertation (Master of in Veterinary Science). Institute of Veterinary - Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2021.

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a chronic autoimmune disease that affects dogs, cats, horses, humans and primates. The pathogenesis is multifactorial, being associated with genetic, hormonal and environmental factors. SLE leads to deposition of immune complexes in joints and various organs, resulting in clinical manifestations. The participation of T and B lymphocytes is crucial for the pathogenesis of the disease. B-1 lymphocytes, a subpopulation of B cells, have characteristics that may contribute to the pathogenesis of autoimmune diseases through the secretion of cytokines such as IL-10 exerting a modulating action on both the acute and chronic inflammatory response, presenting antigens to T cells, participating of innate and adaptive immunity and are the main producers of natural antibodies. Understanding the role of B-1 cells in SLE immunopathogenesis may open new fronts for studies on immunotherapeutic strategies to control this complex and multifactorial disease. The present work evaluated the role of B-1 cells in the immunopathogenesis of SLE using the pristane induction model. SLE was induced in BALB/c, XID (B-1 deficient) and XID mice repopulated with B-1. The animals were evaluated for six months. We found that BALB/c pristane and XID repopulated with B-1 showed characteristic signs of the disease, such as lipogranuloma formation and splenomegaly. Notably, BALB/c pristane also presented ascites, joint edema, arthritis, kidney damage with immune complex deposition. In the spleen, animals BALB/c had a higher percentage of B cells (CD19⁺, IgM⁺), BALB/c pristane T CD8 (CD3⁺, CD8⁺), while XID pristane had increased T CD4 (CD3⁺, CD4⁺). In the peritoneal lavage, after induction with pristane, there was a decrease in B cells (CD19⁺, IgM⁺) and an increase in B1a (CD19⁺, IgM CD5⁺) in BALB/c pristane. In peripheral blood, BALB/c had a higher number of lymphocytes, XID had a neutrophilic profile, and all groups with SLE showed an increase in monocytes. The cytokines IL-10, IL-6 and IFN- γ were increased in BALB/c and XID repopulated that developed SLE. Based on these results, we suggest that the presence of B-1 cells may contribute to the development of SLE.

Key words: B-1 lymphocytes; systemic lupus erythematosus; immunomodulation; autoimmunity

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Critérios de classificação do LES

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Manifestações clínicas observadas na pele e mucosa de pacientes com LES

Figura 2 Manifestações clínicas em cães com LES

Figura 3 Manifestações clínicas em diferentes espécies de animais com LES

Figura 4 Patogênese do LES

Figura 5 Sinais clínicos observados ao longo do tempo após a indução química por pristane

Figura 6 Imagem representativa da pesagem e medida da articulação dos animais.

Figura 7 Resumo gráfico da metodologia experimental

Figura 8 Avaliação do ganho de peso ao longo dos meses no modelo LES induzido por pristane.

Figura 9 Ganho de peso em animais BALB/c no modelo LES induzido por pristane

Figura 10 Presença de ascite em camundongos BALB/c pristane

Figura 11 Medida das articulações no modelo LES induzido por pristane.

Figura 12 Presença de edema articular em animais BALB/c induzidos por pristane

Figura 13 Presença de lipogranulomas em animais após 6 meses de indução por pristane

Figura 14 Porcentagem no número absoluto de linfócitos no sangue periférico dos animais BALB/c, XID e XID repopulado com B-1.

Figura 15 Porcentagem no número absoluto de neutrófilos no sangue periférico dos animais BALB/c, XID e XID repopulado com B-1.

Figura 16 Porcentagem no número absoluto de monócitos no sangue periférico de camundongos BALB/c, XID e XID repopulado com B-1.

Figura 17 Peso do baço dos animais

Figura 18 Análise macroscópica do tamanho do baço dos animais estimulados com pristane.

Figura 19 População de linfócitos B totais no baço.

Figura 20 População de linfócitos T totais no baço.

Figura 21 Porcentagem de linfócitos totais no baço.

Figura 22 População de linfócitos B totais e B-1 no peritônio.

Figura 23 Porcentagem de linfócitos B no peritônio

Figura 24 Produção de citocinas no soro dos animais após 6 meses de indução com pristane.

Figura 25 Análise histológica das articulações dos animais BALB/c controle e estimulado com pristane.

Figura 26 Análise histológica das articulações dos animais XID controle e estimulado com pristane.

Figura 27 Glomérulos da transição córtico medular dos animais BALB/c e XID controle e induzidos com pristane.

Figura 28 Glomérulos subcapsulares dos animais BALB/c e XID controle e induzidos com pristane

Figura 29 Espessamento da alça capilar glomerular dos animais BALB/c e XID controle e induzidos com pristane.

Figura 30 Fotomicrografias representativas dos glomérulos dos animais BALB/c e XID controle e induzidos com pristane com B-1

LISTA DE ABREVIACOES

ACR	American College of Rheumatology
ANA	Anticorpos antinucleares
dsDNA	Dupla Fita de DNA
BTK	Tirosina quinase de Bruton
CI	Complexos imunes
DATASUS	Departamento de Informática do Sistema nico de Saúde
IFN	Interferon
IFN I	Interferon do tipo I
IFN -γ	Interferon gama
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-2	Interleucina 2
IL-17	Interleucina 17
LES	Lúpus eritematoso sistêmico
LED	Lúpus eritematoso discoide
DC	Células dendríticas
pDC	Células dendríticas plasmocitóides
Th	Linfócito T auxiliares
[(NZB/NZW) F1]	(New Zealand Black x New Zealand White) F1
H&E	Hematoxilina e eosina
SNC	Sistema Nervoso Central
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TLR 7	Receptor semelhante ao Toll 7
TLR 9	Receptor semelhante ao Toll 9

XID	Imunodeficiência ligada ao X
μL	Microlitros
TMM	Tricrômico de mason modificado
i.p.	Intraperitoneal

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1	Epidemiologia.....	5
2.2	Sinais clínicos do Lúpus eritematoso sistêmico	7
2.3	Diagnóstico e tratamento	11
2.4	Patogênese.....	13
2.5	Linfócitos B-1.....	18
2.5.1	Linfócitos B-1 e autoimunidade	20
2.6	Modelo experimental murino	21
2.6.1	Indução do Lúpus eritematoso sistêmico com pristane.....	21
2.6.2	Síndrome da imunodeficiência ligada ao X	22
3	OBJETIVOS.....	23
3.1	Objetivo geral	23
3.2	Objetivos específicos	23
4	MATERIAIS E MÉTODOS	24
4.1	Animais.....	24
4.2	Transferência adotiva de células B-1	24
4.3	Indução de LES com pristane.....	25
4.4	Avaliação do peso corporal e medida das articulações	25
4.5	ELISA para detecção de citocinas	26
4.6	Contagem diferencial de leucócitos circulantes no sangue periférico.....	26
4.7	Peso e tamanho do baço	26
4.8	Citometria de fluxo.....	27
4.9	Análise histopatológica.....	27
4.10	Análise estatística	29
4.11	Fluxograma do desenho experimental	30
5	RESULTADOS	30
5.1	Estado geral após indução com pristane	30
5.1.1	Avaliação do peso dos animais	30

5.1.2	Presença de ascite nos animais BALB/c pristane	32
5.1.3	Avaliação do edema articular	32
5.1.4	Presença de edema nas articulações dos animais BALB/c pristane	33
5.1.5	Presença de lipogranulomas.....	34
5.2	Dinâmica celular do sangue periférico	35
5.3	Dinâmica celular do baço	37
5.3.1	Tamanho e peso do baço.....	37
5.3.2	Caracterização fenotípica das células do baço.....	39
5.4	Caracterização fenotípica das células do lavado peritoneal	43
5.5	Produção de citocinas	46
5.6	Histopatologia	48
5.6.1	Análise histológica da articulação da pata	48
5.6.2	Lesão renal e depósito de complexos imunes	51
6	DISCUSSÃO.....	55
7	CONCLUSÕES.....	61
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

1 INTRODUÇÃO

O Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é uma doença autoimune grave e subdiagnosticada no Brasil. Segundo dados provenientes do Departamento de informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS), no Brasil, o número de casos de pacientes com LES aumentou em 3,43 vezes de 2009 a 2018. Esse aumento está relacionado com um melhor entendimento da doença associado ao diagnóstico eficaz. Dessa forma, o conhecimento da patogênese contribui para o diagnóstico e tratamento precoce da doença reduzindo a chance de complicações crônicas e mortalidade (TEDDE-FILHO; NUNES, 2021).

O LES é uma doença autoimune crônica caracterizada pela produção de autoanticorpos e deposição de complexo imunes (CI), que afeta diversos órgãos como rins, cérebro, pulmão, pele e articulações (TSOKOS et al., 2016). Pode ser observado em diversas espécies de mamíferos, incluindo humanos e outros primatas, cães (LEWIS et al., 1965), gatos (LUSSON et al., 1999) e cavalos (GEOR et al, 1990). No entanto, os camundongos são os modelos experimentais mais utilizados para estudos sobre a etiologia, desenvolvimento e tratamento do LES (FREITAS et al 2017).

Modelos de animais de LES induzidos são bem documentados na literatura, no qual uma única injeção intraperitoneal do óleo de hidrocarboneto como Pristane em camundongos saudáveis, é capaz de desencadear manifestações clínicas similares ao LES em humanos. Com isso, esse modelo permite um melhor entendimento da patogênese da doença (FREITAS et al 2017).

Diversos fatores contribuem para a ocorrência do LES como fatores genéticos, ambientais e acredita-se que fatores hormonais. Entretanto, a patogênese do LES é complexa e permanece desconhecida. A quebra da auto tolerância desempenha um papel crítico na ocorrência da doença. Respostas imunes inatas e adaptativas contra os autoantígenos induzem produção de autoanticorpos e deposição de complexos imunes (CI) nos tecidos levando à ativação do sistema complemento e o acúmulo de neutrófilos, monócitos e linfócitos autorreativos (TSOKOS et al., 2016). Também, há a participação e aumento de citocinas inflamatórias como interleucina 6 (IL-6) e Interferon gama (IFN- γ). Diferentemente, citocinas anti-inflamatórias como interleucina 10 (IL-10) também se encontram aumentadas (RUCHAKORN et al., 2019).

Os linfócitos T contribuem para a patogênese do LES de várias maneiras, como por exemplo, direcionando o tipo de inflamação baseado na instrução recebida pelas citocinas liberadas por células dendríticas (DC), amplificação de respostas incluindo a ativação de linfócitos B autorreativos e subsequente produção de autoanticorpos. Diferentes subpopulações de linfócitos T são relevantes no LES, tais como linfócitos T foliculares (Tf), linfócitos T reguladoras (Treg), linfócitos T auxiliares (Th) como Th17, Th1 e Th2 (CHOI et al., 2016; YULIASIH; RAHMAWATI; PUTRI, 2019). Embora a participação de linfócitos T no LES ainda necessite de muito esclarecimento, o papel de orquestrar a patogênese pode estar intimamente relacionada à dependência das linfócitos B em interagir com linfócitos T para a ativação (SHARABI; KASPER; TSOKOS, 2018).

Os linfócitos B possuem um papel central no LES, pois ao serem ativados se diferenciam em plasmócitos sendo os principais produtores de autoanticorpos. Os autoanticorpos marcam de forma contundente a patologia, na qual a presença de ANA (anticorpo antinuclear) foi recentemente apresentada como critério de classificação do LES, corroborando com a ideia de que os plasmócitos autorreativos representam um pré-requisito para o estabelecimento da doença (ARINGER et al., 2019).

Os linfócitos B estão divididos em duas populações majoritárias: os linfócitos B-1 e os linfócitos B-2 (convencionais). No entanto, quase nada se sabe sobre o papel dos linfócitos B-1 na patogênese do LES. Os linfócitos B-1 foram descritos em 1983 como uma subpopulação de linfócitos B (HAYAKAWA et al, 1983). Apresentam inúmeras particularidades quando comparados aos linfócitos convencionais, como características fenotípicas, ontogênicas e funcionais únicas (MONTECINO-RODRIGUEZ; DORSHKIND, 2006). O fenótipo de superfície dos linfócitos B-1 é caracterizado pela expressão de CD45R (B220)^{baixa}, IgM de superfície (sIgM)^{alta}, IgD de superfície (sIgD)^{baixa} e CD19^{alta}. Estão subdivididos em B-1a e B-1b de acordo com a expressão de CD5. Células B-1a expressam a molécula CD5 enquanto que as B-1b não expressam (TUNG et al., 2004). Os linfócitos B-1 secretam espontaneamente anticorpos naturais polirreativos que atuam como uma primeira linha de defesa neutralizando uma variedade de agentes infecciosos antes mesmo da ativação da imunidade adaptativa (BAUMGARTH et al., 2000). Além dos anticorpos, os linfócitos B-1 são capazes de secretar uma variedade de moléculas com ação imunomoduladora, como a interleucina 10 (IL-10) e após estimulação com LPS produzem IL-3 e GM-CSF entre outras moléculas que são capazes de modular tanto a resposta inflamatória aguda quanto a crônica (CHOUSTERMAN; SWIRSKI, 2015). Além disso, desempenha a função de apresentação de

antígenos de forma eficiente as células T com expressão de moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86 de forma constitutiva na subpopulação B-1a (HIROSE et al., 2017).

A participação dos linfócitos B-1 na patogênese do LES, foi relatada através da eliminação de linfócitos B-1 do peritônio de camundongos (New Zealand Black x New Zealand White) F1 que são predispostos geneticamente a desenvolverem o LES. A deleção dos linfócitos B-1 foi feita por choque hipotônico, e foi observado que a deleção de linfócitos B-1 levou a diminuição da gravidade da doença (MURAKAMI et al., 1995). Outro estudo realizado na linhagem de camundongos CBA/N (XID) que são deficientes em linfócitos B-1, demonstrou uma menor indução de autoanticorpos por pristane, enquanto 23% dos controles CBA/CaJ (fenótipo selvagem) tratados produziram anticorpos anti-nRNP/Sm, -Su e/ou -OJ (isoleucyl tRNA sintetase). Além disso, a produção de citocinas na cavidade peritoneal foi predominantemente de IL-12 e IFN- γ em camundongos tratados com pristane, enquanto IL-4 e IL-6 foram mais marcantes em camundongos não tratados. De um modo geral, os camundongos CBA/N (XID) se mostraram mais refratários no tocante à produção de autoanticorpos do que os camundongos CBA/CaJ (SATO et al., 2003).

O fato dos camundongos XID tratados com pristane terem apresentado uma menor produção de autoanticorpos sugere que a ausência de linfócitos B-1 pode ter contribuído para a proteção desses animais no desenvolvimento do LES.

Os linfócitos B-1 são os principais produtores de anticorpos naturais. Esses anticorpos funcionam como uma ponte entre a resposta imune inata e a adaptativa, fornecendo uma defesa inicial contra microrganismos patogênicos (GRÖNWALL; VAS; SILVERMAN, 2012). Os anticorpos naturais são encontrados no soro de vários animais normais e humanos na ausência de imunização ou infecção (BAUMGARTH, 2011). Desempenham funções importantes na homeostase tecidual e na retirada de células senescentes e tumorais, na defesa contra infecção, no desenvolvimento de células B e proteção contra a aterosclerose (GRÖNWALL; VAS; SILVERMAN, 2012; HARDY, 2006; SHAW et al., 2000). A IgM é o principal isotipo (HOLODICK; RODRÍGUEZ-ZHURBENKO; HERNÁNDEZ, 2017) e pode estar direcionado contra múltiplas especificidades, incluindo lipoproteína de baixa densidade oxidada, fosfatidilcolina (PtC), fosforilcolina (PC), malondialdeído (MDA), cardiolipina oxidada, 4-hidroxinonenal e Thy-1 (CD90), bem como antígenos associados (BINDER; SILVERMAN, 2005; CHOU et al., 2009; DÍAZ-ZARAGOZA et al., 2015; KULIK et al.,

2009). Devido a um amplo espectro de especificidade, os anticorpos naturais têm sido associados a doenças autoimunes (DUAN; MOREL, 2006).

Apesar da melhora na sobrevivência nas últimas décadas, o prognóstico é dificultado por danos nos órgãos causados pela doença e eventos adversos relacionados às terapias convencionais. O estudo aprofundado da patogênese da doença é crucial na busca de alvos terapêuticos e novos biomarcadores do LES. Existe uma lacuna importante no entendimento da participação dos linfócitos B-1 no LES quanto a sua capacidade imunomoduladora. Além de participarem como fontes de anticorpos naturais, os linfócitos B-1 secretam citocinas, podem apresentar antígenos e desse modo, exercerem influência tanto na imunidade inata quanto na imunidade adaptativa. O entendimento do papel dos linfócitos B-1 na imunopatogênese do LES pode abrir frentes de estudos sobre estratégias de imunoterapias que possibilitaria um controle mais seguro dessa doença complexa e multifatorial. Nossa hipótese é que a ausência de linfócitos B-1 pode contribuir com a proteção contra o LES. Nesses animais, a produção de anticorpos naturais seria bloqueada e a regulação de citocinas diferenciada. Desse modo, é possível que haja inibição do desencadeamento da doença.

Baseados nessas considerações, foi escolhido o modelo de indução do LES em camundongos da linhagem BALB/c e BALB/c XID (deficiente em linfócitos B-1) através do inóculo de pristane (FREITAS; DE OLIVEIRA; MONTICIELO, 2017; HAN et al., 2015; KALIM et al., 2018). Com isso, avaliou-se o papel dos linfócitos B-1 na imunopatogênese do LES.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Epidemiologia

O LES acomete principalmente mulheres adultas na idade reprodutiva entre 15 a 40 anos, sendo muito mais comum em mulheres do que nos homens com uma proporção próxima de 9:1 (JIMÉNEZ et al., 2003). Essa susceptibilidade pode estar associada ao cromossomos sexuais XX (SMITH-BOUVIER et al., 2008) e a hormônios esteroidais como estrógeno (LAFFONT; SEILLET; GUÉRY, 2017).

Mundialmente, a prevalência de LES em adultos variam de 30 a 150 por 100.000 habitantes e a incidência varia de 2,2 a 23,1 por 100.000 por ano. O LES está associado a grupos étnicos, nos quais indivíduos de ascendência africana, hispânica e asiática apresentam uma maior prevalência da doença quando comparado aos caucasianos (DURCAN; DWYER; PETRI, 2019; LEWIS; JAWAD, 2016).

No Brasil, há estudos da incidência do LES em diferentes regiões do país, como na região Sul, em Cascavel - Paraná, onde foi analisado nos anos 2007 a 2008 uma incidência estimada de 4,8 casos a cada 100.000 habitantes/ano sendo todos os casos femininos, com uma idade média de 38 anos (NAKASHIMA et al., 2011). Outras regiões também foram avaliadas, como o Nordeste, em Natal no Rio grande do Norte no ano de 2000, houve uma incidência de 8,7 casos/100.000 habitantes/ano, sendo também a maioria dos casos em mulheres (38 mulheres/5 homens) (VILAR; SATO, 2002). Em dados mais recentes, coletados através do DATASUS, no período de 2009 a 2018, foi observado um maior número de casos de LES em São Paulo (3443 casos) , em segundo lugar Minas Gerais (1547 casos) seguido por Distrito Federal (1296 casos) (TEDDE-FILHO; NUNES, 2021).

Apesar da baixa incidência o LES pode levar à morte. A causa da mortalidade é variada sendo relacionada com alguns fatores epidemiológicos, sociodemográficos, genéticos e clínicos. Dentre as causas associadas ao LES temos a insuficiência renal, distúrbios no sistema nervoso central (SNC), doenças cardiovasculares e infecções. A mortalidade e a morbidade estão associadas ao dano tecidual induzido pelo sistema imunitário, mas também está relacionado a efeitos adversos do tratamento e o maior risco a infecções devido à imunossupressão (FAVA; PETRI, 2019; OCAMPO-PIRAQUIVE et al., 2018).

No Brasil, entre 2002 e 2011, a taxa de mortalidade por LES foi de 4,76 mortes/105 habitantes. Enquanto que as principais causas da morte associada ao LES foram doenças dos sistemas respiratório e circulatório, doenças infecciosas e parasitária (COSTI et al., 2017). Em contrapartida, a causa da mortalidade entre 1987 a 2007 apenas no estado de São Paulo em primeiro lugar foi a insuficiência renal seguida de doenças infecciosas e doenças cerebrovasculares (SOUZA et al., 2012).

Além de humanos, o LES pode ser observado em diversas espécies como cães (LEWIS et al., 1965), gatos (LUSSON et al., 1999) e cavalos (GEOR et al., 1990). Em cães, o LES apresenta uma baixa incidência em torno de 0,03%. (SCOTT et al., 1996). Nesses animais o Lúpus Eritematoso Discoide (LED) é a forma mais relatada na literatura. Essa forma, se limita apenas a pele e mucosas não apresentando um caráter sistêmico (WHITE, 1994). Vassalo (2011) afirma que “A forma sistêmica do lúpus é um desafio para o clínico devido ao seu difícil diagnóstico, associado à sua diversificada lista de diagnósticos diferenciais e a baixa disponibilidade de exames específicos.” Além do caráter autoimune, o pouco relato de LES em cães quando comparado ao LED, pode estar relacionado a um subdiagnóstico em animais.

Há uma década, foi realizado um levantamento da casuística de doenças dermatológicas autoimunes na população canina e felina atendida pelo Serviço de Dermatologia Veterinária da FMVZ-UNESP campus de Botucatu no período de 1988 a 2007. Dos 68 casos de doenças diagnosticadas, 42 casos eram de doença lúpica, sendo 60,6% dos casos eram LED, e 3,03% LES (PALUMBO et al., 2010).

Em outro estudo avaliando a prevalência de diagnósticos dermatológicos em cães no Setor de Dermatologia do Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro no período de 2005 a 2010, foi relatado entre os casos de dermatopatias autoimunes uma prevalência de 1,89% de cães com LES correspondendo a 35% dos casos (43/123 casos), enquanto animais diagnosticados com LED apresentaram uma prevalência de 0,57% que corresponde a 10,6% dos casos (13/123 casos), ocorrendo em baixa prevalência (0,57%) (AMARANTE, 2012).

Diferentemente do LES em humanos, em cães não há predisposição por sexo (SCOTT et al., 1996; NELSON et al., 2015). O LES ocorre principalmente na faixa etária de 2 a 9 anos, porém pode ocorrer em qualquer idade (FORRESTER & LEES, 1995). Em cães, há a predisposição de raças como Pastor de Shetland, Pastor Alemão, Old English Sheepdog,

Afghanhound, Beagle, Collie, Setter Irlandês e Poodle. (NELSON et al.,2015; SNYDER, 2009).

A incidência de casos em gatos é menor quando comparado com cães, com incidência ao redor de 0,06% de todas as visitas na clínica (PEREZ; PAJUELO; LUQUE, 2000). Também há uma predisposição racial sendo siameses, persas e himalayos. O LES em gatos, pode ocorrer em qualquer idade entre 1 a 12 anos, e não há evidências de correlação com o sexo. (ROSENKRANTZ, 1994 apud PEREZ; PAJUELO; LUQUE, 2000; SCOTT et. al.,1995). Em outros animais como cavalos, o LES é responsável por 0,22% das doenças cutâneas dos equídeos, e a princípio sem idade, raça ou predileção sexual são reconhecidas (SCOTT & MILLER, 2003).

2.2 Sinais clínicos do Lúpus eritematoso sistêmico

As manifestações clínicas em pacientes com LES são inespecíficas apresentando um padrão heterogêneo entre os pacientes com momentos de remissão e recidivas. Sendo assim, de difícil diagnóstico, baseando em resultados clínicos e imunológicos (FAVA; PETRI, 2019). De modo geral, 90% dos pacientes com LES apresentam de forma inicial a doença sinais clínicos inespecíficos como fadiga, anorexia, febre e mal-estar. Além desses sinais clínicos iniciais mais de 80% dos pacientes costumam apresentar manifestações muco cutâneas, que geralmente são generalizadas, simétricas e não cicatrizantes (JUSTIZ VAILLANT et al., 2020).

Dentre as manifestações muco cutâneas, temos a lesão eritematosa na face em forma de borboleta na região malar e do nariz denominado de: rash malar ou erupção malar. Há também dermatites fotossensíveis com máculas, pápulas, petéquias e lesões bolhosas que geralmente apresentam em regiões expostas ao sol. Ademais, alopecia, úlceras nasais e orais sendo mais comum no palato duro e mucosa bucal (Figura 1). Em 90% dos casos, há foto sensibilidade caracterizado por uma reação cutânea anormal à exposição UV que pode durar semanas ou meses com piora no quadro sistêmico (UVA et al., 2012).

O LES por ser uma doença sistêmica afeta diferentes órgãos e tecidos. Os rins é um dos órgãos afetados no LES acometendo mais da metade dos pacientes (TSOKOS, 2020). A lesão renal é mediada pelo depósito de complexos imunes, ativação do sistema complemento, recrutamentos de células e citocinas inflamatórias (FLORES-MENDOZA et al., 2018). Esses fatores podem levar a alterações tubulares, intersticiais, vasculares e glomerulares nos rins. Os glomérulos são geralmente os mais afetados (MENDES et al., 2014) A nefrite lúpica pode

levar a uma grande morbidade e mortalidade aos pacientes com LES, sendo uma importante manifestação clínica (FORTUNA; BRENNAN, 2013).

Além dos rins, podemos encontrar alterações musculoesqueléticas como: artralgia, miopatia, mialgia, fraqueza muscular e artrite. A artrite no LES geralmente não é erosiva, e apresenta uma frequência que varia de 69 a 95% dos pacientes acometidos. Geralmente, há o envolvimento de articulações como joelhos, punho e mãos, apesar de poder acometer todas as articulações. As estruturas próximas às articulações podem inflamar levando a tendinite, tenossinovite e ruptura de tendão. Ademais, pode ocorrer necrose e de maneira similar ao encontrado na febre reumática a Artropatia de Jaccoud. Embora não seja específica ao LES. Todas essas alterações levam a uma diminuição da mobilidade e à dor articular (GROSSMAN; CLINICAL, 2009).

Outras manifestações são citadas na literatura como alterações pulmonares com pleurite e hemorragia alveolar difusa. Alterações hematológicas ocorrendo uma diminuição no número de diferentes células (citopenia) como neutrófilos (neutropenia), leucócitos (leucopenia), e plaquetas (trombocitopenia), e anemia. O sistema nervoso central pode ser acometido, levando a alterações neuropsiquiátricas como: convulsões, acidente vascular cerebral (AVC), depressão e alterações cognitivas. Por fim, alterações oculares, cardiovasculares, e gastrointestinais também podem estar presentes (FORTUNA; BRENNAN, 2013).

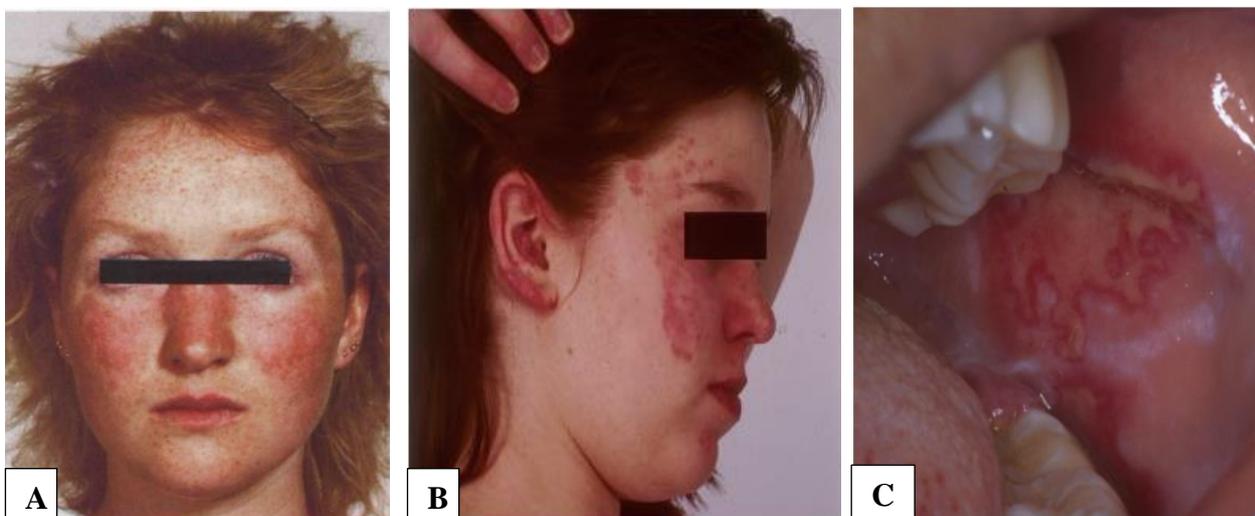




Figura 1 Manifestações clínicas observadas na pele e mucosa de pacientes com LES. Em (A) e (B) Rash ou eritema malar, (C) lesões bolhosas ulcerativas na mucosa oral e em (D) e (E) lesões cutâneas. Fonte: (FORTUNA; BRENNAN, 2013; YELL et al., 1996; UVA et al., 2012).

Similarmente, observa-se a presença de múltiplos sinais clínicos em animais. Nos cães, os sinais clínicos observados são: febre intermitente (100%), claudicação ou edema da articulação, poliartrite não erosiva (91%), sinais clínicos de glomerulonefrite (65%), manifestações dermatológicas (60%) sendo variáveis e não específicas como lesões eritematosas ou bolhosas principalmente em áreas de mucosa e pele expostas à luz solar. Também podem apresentar letargia, anorexia, linfadenomegalia e esplenomegalia, trombocitopenia apresentando petéquias, quimoses e vasculite, hemólise imunomediada e disfunção do SNC. Dentre as manifestações dermatológicas tanto no LES quando no LED pode haver a despigmentação no plano nasal com presença de eritema e descamação (RHODES, 2003). Pode ocorrer também hiperqueratose nos coxins, piodermites bacterianas secundárias refratárias e paniculite (Figura 2) (FOURNEL et al., 1992; NELSON et al., 2015; CRIVELLENTI LZ; BORIN-CRIVELLENTI S., 2015).

Em gatos é pouco conhecido, porém há relatos de manifestações clínicas como febre, glomerulonefrite, dermatite e anemia hemolítica (McGAVIN, M.D.; ZACHARY, J.F., 2013). Em animais de grande porte, como os cavalos, o LES pode levar a lesões cutâneas, edema distal de membros, paniculite, ulceração mucocutânea, alopecia focal, descamação e leucodermia, poliartrite, anemia, purpura, linfadenopatia, febre, anorexia e perda de peso (SCOTT; MILLER, 2011; VITALE et al., 1997). (Figura 3).

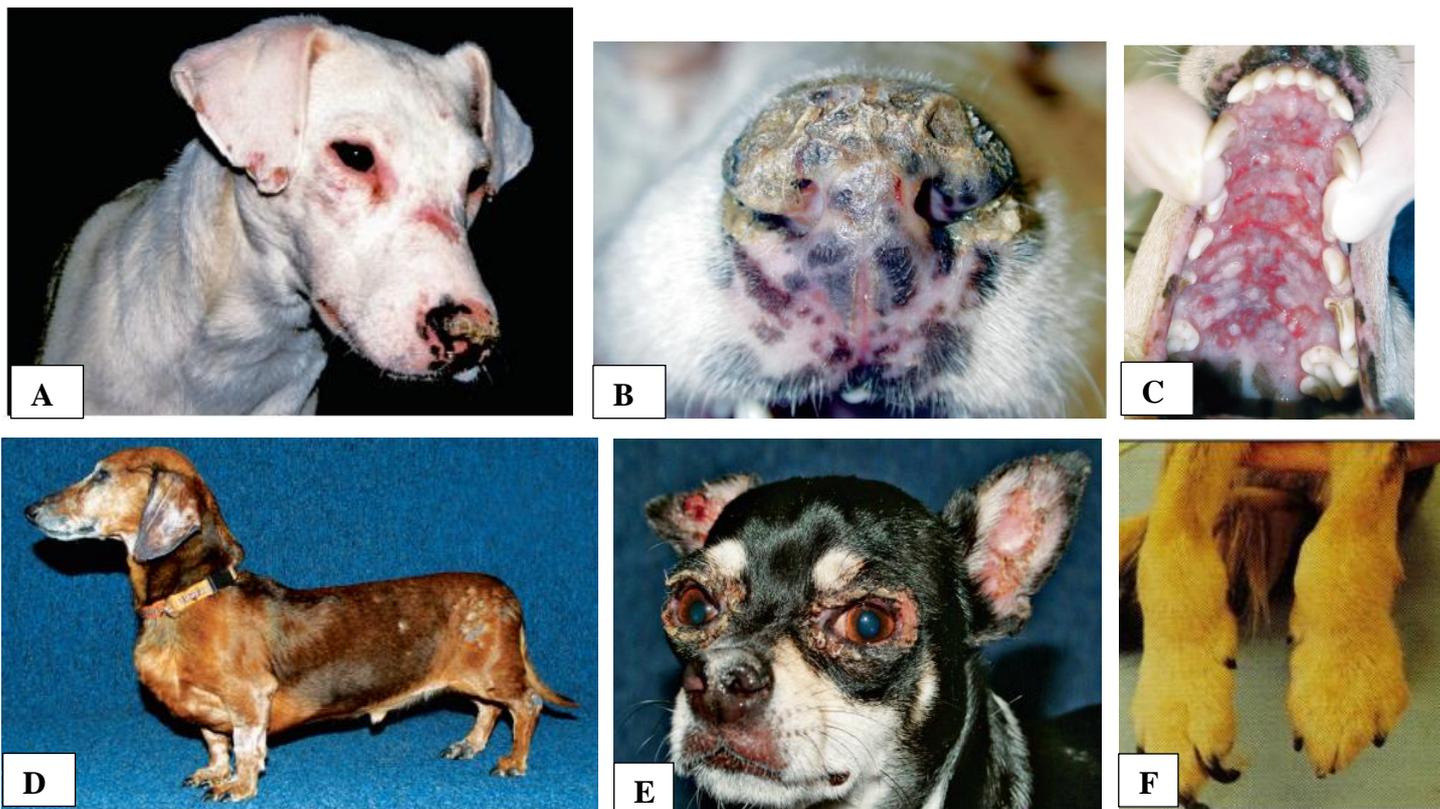


Figura 2 Manifestações clínicas em cães com LES. Em (A) e (B) despigmentação e erosões em plano nasal - mesmo animal (C) erosão no palato, (D) lesão generalizada na pele, (E) Dermatite crostosa ao redor dos olhos, ponto de orelha e úlceras, e (F) presença de edema nas articulações. Fonte: HNILICA, 2010; Chabanne et al., 1995

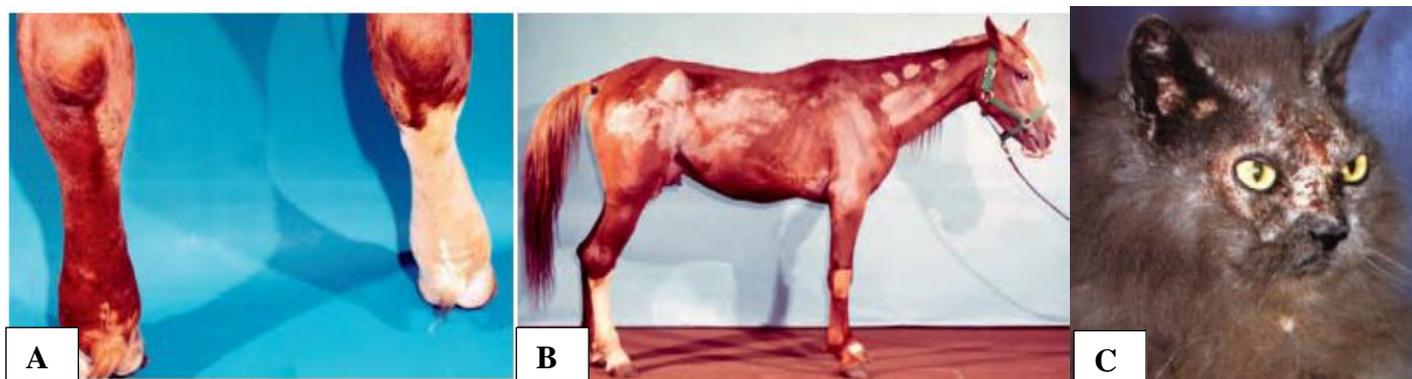


Figura 3 Manifestações clínicas em diferentes espécies de animais com LES. Em (A) Edema da articulação no cavalo (B) Lesões difusas com despigmentação e alopecia em cavalos (C) Lesão eritematosa na face de um gato. Fonte: (SCOTT; MILLER, 2011; VITALE et al., 1997)

2.3 Diagnóstico e tratamento

O LES é uma doença complexa de difícil diagnóstico. O diagnóstico é baseado em manifestações clínicas, exames laboratoriais, imunológicos e histológicos (THONG; OLSEN, 2017). Há diferentes critérios que auxiliam na identificação e classificação da doença em ensaios e estudos clínicos epidemiológicos, que acabam norteando o diagnóstico na clínica. Dentre esses critérios, há mais de três décadas vem sendo utilizado os critérios de classificação do LES realizado pelo American College of Rheumatology – ACR em 1982, que foi revisado em 1997 (AGGARWAL et al., 2015). Com base no critério da ACR para suspeita de LES, é necessário que o paciente apresente pelo menos quatro dos onze critérios clínico-laboratoriais. Os critérios estão descritos na tabela 1 (SATOH et al., 1987).

Tabela 1: Critérios de classificação de LES do American College of Rheumatology revisado em 1997.

1. Rash malar: lesão eritematosa fixa em região malar, plana ou em relevo
2. Lesão discoide: lesão eritematosa infiltrada com escamas queratóticas aderidas e tampões foliculares, que evolui com cicatriz atrófica e discromia.
3. Fotos sensibilidade: exantema cutâneo como reação não usual à exposição à luz solar
4. Úlceras orais/nasais: úlceras orais ou nasofaríngeas usualmente indolores
5. Artrite: não erosiva envolvendo duas ou mais articulações periféricas, caracterizadas por dor e edema ou derrame articular
6. Serosite: pleurite (caracterizada por relato convivente de dor pleurítica, atrito auscultado pelo médico ou evidência de derrame pleural) ou pericardite (documentado por eletrocardiograma, atrito ou evidência de derrame pericárdico)
7. Comprometimento renal: proteinúria persistente (>0,5g/dia ou 3+) ou cilindros celulares anormal no sedimento urinário
8. Alterações neurológicas: convulsão (na ausência de outra causa) ou psicose (na ausência de outra causa)
9. Alterações hematológicas: anemia hemolítica ou baixo nível de leucócitos (menor que 1.500/mm ³ em duas ou mais ocasiões), ou baixo nível de plaquetas (menor que 100.000 mm ³ na ausência de fármacos agressores)
10. Alterações Imunológicas: anticorpo anti DNA nativo ou anti Sm ou presença de anticorpo antifosfolípide com base em: a) Níveis anormais de IgG ou IgM anticardiolipina; b) Teste positivo para anticoagulante lúpico; c) Teste falso positivo para sífilis, por no mínimo 6 meses
11. Anticorpos antinucleares (ANA): título anormal para anticorpo antinuclear por imunofluorescência indireta ou método equivalente, em qualquer época, e na ausência de drogas conhecidas por estarem associadas a síndrome do lúpus induzidos por drogas

Fonte: Adaptado de (BORBA et al., 2008)

Em 2012, os critérios foram atualizados pelo Systemic Lupus International Collaborating – SLICC, no qual acrescentou as manifestações neuropsiquiátricas, mucocutâneas, alterações no sistema complemento (hipocomplementemia) e novos testes de anticorpos e antifosfolípídeo. Além de ser necessário apresentar pelo menos quatro critérios, sendo um critério clínico e um imunológico associado com a nefrite lúpica comprovada por biópsia na presença de ANA ou anticorpos anti-dsDNA. O SLICC apresentou maior sensibilidade e menor especificidade que o critério ACR revisado em 1997 (FORTUNA; BRENNAN, 2013; PETRI et al., 2012). Em 2019, o critério mais recente atualizado foi feito pela European Alliance of Associations for Rheumatology (EULAR/ACR), sendo obrigatório a positividade para ANA (ARINGER, 2019).

Os autoanticorpos podem ser detectados até 9,4 anos antes do diagnóstico de LES e foram divididos em três grupos sorológicos diferentes. ANA e anti-Ro apareceram muito precocemente e foram seguidos por anti-dsDNA ou anti-RNP. O número de autoanticorpos presentes em um paciente pode aumentar com o passar do tempo até que o diagnóstico seja feito (ARBUCKLE et al., 2003). Assim como os autoanticorpos, uma assinatura de interferon (IFN) pode ser encontrada próxima ao momento do diagnóstico. Em 20% dos casos investigados, níveis elevados de IFN foram encontrados quatro anos antes do diagnóstico e aumentou constantemente ao longo do tempo para até 75% no momento do diagnóstico (ARRIENS et al., 2017). Níveis elevados de citocinas do perfil Th1, Th2 e Th-17 antes do diagnóstico de LES e da detecção de autoanticorpos foram observados, e 20% dos pacientes apresentaram elevados níveis de IL-5 e IL-6 seis anos antes do diagnóstico de LES (HE et al., 2016).

Segundo a literatura, o diagnóstico em pequenos animais é realizado a partir da presença de pelo menos dois sinais clínicos e exame sorológico positivo. Dentre os sinais temos: poliartrite não erosiva, proteinúria, dermatite bolhosa, anemia hemolítica, leucopenia e trombocitopenia. Os testes sorológicos são pouco utilizados na rotina clínica, mas podem ser realizados através do teste ANA por imunofluorescência indireta, e a pesquisa de células LE (anticorpo antinucleossomo). (CRIVELLENTI LZ; BORIN-CRIVELLENTI S., 2015).

Feito o diagnóstico, o tratamento em humanos e animais é variado de acordo com a gravidade e do órgão afetado (JUSTIZ-VAILLANT et al., 2020). Em animais, é realizado o monitoramento clínico através de exames laboratoriais acompanhado de corticosteróides e

imunossupressores citotóxicos (CRIVELLENTI LZ; BORIN-CRIVELLENTI S., 2015). Por outro lado, em humanos, o tratamento é a base de corticosteroídes, anti-inflamatórios, imunossupressores, antimaláricos como a hidroxicloroquina e tratamento de suporte como antibióticos. Há diversos efeitos colaterais correlacionados com o uso desses medicamentos sendo necessário novas terapias mais seguras como é o caso das imunoterapias. Em 2011, foi aprovado o Belimumabe (Benlysta, Human Genome Sciences e GlaxoSmithKline) para o tratamento do LES. Belimumabe é um anticorpo monoclonal IgG humano que se liga e neutraliza os linfócitos B (FORTUNA; BRENNAN, 2013; FURIE et al., 2011; THONG; OLSEN, 2017). Desde então, diversas imunoterapias vêm sendo estudadas como alternativa para o tratamento tendo como alvo a modulação co-estimulatória, os linfócitos B, T e citocinas (YASUDA, 2018; DING; GORDON, 2013).

2.4 Patogênese

Apesar de existirem muitos estudos sobre o LES, sua patogênese ainda não está esclarecida pois se trata de uma doença complexa e multifatorial. No LES, há uma perda da tolerância imunológica. E, com isso, uma hiperativação de linfócitos T e B, levando a uma produção de autoanticorpos contra diferentes constituintes solúveis e celulares. Sendo a maior parte contra antígenos nucleares como anti dsDNA, antiribonucleoproteínas RNPs anti-RO, anti Sm e outros componentes como as histonas e cromatina. Essa perda da tolerância leva a uma apresentação e resposta contra antígenos próprios e está associado a uma susceptibilidade genética e a fatores ambientais e hormonais (DÖRNER; FURIE, 2019).

A susceptibilidade genética foi demonstrada em estudos no qual foi observada uma alta taxa de concordância em gêmeos monozigóticos (24-58%) em comparação com gêmeos dizigóticos (2-5%) como também uma incidência maior entre parentes de primeiro grau (DEAFEN et al., 1992; LAURENCE et al., 2007). Na literatura, há mais de 50 genes ou loci genômicos envolvidos na patogênese do LES (DENG; TSAO, 2014). Sendo considerado uma doença poligênica embora existam, de forma rara casos monogênicos. Dentre os fatores epigenéticos, genes e loci envolvidos temos: complexo de histocompatibilidade humana (*HLA-DRB1*, *HLA-DR2*, *HLA-DR3*), genes envolvidos ao reparo de DNA (*TREX-1*), deficiência do receptor FC, deficiências no sistema complemento C1q, C4 e C2, ou associados à resposta imunológica como sinalização de linfócitos B (*miR-155*), T (*PTPN22*) e produção de IFN entre outros genes associados a vias de ativação de células B e células T ou

sinalização de receptores da imunidade inata (TSOKOS, 2020; WAHREN-HERLENIUS; DÖRNER, 2013).

A alta taxa de concordância em gêmeos monozigóticos nos mostra que a predisposição genética é importante, mas que pode haver outros fatores envolvidos como os fatores ambientais. Pacientes com LES apresentam piora clínica ao serem expostos a raios UV pois essa exposição causa danos ao DNA celular ocorrendo a apoptose nos queratinócitos presentes na pele. Com isso, há remoção ineficaz de células apoptóticas com a exposição dos autoantígenos e, conseqüentemente, leva a produção de autoanticorpos e deposição de CI (CASCIOLA-ROSEN; ANHALT; ROSEN, 1994; ZAMANSKY, 1985). Existem outros fatores ambientais envolvidos como a exposição a agentes infecciosos. Um exemplo é a exposição ao vírus Epstein-Barr, que através do mimetismo molecular é capaz de incitar a autoimunidade (MCCLAIN et al., 2005). Exposição a algumas drogas como por exemplo hidralazina, procainamida e isoniazida podem desencadear síndromes reversíveis semelhante ao LES (VEDOVE et al., 2009). Ademais, exposição a sílica e tabagismo são citados na literatura (COSTENBADER et al., 2004; PARKS et al., 2002).

A predisposição do LES é maior em mulheres principalmente na idade reprodutiva sugerindo um papel hormonal na patogênese. O hormônio estrogênio está associado a doenças autoimunes por ser capaz de estimular a sobrevivência e a ativação de células B autorreativas, e de participar na regulação de células dendríticas (GRIMALDI et al., 2002; LAFFONT; SEILLET; GUÉRY, 2017). Outro hormônio imunoestimulante é a prolactina. A prolactina no LES estimula a produção de citocinas pró-inflamatórias como a IL-6 e está relacionada com a produção de anti dsDNA e com sinais neurológicos, renais e hematológicos entre outros (SHELLY; BOAZ; ORBACH, 2012). Além da influência hormonal, sabe-se que os cromossomos sexuais estão relacionados com a doença e este fato foi demonstrado ao observar homens com a Síndrome de Klinefelter (47,XXY) apresentando maior incidência de LES (SCOFIELD et al., 2008).

Indivíduos predispostos geneticamente a terem LES ao serem expostos a fatores ambientais dão início a patogênese da doença. O sistema imunológico “anormal” passa a reconhecer antígenos próprios como ácidos nucleicos oriundos da remoção ineficaz de células apoptóticas e redes extracelulares dos neutrófilos (NET). O reconhecimento via receptor do tipo toll (TLR) pelas células dendríticas plasmocitóides (pDC) levam a expressão de IFN-I (α e β). Além disso, células da imunidade inata realizam a apresentação dos antígenos aos

linfócitos T que serão ativados e auxiliarão os linfócitos B na ativação e diferenciação em células efectoras e produtoras de autoanticorpos. Os autoanticorpos associados com os autoantígenos formam CI que se depositam em diferentes órgãos e tecidos levando a uma inflamação crônica local e sistêmica (TSOKOS, 2020; TSOKOS et al., 2016). Este mecanismo da patogênese do LES é elucidado na Figura 4.

O acesso a autoantígenos deve-se ao desequilíbrio da produção e remoção ineficaz de células apoptóticas. A eliminação lenta de células apoptóticas levam a necrose pós apoptótica. Com isso, há a formação de bolhas na membrana celular que se destacam da célula e contém fragmentos do material celular como a cromatina. Em condições normais, corpos apoptóticos são removidos e, assim o sistema imunológico não possui longo acesso a esses fragmentos. No LES há uma ocorrência excessiva de apoptose associado a um descarte de forma ineficiente dos detritos apoptóticos persistentes que estimularão o sistema imune levando a uma resposta inflamatória. Além disso, a presença de material apoptótico circulante estimula os neutrófilos a liberarem NET aumentando a presença de componentes como cromatina, dsDNA e proteínas granulares. (BOUTS et al., 2012; TEL et al., 2016).

O reconhecimento dos autoantígenos ocorre através de receptores expressos em células do sistema imunitário. Um exemplo são os receptores expressos nas células dendríticas como TLR7 e TLR9 endossômicos que irão reconhecer RNA de fita simples e DNA não metilado próprios resultando em uma cascata de sinalização e produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-6, TNF- α e quimiocinas (FRANSEN et al., 2010). As células dendríticas possuem um papel importante na expansão e diferenciação dos linfócitos B e T (SAUMA et al., 2017; TEICHMANN et al., 2010).

Um subtipo de células dendríticas chamadas de células dendríticas plasmocitoides são importantes fontes de IFN I no LES (FARKAS et al., 2001). A ausência das células dendríticas plasmocitoides em camundongos com LES resultou em uma diminuição da expressão de IFN-I e melhora na atividade da doença (ROWLAND et al., 2014). O IFN-I é uma citocina com ação imunomoduladora e age em diferentes células do sistema imune. O IFN I pode contribuir na maturação e migração de células dendríticas para órgãos linfoides secundários e, assim, aumentar a apresentação de autoantígenos. Atuam em linfócitos T ao inibir a apoptose e estimular a resposta Th1 e T citotóxica. Por outro lado, em linfócitos B podem induzir a diferenciação e produção de anticorpos e troca de classe de imunoglobulinas (RÖNNBLUM; ELORANTA; ALM, 2006). Além de IFN-I, há também a participação do

interferon do tipo II como o IFN- γ . Altos níveis de IFN- γ também são encontrados em pacientes com a doença ativa (AL-JANADI et.al., 1993). O IFN- γ em modelos murinos está correlacionado com a produção de autoanticorpos e glomerulonefrite (JACOB; MEIDE; McDEVITT, 1987; MUNROE et al., 2016).

No LES, há a participação de células da imunidade inata como células dendríticas e células da imunidade adaptativa como os linfócitos. Os linfócitos T são capazes de infiltrar em sítios inflamatórios como nos rins levando à inflamação e dano tecidual. Ademais, participam do recrutamento de células dendríticas ao local inflamado, na ativação e recrutamento de células B, e na produção de citocinas (COMTE; KARAMPETSOU; TSOKOS, 2015; STEINMETZ et al., 2009). No LES, os linfócitos apresentam uma resposta aberrante, o que leva há uma produção de citocinas em níveis desequilibrados. Tendo o exemplo a diminuição da produção de citocinas como IL-2 e aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-17. (MOULTON; TSOKOS, 2015). A IL-17 induz a produção de outras citocinas como IL-6, e auxilia em conjunto com outros fatores na ativação, proliferação e produção de autoanticorpos por linfócitos B (DONG et al., 2003), enquanto a IL-2 influencia na quantidade e função de linfócitos T regulatórias (Treg).

No que se refere aos linfócitos, existem dois subtipos celulares os linfócitos T CD4 e os T CD8. Os linfócitos T CD4 respondem a antígenos nucleossômicos como peptídeos derivados de histonas. Já os linfócitos T CD8 estão em menor atividade o que contribui para aumentar as infecções (KAMMER et al., 2002; MOHAN et al., 1993; TSOKOS et al., 2016).

Além dos linfócitos T, os linfócitos B apresentam um papel central na patogênese do LES. Sendo divididas em diferentes populações como linfócitos B-1 e linfócitos B-2 convencionais. Os linfócitos B-2 são os mais conhecidos e citados na literatura (SMITH; BAUMGARTH, 2019). Os linfócitos B-2 convencionais apresentam uma perda da tolerância no LES. Desse modo, os linfócitos B-2 passam a reconhecer constituintes próprios e se diferenciar em plasmócitos sendo capaz de secretar anticorpos contra esses constituintes (JACOBI et al., 2003). Em organismos saudáveis, as células produtoras de anticorpos autorreativos são deletadas na medula óssea e em fases posteriores do desenvolvimento na periferia (WARDEMANN et al, 2003). Em pacientes com lúpus, os linfócitos B-2 virgens autorreativos não são removidos, e um número maior de células B-2 autorreativas maduras virgens circulantes são detectáveis. Enquanto em indivíduos saudáveis anticorpos

polirreativos respondem por 6% dos anticorpos circulantes, em pacientes com LES 1/3 dos anticorpos são autorreativos (YURASOV et al., 2006).

Distúrbios de células B-2 levam ao aumento do número de células de memória juntamente com hipergamaglobulinemia decorrente de ativação policlonal (ODENDAHL et al., 2000); FLEISCHER et al, 2014). Além dessas alterações, outras como defeitos na seleção de células B, anormalidades do centro germinativo e elevação de respostas extrafoliculares, aumento da hipermutação somática, e alteração no compartimento de células B periféricas já foram relatadas no LES (ODENDAHL et al, 2000; LEE et al, 2009; JACOBI et al, 2003). Os linfócitos B-2 são hiper-responsivos no LES, sua ativação, expansão e a função efetora pode sofrer influência de IL-21, BAFF, IL-10, ativação de BCR, receptores semelhantes ao Toll 7 e Toll 9 que são indutores potentes da resposta do IFN-I e mostram maior relevância patogênica no LES. Os linfócitos B-2 mostram um envolvimento determinante no desenvolvimento do LES pois são capazes de apresentar antígenos, participar da ativação dos linfócitos T CD4 autorreativos além de produzir citocinas e autoanticorpos. (DÖRNER; GIESECKE; LIPSKY, 2011; SANG et al., 2018).

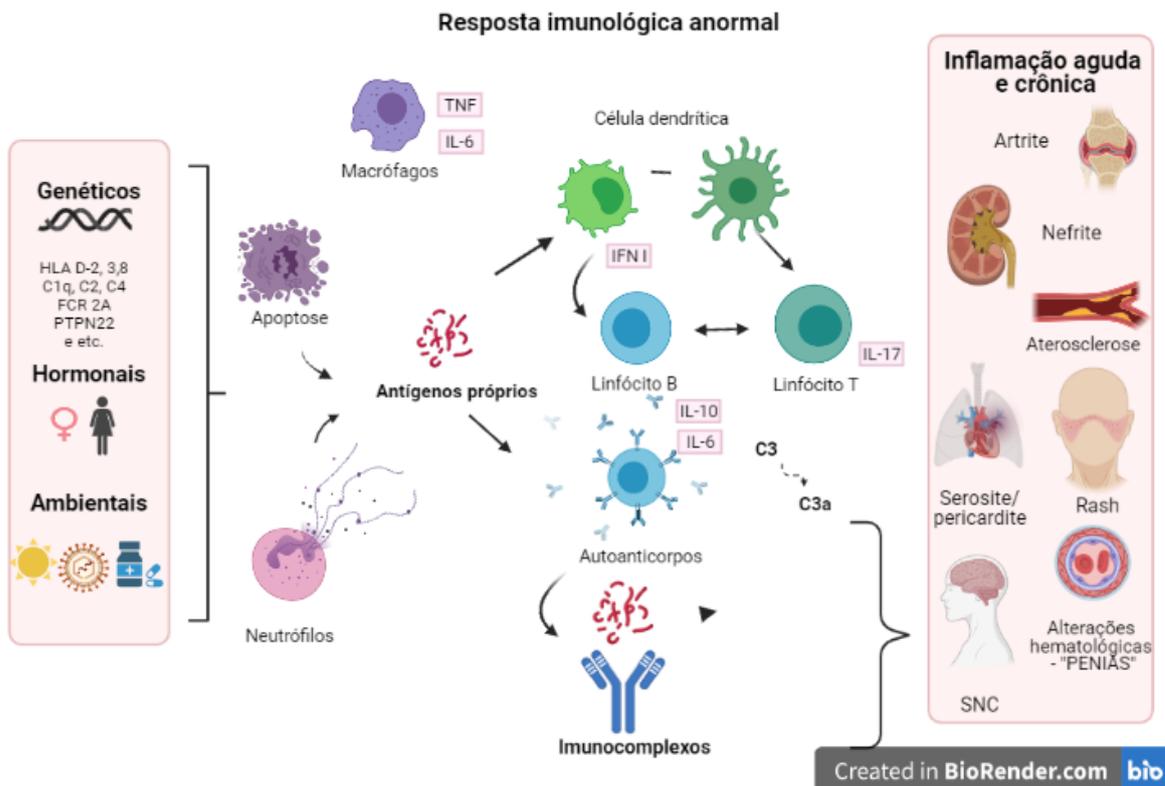


Figura 4 Patogênese do LES. Fatores genéticos, hormonais e ambientais contribuem para o desenvolvimento da doença. No LES, há uma quebra da tolerância e células do sistema imune inato e adaptativo passam a reconhecer, apresentar e responder a antígenos próprios, levando a produção de autoanticorpos. Ocorre

a formação de imunocomplexos que se depositam em diferentes órgãos e tecidos levando a uma inflamação aguda e crônica. – SNC: Sistema nervoso central. Adaptado de HAHN, 2012 ; TSOKOS et al., 2016b.

2.5 Linfócitos B-1

Dentre a população de linfócitos B, temos: os linfócitos B-1 e os linfócitos B-2 também chamados de linfócitos B convencionais. Os linfócitos B-1 e B-2 diferem em sua origem, ontogenia e fenótipo (SMITH; BAUMGARTH, 2019).

Os linfócitos B-2 são células produzidas na medula desde o nascimento até a fase adulta. Esse processo se inicia, através de células estaminais progenitoras hematopoiéticas que se comprometem a linhagem linfoide. E, então, diferencia em células pré B e pró B, que serão submetidas a um rearranjo em sua cadeia gênica leve e pesada (Cadeia D, V e J). O rearranjo ocorre ao acaso, e será responsável pela especificidade do receptor. Após esse rearranjo essas células são capazes de expressar em sua membrana receptores de células B (BCR), que são responsáveis pela iniciação da resposta humoral após apropriada estimulação por um imunógeno. Essas células então saem da medula e migram para os centros germinativos onde proliferam e finalizam seu processo de diferenciação. Durante o processo de maturação expressam imunoglobulina de superfícies como IgM e IgD. Após a maturação, os linfócitos B-2 residem em diferentes regiões dos órgãos linfoides secundários como baço ou gânglios linfáticos. Ao encontrarem o antígeno específico se diferenciam em células produtoras de anticorpos denominado de plasmócitos (PIEPER; GRIMBACHER; EIBEL, 2013).

Os linfócitos B-2 podem também apresentar antígenos, ao capturar partículas antigênicas por meio do BCR composto por IgM ou IgD, que ao interagir com o antígeno leva a endocitose desse complexo, conduzindo a apresentação do antígeno na superfície da célula via molécula de MHC de classe II, assim sendo reconhecido pelos linfócitos T auxiliares. O fenótipo observado em linfócitos B-2 é a expressão de IgD^{alta} , IgM^{baixa} , $CD23^{+}$ $CD19^{+}$ $CD11b^{-}$ e $CD5^{-}$ (BAUMGARTH et al., 2000).

Diferentemente dos linfócitos B-2, os linfócitos B-1 têm sua origem em tecidos embrionários e fetais. Há duas hipóteses acerca de sua origem, na primeira hipótese apresentada, os precursores dos linfócitos B-1 se distinguem dos linfócitos B-2, onde os precursores dos linfócitos B-1 derivam de células que reorganizam seus genes Ig durante o período fetal e neonatal, sendo assim ativados em diferentes momentos do desenvolvimento do sistema imunitário (HARDY; HERZENBERG; KANTOR, 1993). Na segunda hipótese,

autores propõem que tanto o linfócito B-2 quanto o linfócito B-1 vem de um progenitor comum, sendo influenciado por sinais específicos recebidos durante seu desenvolvimento e seleção (HAUGHTON et al., 1993).

Deste modo, os linfócitos B-1 são gerados e desenvolvem antes e semanas após o nascimento. Seus precursores estão presentes em múltiplos tecidos como saco vitelino embrionário, esplancopleura, fígado fetal e medula óssea neonatal. A partir desses precursores, os linfócitos B-1 são formados em diferentes ondas no neonato. Onde a primeira onda ocorre no saco vitelino, a segunda onda no fígado fetal e a terceira onda na medula (DORSHKIND; MONTECINO-RODRIGUEZ, 2007; MONTECINO-RODRIGUEZ et al., 2016). Com isso, o indivíduo nasce com uma quantidade definida de linfócitos B-1 maduros que é mantido ao longo do tempo por autorrenovação até a fase adulta. Os linfócitos B-1 residem majoritariamente na cavidade peritoneal e pleural podendo ser encontrados em menores quantidades no baço (HAYAKAWA et al., 1985). O fenótipo de superfície dos linfócitos B-1 é caracterizada pela expressão CD45R (B220)^{baixa}, IgM de superfície (sIgM)^{alta}, IgD de superfície (sIgD)^{baixa} e CD19^{alta}, além de apresentarem características de outras linhagens celulares tais como CD11b (MAC-1) que é um marcador mielóide. Os linfócitos B-1 estão divididos em B-1a e B-1b de acordo com a expressão de CD5. Os linfócitos B-1a expressam a molécula CD5 enquanto que as B-1b não expressam (YANG et al., 2007).

Os linfócitos B1-a (CD5⁺) são os principais responsáveis pela produção de anticorpos naturais como IgM, e essa produção ocorre independentemente do auxílio dos linfócitos T e da presença de antígenos. (FAGARASAN; HONJO, 2000). Apesar dos linfócitos B-1 residirem majoritariamente no peritônio, essas células podem migrar para outros órgãos quando necessário para secretar anticorpos. (DUAN; MOREL, 2006). Os linfócitos B-1 reconhecem os antígenos independente dos linfócitos T. Os antígenos reconhecidos geralmente são moléculas não proteicas, poliméricas, que estimulam a produção de imunoglobulina da classe IgM ou IgA com difícil troca de classes (CATELAN; JUNIOR, 2008). Além disso, o reconhecimento é limitado e normalmente polirreativo. podendo reconhecer estruturas conservadas como ácidos nucleicos, fosfolipídios e carboidratos como também promover a remoção de células apoptóticas e ativação do complemento (CHEN, Y. et al., 2009)

2.5.1 Linfócitos B-1 e autoimunidade

Em doenças autoimunes como: síndrome de Sjogren's, artrite reumatoide e em modelos de autoimunidade em camundongos como BWF1 (F1 NZBXNZW), observa-se um aumento de células B-1 (DAUPHINEE; TOVAR; TALAL, 1988; HAYAKAWA et al., 1985; PLATER-YBERK et al, 1985). Os linfócitos B-1 possuem características que podem contribuir com a patogênese de doenças autoimunes. Dentre elas, há a expressão de um repertório de BCR que é selecionado para auto e polirreatividade, a capacidade de apresentar antígenos, de reconhecer e participar da retirada de células apoptóticas e de produzir anticorpos naturais e citocinas como, por exemplo, a IL-10 que exerce uma ação moduladora tanto da resposta inflamatória aguda como crônica (BAUMGARTH, 2011; DUAN; MOREL, 2006).

A presença de bactérias ou LPS no peritônio leva a ativação dos linfócitos B-1 peritoneais, que migram para o foco inflamatório ou para órgãos linfóides secundários como o baço, onde irão se diferenciar em plasmócitos e secretar anticorpos contribuindo na resposta inflamatória (HA et al., 2006b; MOON et al., 2012). Os linfócitos B-1 secretam anticorpos naturais polirreativos da classe IgM e/ou IgA. Os anticorpos são produzidos na ausência de estímulo antigênico e de maneira independente de linfócitos T. Como consequência, contribuem para a homeostase através da manutenção de níveis basais de anticorpos circulantes, que são capazes de neutralizar patógenos atuando como uma primeira linha de defesa. Por conseguinte, podem reconhecer e eliminar células mortas.

Dentre as funções dos linfócitos B-1 há a produção de citocinas. Os linfócitos B-1 produzem de forma acentuada citocinas anti-inflamatórias como IL-10. A IL-10 é uma citocina imunomoduladora, capaz de suprimir células da imunidade inata e linfócitos T. Nos linfócitos B, induz a sobrevivência, proliferação e a produção de anticorpos. Sendo um retorno positivo para a proliferação de linfócitos B-1. Em modelo de camundongos com LES, a IL-10 apresentou um papel imunossupressor modulando a resposta inflamatória e inibindo a doença (SCAPINI et al., 2011). Ademais, os linfócitos B-1 podem apresentar antígenos e induzir a diferenciação dos linfócitos T em perfis inflamatórios como Th1 e Th17 (ZHONG et al., 2007)

A eliminação de linfócitos B-1 no peritônio de animais predispostos ao LES (NZB/NZW) através de injeções sucessivas de água, levou à diminuição da produção de anticorpos como antidsDNA e diminuiu lesões nos rins dos animais (MURAKAMI et al.,

1995). Além disso, a administração contínua de anticorpo anti IL-10 nos animais NZB/NZW atrasou a autoimunidade (ISHIDA et al., 1994). Outros autores comentam o aumento dos linfócitos B-1 no LES (WU et al., 2015; GRIFFIN; ROTHSTEIN, 2011). Mohan et al., 1988 observaram que linfócitos B-1a se acumulam no peritônio e baço, e essas células participavam da patogênese através da apresentação de antígenos. Também foi demonstrado que os linfócitos B-1 podem migrar para o timo e assim estimular a proliferação dos linfócitos T CD4 autorreativos (SATO et al., 2004). Na artrite autoimune, os linfócitos B-1a migraram para o sítio inflamatório nas articulações, e sua presença aumentou a gravidade e o dano da artrite (DENG et al., 2016). Os linfócitos B-1 apresentaram um papel patogênico também na diabetes mellitus tipo 1 e na anemia hemolítica autoimune (DIANA et al., 2012; NISITANI et al., 1995).

2.6 Modelo experimental murino

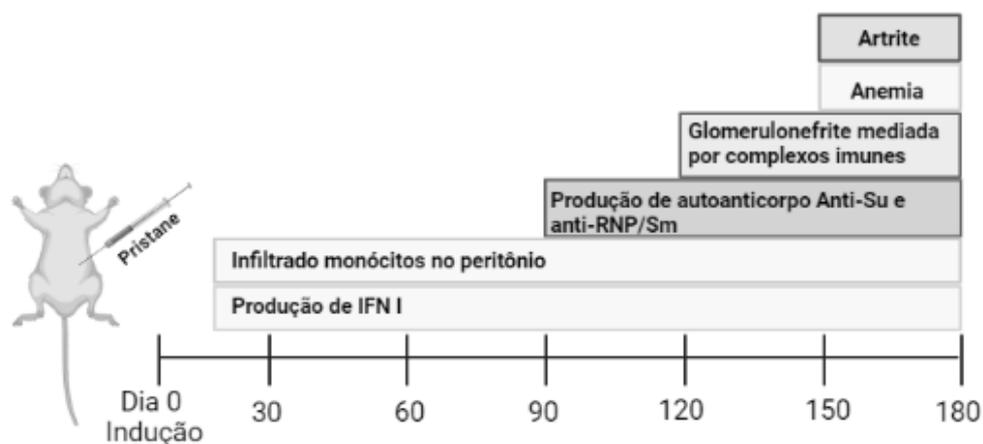
2.6.1 Indução do Lúpus eritematoso sistêmico com pristane

Os camundongos são os modelos experimentais mais utilizados para estudos sobre a etiologia, desenvolvimento e tratamento do LES (FREITAS; DE OLIVEIRA; MONTICIELO, 2017). Para estudo do LES em modelo murino, utilizam-se modelos espontâneos e modelos induzidos. Em modelos espontâneos os animais possuem predisposição genética em desenvolver um quadro semelhante ao LES de forma espontânea. Como exemplo, temos a F1 do acasalamento de duas linhagens de camundongos os NZB e NZW (NZB/W F1), e também a linhagem MLR/lpr. Por outro lado, em modelos induzidos, o quadro semelhante ao LES ocorre através de uma única injeção intraperitoneal da substância pristane em animais BALB/c ou C57/BL6 (MOREL et al., 2011).

Pristane (2,6,10,14-tetrametilpentadecano) é um alceno isoprenoide que se apresenta na forma de um óleo. Na natureza, este óleo pode estar presente em pequenas quantidades em vegetais, fígado de tubarão e subproduto da destilação de petróleo. Não se sabe totalmente sobre o mecanismo de ação da substância pristane (FREITAS et al., 2017). Entretanto, suspeita-se que o pristane é capaz de induzir a morte celular programada em linhagens linfóides e em células do exsudado peritoneal, o que poderia causar um aumento da oferta de autoantígenos suficientes para quebra da tolerância e desordem do sistema imunitário levando ao quadro semelhante ao LES (CALVANI et al., 2005). Sabe-se que drogas e numerosos agentes químicos são capazes de induzir a produção de autoanticorpos ou induzir uma síndrome semelhante àquela do LES. Entretanto, nenhum deles reproduz o espectro completo

dos autoanticorpos produzidos no LES (Burlingame & Rubin, 1991; Griem; Gleichmann, 1995).

A indução química por pristane é considerado o modelo mais próximo ao LES em humanos. Após a indução do LES com a substância pristane, segundo a literatura aproximadamente após duas semanas os animais produzem assinatura IFN-I também observada em grande quantidade em pacientes humanos com LES. Há também após três meses de estímulo uma produção ampla de autoanticorpos característicos do LES em humanos, tais como: antiribonucleoproteína (RNP) (anti-Su, anti-Sm, e anti-U1RNP), anti dsDNA, e anti-histona. A partir de quatro meses há maior atividade da doença, com deposição de complexos imunes nos rins levando a proteinúria e nefrite. Como também capilarite pulmonar, lipogranulomas, anemia e artrite (figura 5) (FREITAS et al., 2017).



Created in BioRender.com

Figura 5 Sinais clínicos observados ao longo do tempo após a indução química por pristane em camundongos BALB/c. Fonte: Adaptado de FREITAS et al., 2017.

2.6.2 Síndrome da imunodeficiência ligada ao X

Os camundongos XID são animais que apresentam uma mutação pontual no gene da tirosina quinase de bruton (Bruton's tyrosine kinase - Btk). A BTK tem papel importante na sinalização e desenvolvimento de células B, impedindo a ativação eficiente do BCR, com isso os linfócitos B-2 não cumprem adequadamente sua função havendo uma redução no número

de células B-2 maduras, e uma ausência quase completa da população de células B-1 (KERNER et al., 1995; SATTERTHWAITTE; LI; WITTE, 1998). Para a realização desta dissertação utilizamos a linhagem BALB/c XID com intuito de manter o mesmo padrão genético do animal BALB/c.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o papel das células B-1 na imunopatogênese do LES utilizando o modelo de indução química pelo pristane.

3.2 Objetivos específicos

- 1- Induzir o LES em camundongos BALB/c, XID e XID repopulado com células B-1 com pristane.
- 2- Avaliar a evolução do LES acompanhando o estado geral dos animais.
- 3- Identificar as populações leucocitárias no sangue periférico.
- 4- Evidenciar a dinâmica das alterações celulares do baço e cavidade peritoneal de camundongos BALB/c, XID e XID repopulado com células B-1.
- 5- Quantificar a produção das citocinas IL-10, IL-6 e IFN- γ .
- 6- Demonstrar as alterações histopatológicas nos rins e articulações em camundongos BALB/c, XID e XID repopulado com células B-1.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

No presente trabalho, foram utilizados animais BALB/c e BALB/c XID fêmeas de 8-10 semanas de idade. Camundongos isogênicos BALB/c foram obtidos no Biotério de Roedores do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, enquanto os animais BALB/c XID (deficientes de células B-1) foram fornecidos pelo Biotério do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Os animais foram mantidos em gaiolas estéreis, sob condições padronizadas de temperatura e luminosidade (ciclos de 12 h claro e 12 h escuro), com ração comercial e água a vontade. Todos os protocolos experimentais foram submetidos a CEUA/IV/UFRRJ sob o número 7555250419. Os camundongos foram mantidos em ambientes adequados com enriquecimento ambiental e todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento dos animais.

4.2 Transferência adotiva de células B-1

Com o intuito de avaliar o efeito das células B-1 no desenvolvimento do LES e com base em um protocolo previamente descrito (BALSAMO ABRAHÃO et al., 2003), camundongos BALB/c XID (deficientes em B-1), foram repopulados com células B-1 obtidas de camundongos BALB/c.

As células B-1 foram obtidas através do lavado peritoneal de camundongos BALB/c usando meio DMEM gelado (Gibco, Life Technologies). A população total de células do peritônio foi acondicionada em frascos de cultura de tecido de 25 cm² (Corning) e incubada em 37 °C numa atmosfera de 5% de CO₂ durante 2 h. As células não aderentes foram descartadas, e o meio DMEM contendo 2 mmol/L glutamina, 50 µmol/L 2-ME, 10 µg/mL de gentamicina, 1 mmol/L piruvato de sódio, e 100 µmol/L MEM aminoácidos não essenciais mais 10% de soro fetal bovino (SFB) foi adicionado à monocamada aderente. As culturas foram mantidas durante 5 dias sem alterar o meio nas condições descritas acima.

Após 5 dias de cultura, as células que estavam flutuantes, redondas e refringentes no sobrenadante de cultura, foram consideradas como células B-1. Essas células foram recolhidas, centrifugadas, ressuspensas com corante azul de Trypan (0,3%) e contadas em câmara de Neubauer com auxílio de microscópio óptico no aumento de 40x, e em seguida 1x10⁶ células B-1 foram inoculadas na cavidade peritoneal de camundongos XID. Após uma semana, os animais foram inoculados com pristane.

4.3 Indução de LES com pristane

Para a indução do LES, foi realizado um único inóculo de 500 μ L de pristane (Sigma-Aldrich) via intraperitoneal nos camundongos BALB/c, XID e XID repopulados com B-1. Animais que não foram induzidos com pristane foram utilizados como controle. Os grupos utilizados nos experimentos foram constituídos por um número mínimo de cinco camundongos. Em seguida, os animais receberam 12,5 mg/kg de Tramal® (Pfizer) por via intramuscular como estratégia de analgesia.

4.4 Avaliação do peso corporal e medida das articulações

Os animais foram pesados mensalmente em uma balança digital (MettlerToledo) desde o momento zero antes do inóculo com pristane até o momento da eutanásia. Animais com quadro de LES estabelecidos podem apresentar artrite, que provavelmente é decorrente de um processo inflamatório local devido a deposição de CI (FREITAS; DE OLIVEIRA; MONTICIELO, 2017). Desse modo, a articulação do tornozelo dos animais foi medida com auxílio de um paquímetro digital (Quick Mini Mitutoyo) (Figura 6).

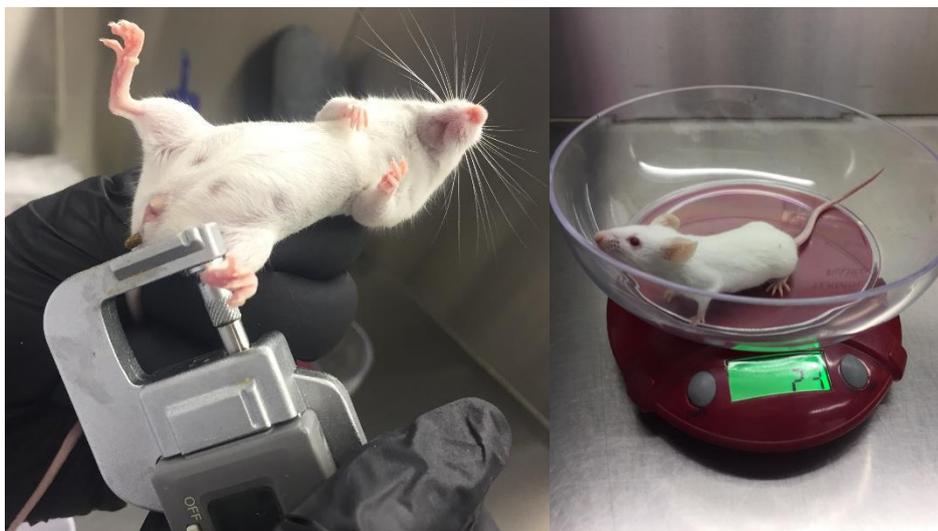


Figura 6 Imagem representativa da pesagem e medida da articulação dos animais. Fonte: Arquivo pessoal

4.5 ELISA para detecção de citocinas

Afim de avaliar o perfil das citocinas IL-6, IL-10 e INF- γ foi realizado o ensaio imunoabsorvente enzimático (ELISA). Para isso, no sexto mês após o inóculo do pristane foi coletado uma amostra do soro dos animais (200 μ L) através da técnica de punção intracardíaca (HOFF, 2000).

As amostras foram mantidas a -80 $^{\circ}$ C até a dosagem. As citocinas séricas foram dosadas pelo método de captura, seguindo o protocolo ELISA kits (Preprotech). Sensibilizou-se a placa de 96 poços com anticorpos padrão para IL-6, IL-10 e INF- γ por 24 horas, prosseguiu com bloqueio dos poços a favor de impossibilitar ligações inespecíficas. Em seguida, foi adicionado 50 μ l das amostras e para a curva padrão anticorpos recombinantes. Depois da lavagem, adicionou-se anticorpos de detecção e a reação foi revelada com estreptavidina-ficoeritrina. A leitura foi feita com leitor de ELISA (VERSAmax Tunable microplate reader – T4.0A) em 450 nm.

4.6 Contagem diferencial de leucócitos circulantes no sangue periférico

No sexto mês após a indução com o pristane, os animais foram anestesiados com isoflurano para punção intracardíaca. Parte da amostra de sangue coletada (10 μ L) através da punção intracardíaca na ausência de anticoagulante foi direcionada para a confecção manual do esfregaço sanguíneo em lâmina de vidro, com o auxílio de uma lâmina extensora. Em seguida as distensões foram fixadas e coradas por panóptico rápido (Kit Panótico Rápido - Laborclin) e a contagem diferencial dos leucócitos foi realizada por um microscópio óptico (OlympusTM modelo CX 41) em um aumento de 100x. A contagem diferencial é o valor absoluto da porcentagem de 100 células em relação ao número total de leucócitos, e foi realizado afim de avaliar a dinâmica celular de forma sistêmica.

4.7 Peso e tamanho do baço

O baço é um órgão linfóide secundário, importante para a resposta humoral de linfócitos B. Assim, após a eutanásia, foi retirado o baço dos animais com o auxílio de uma pinça e tesoura e colocado em uma placa de Petri. Após a retirada do órgão foi analisado o

tamanho do baço com o auxílio de uma régua de 30 cm. Em seguida, o baço foi colocado em um tubo eppendorf e pesado em balança analítica (Mettler toledo).

4.8 Citometria de fluxo

A dinâmica das populações celulares do baço e peritônio dos animais foram avaliadas pela técnica de citometria de fluxo. Para isso, após a eutanásia dos animais, foram obtidas células do peritônio através do lavado peritoneal, conforme metodologia detalhada por RAY e DITEEL (2010). As células totais do baço (esplenócitos) foram obtidas através do macerado do órgão. Após a obtenção das células, foi realizada a contagem na câmara de Neubauer e a quantidade ajustada a 5×10^5 por amostra em 100 μ L de PBS-SFB 1%. Após centrifugação, cada alíquota foi ressuspensa em PBS 1x acrescido com 1% de soro de camundongo BALB/c, a fim de realizar o bloqueio do receptor para Fc γ II e III. A incubação foi realizada a 4 °C por 30 minutos.

Após o bloqueio, as células foram lavadas e ressuspensas novamente em PBS-SFB 1%. Cada alíquota foi incubada com os anticorpos monoclonais adequados para análise dos marcadores de superfície. Foram utilizados os seguintes anticorpos monoclonais: anti-CD3 (PE), anti-CD4 (FITC), anti-CD8 (APC), anti-CD19 (APC), anti-IgM (FITC), anti-CD5 (PE) (eBioScience).

As células foram incubadas com os anticorpos marcados com os fluorocromos por 45 minutos, em banho de gelo e em ambiente escuro. Após a incubação, as células foram lavadas ressuspensas em 1mL de PBS-SFB 1%, colocadas em tubo para FACS e mantidos em banho de gelo. Para determinação das populações celulares, cada alíquota foi marcada com a combinação de dois, três ou quatro anticorpos conjugados a fluorocromos diferentes. As células foram avaliadas em citômetro de fluxo BD FACSCalibur™ na Plataforma de Imuno análise (PIA) localizada no Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho/UFRJ. Todos os gates e expressão dos marcadores foram determinados respeitando a fluorescência obtida com os isotipos controles.

4.9 Análise histopatológica

Após a eutanásia dos animais, as patas foram retiradas acima da articulação tíbio-társica, sendo imediatamente fixadas em paraformaldeído a 4% por 48 horas, descalcificadas

em solução de Morse (10% citrato de sódio e 22,5% de ácido fórmico, Morse, 1945), lavadas em água corrente, desidratadas em soluções crescentes de etanol, clarificados em xileno e embebidos em parafina. Os rins foram retirados da cavidade abdominal, seccionados longitudinalmente e fixados em solução de paraformaldeído a 4% por 48 horas, a 4 °C. Posteriormente foram desidratados em soluções crescentes de etanol, clarificados com xileno e embebidos em parafina. Os blocos, tanto das patas quanto dos rins, foram recortados em micrótomo rotativo e cortes de 5 µm de espessura foram obtidos, aplicados em lâminas histológicas e após secagem, foram corados pela hematoxilina-eosina (HE), PAS (ácido periódico seguido do reativo de Schiff) para a visualização das membranas basais tubulares e glomerulares, além do mesangio e pelo tricrômico de Masson modificado (Zollinger & Mihatsch, 1978) para visualização de depósitos de complexos imunes.

Os cortes histológicos foram observados em microscópio de luz e as lesões das articulações induzidas pelo pristane foram caracterizadas pela presença de modificações estruturais como inflamação sinovial, hiperplasia dos sinoviócitos, presença do pannus articular e erosão óssea (Hayer et al., 2020). O pannus é o exsudato inflamatório produzido pela membrana sinovial no interior de uma cápsula articular, seguido da formação de tecido de granulação (proliferação de fibroblastos, neovasos e de sinoviócitos), sendo responsável pela destruição do osso e da cartilagem articular (Lee & Weinblatt, 2001). Para caracterizar a gravidade da glomerulonefrite foi realizado escore semi-quantitativo da lesão glomerular segundo Kimura et al., (2011), modificado, utilizando imagens de alta resolução obtidas em microscópio de luz Eclipse E800 (Nikon, Japan) equipada com câmera fotográfica digital (Evolution VF, MediaCybernetics, USA) e acoplada a monitor.

As imagens dos glomérulos foram obtidas utilizando os cortes histológicos corados pelo PAS. Vinte glomérulos situados na região subcapsular e vinte, na transição cortico-medular, de cada animal, foram fotografados (lente objetiva 40x) e utilizados para obtenção do escore de lesão glomerular (0-4+). Foram considerados os seguintes parâmetros: aumento da matriz mesangial (PAS +) de forma segmentar ou global; hipertrofia glomerular; proliferação celular, espessamento da membrana basal do capilar glomerular, adesão parcial do podócito a camada parietal do corpúsculo renal, oclusão do capilar glomerular ou do espaço urinário e inflamação periglomerular e fibrose da cápsula de Bowman. O escore numérico considera 0 – sem lesão reconhecível; 1+: leve aumento da matriz mesangial PAS positiva, leve proliferação celular, leve espessamento da membrana basal do capilar glomerular e/ou adesão parcial do podócito a camada parietal do corpúsculo renal; 2+:

esclerose segmentar ou global (matriz PAS+ aumentada segmentar ou global), moderada proliferação celular, moderado espessamento da membrana basal do capilar glomerular e/ou hipertrofia glomerular; +3, o mesmo da lesão de grau 2 com aumento da matriz mesangial ocupando 50% da área glomerular e/ou adesão intensa da camada parietal do corpúsculo renal; 4+: desaparecimento da luz do capilar glomerular ou do espaço urinário; esclerose global do glomérulo e/ou inflamação periglomerular e fibrose da cápsula de Bowman, intensa proliferação celular, intenso espessamento da membrana basal do capilar glomerular e/ou intensa hipertrofia glomerular.

4.10 Análise estatística

Os dados foram analisados pelo teste estatístico Análise de Variância (ANOVA) para amostras não pareadas e pelos pós-testes de Dunnett para comparações individuais com o grupo controle, utilizando o software GraphPad Prism 5.0. Análises mostrando $p < 0,05$ foram consideradas significativas. Os resultados da análise histopatológica (score histológico da lesão glomerular e espessamento das alças capilares glomerulares) foram avaliados através de teste estatístico, teste T não paramétrico seguido do pós-teste Mann-Whitney considerando $P < 0,05$ como significativo.

4.11 Fluxograma do desenho experimental

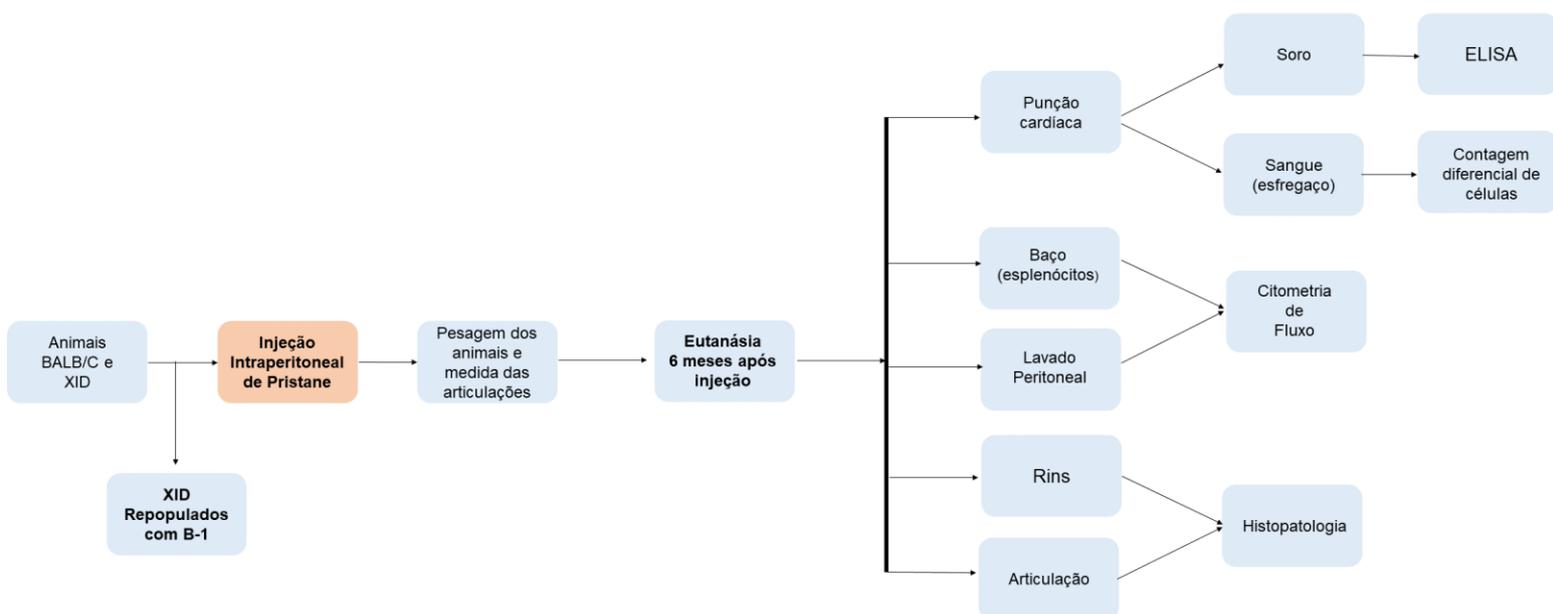


Figura 7 Resumo gráfico da metodologia experimental. Nos animais BALB/c, XID e XID repopulados com células B-1, foi administrado um único inóculo intraperitoneal de pristane e animais que não sofreram indução foi utilizado como controle. Ao longo do tempo os animais foram pesados e medido a articulação do tornozelo. Após 6 meses de indução com pristane os animais foram eutanasiados. Após a eutanásia, foi realizado a punção cardíaca, onde se obteve o soro para posterior dosagem de citocinas pelo método de ELISA, além da obtenção do sangue para a confecção do esfregaço sanguíneo que posteriormente foi feito a contagem diferencial de células com auxílio de um microscópio no aumento 100x. Foi realizado também o lavado peritoneal, retirada do baço para obtenção dos esplenócitos, e essas células foram utilizadas para a análise em citometria de fluxo. Por fim, foi retirado os rins e as patas para técnica de histopatologia. Fonte: Elaborado pela autora.

5 RESULTADOS

5.1 Estado geral após indução com pristane

5.1.1 Avaliação do peso dos animais

A administração de pristane no peritônio de camundongos desencadeia diferentes manifestações clínicas similares às encontradas em humanos com LES. Dentre as manifestações observadas há a produção de autoanticorpos, inflamação crônica local (lipogranulomas), artrite e o acúmulo de líquido no abdômen (ascite) (FREITAS; DE OLIVEIRA; MONTICIELO, 2017).

Com base nessas informações, foi avaliado o estado geral dos animais após a indução de pristane ao longo dos meses até o momento da eutanásia. Sendo que o mês um foi o momento da indução com pristane.

Foi observado que ao longo do tempo apenas camundongos BALB/c pristane apresentaram aumento de peso em gramas (Figura 8). O ganho de peso foi significativo a partir de 5 meses após indução com pristane (Figura 9A), sendo crescente ao longo dos meses (Figura 9B) (***) ($p < 0,001$; **, $p < 0,01$).

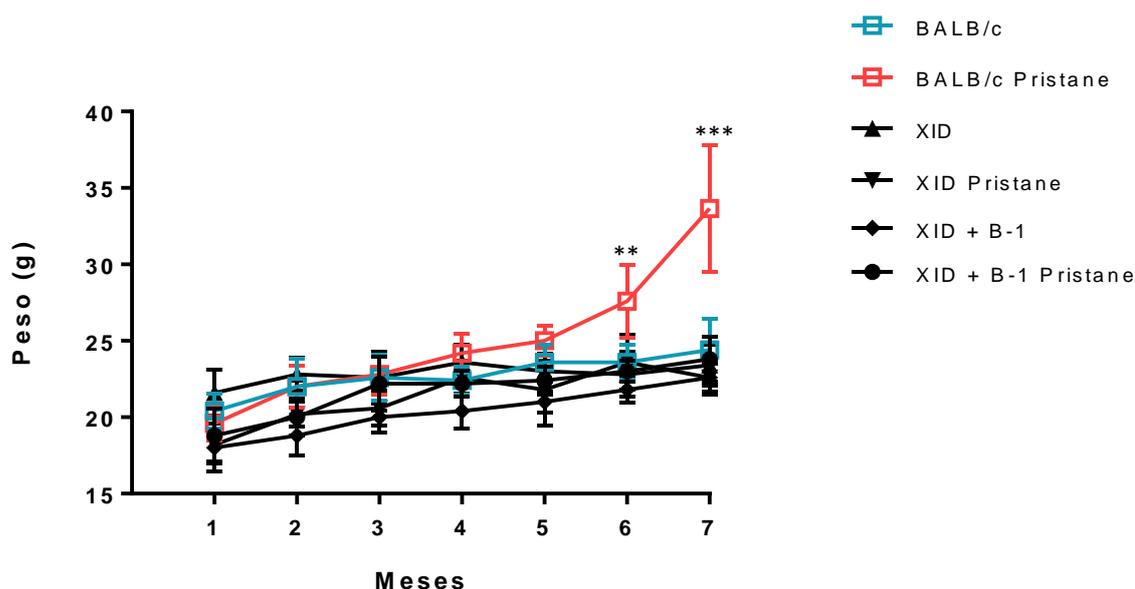


Figura 8 Avaliação do ganho de peso ao longo dos meses no modelo LES induzido por pristane. O mês 1 foi o momento da indução com pristane. Apenas animais BALB/c pristane apresentaram ganho de peso. As diferenças entre o peso em gramas de cada camundongo no início e final do experimento foi medido por balança digital (MettlerToledo) e foram analisadas estatisticamente $n=5$ (***, $p < 0,001$; **, $p < 0,01$; *, $p < 0,05$).

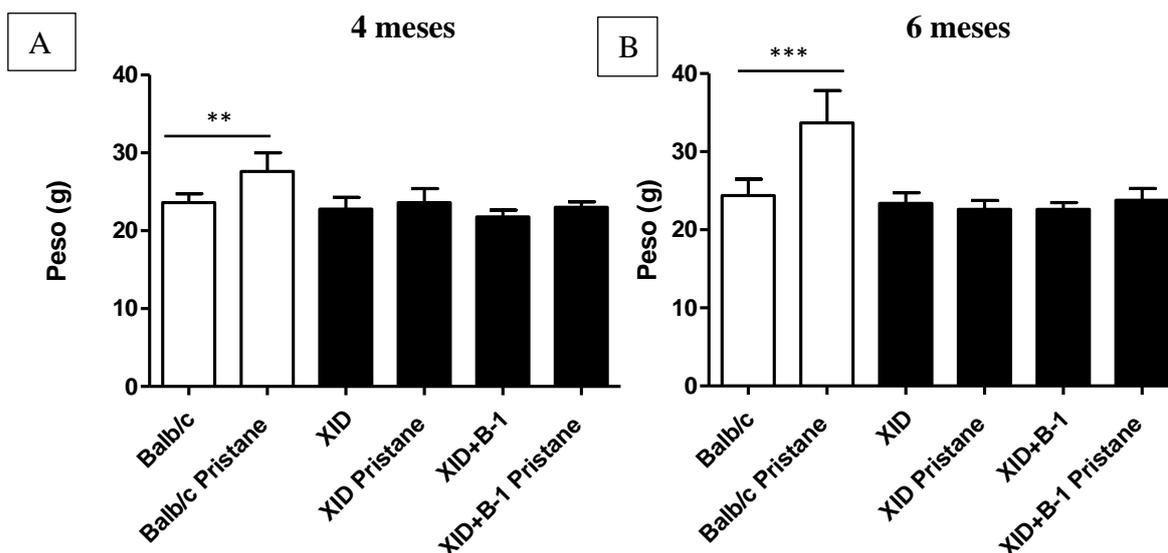


Figura 9 Ganho de peso em animais BALB/c no modelo LES induzido por pristane. Apenas animais BALB/c pristane apresentaram ganho de peso. Em (A) peso em gramas dos animais após 4 meses de indução, e em (B) peso em gramas dos animais após 6 meses de indução. As diferenças entre o peso de cada camundongo no início e final do experimento foi medido por balança digital (MettlerToledo) e foram analisadas estatisticamente $n = 5$ (***, $p < 0,001$; **, $p < 0,01$; *, $p < 0,05$).

5.1.2 Presença de ascite nos animais BALB/c pristane

A presença de ascite em pacientes com LES é incomum (MCVORRAN; SONG; POCHINENI, 2016), ao contrário do que é observado em modelo murino induzido com pristane. Nesse modelo, o líquido na cavidade peritoneal (ascite) é enriquecido com autoanticorpos (SATOH; REEVES, 1994).

Foi observado que além do ganho de peso, 20% dos animais BALB/c pristane apresentaram aumento de líquido na cavidade abdominal (Figura 10).

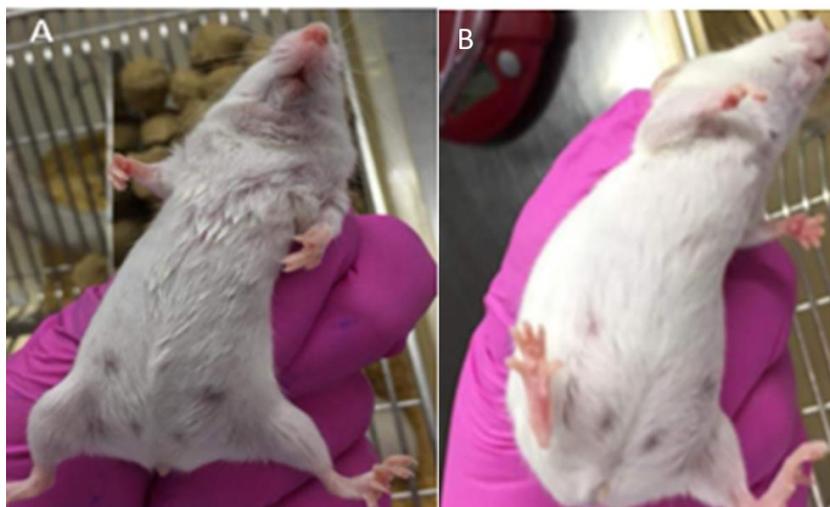


Figura 10 Presença de ascite em camundongos BALB/c pristane. Após 6 meses de estímulo, 20% dos animais BALB/c pristane apresentaram acúmulo de líquido na cavidade peritoneal. Em (A) BALB/c controle, e em (B) BALB/c estimulado com pristane.

5.1.3 Avaliação do edema articular

Camundongos tratados com pristane podem apresentar sinais clínicos de artrite erosiva sendo mais comum nas articulações do tornozelo e punho (HOPKINS et al.,1984; POTTER; WAX 1981). Desse modo, foi medido mensalmente as articulações do tornozelo dos animais com o auxílio de um paquímetro digital (Quick Mini Mitutoyo) até o momento da eutanásia. Com intuito de avaliar a presença de edema na região articular.

BALB/c pristane foi o único grupo que apresentou aumento estatisticamente significativo no tamanho da articulação em milímetros (mm) ao longo do tempo (Figura 11) (***, $p < 0,001$; **, $p < 0,01$). Não houve diferença entre a pata direita com a pata esquerda.

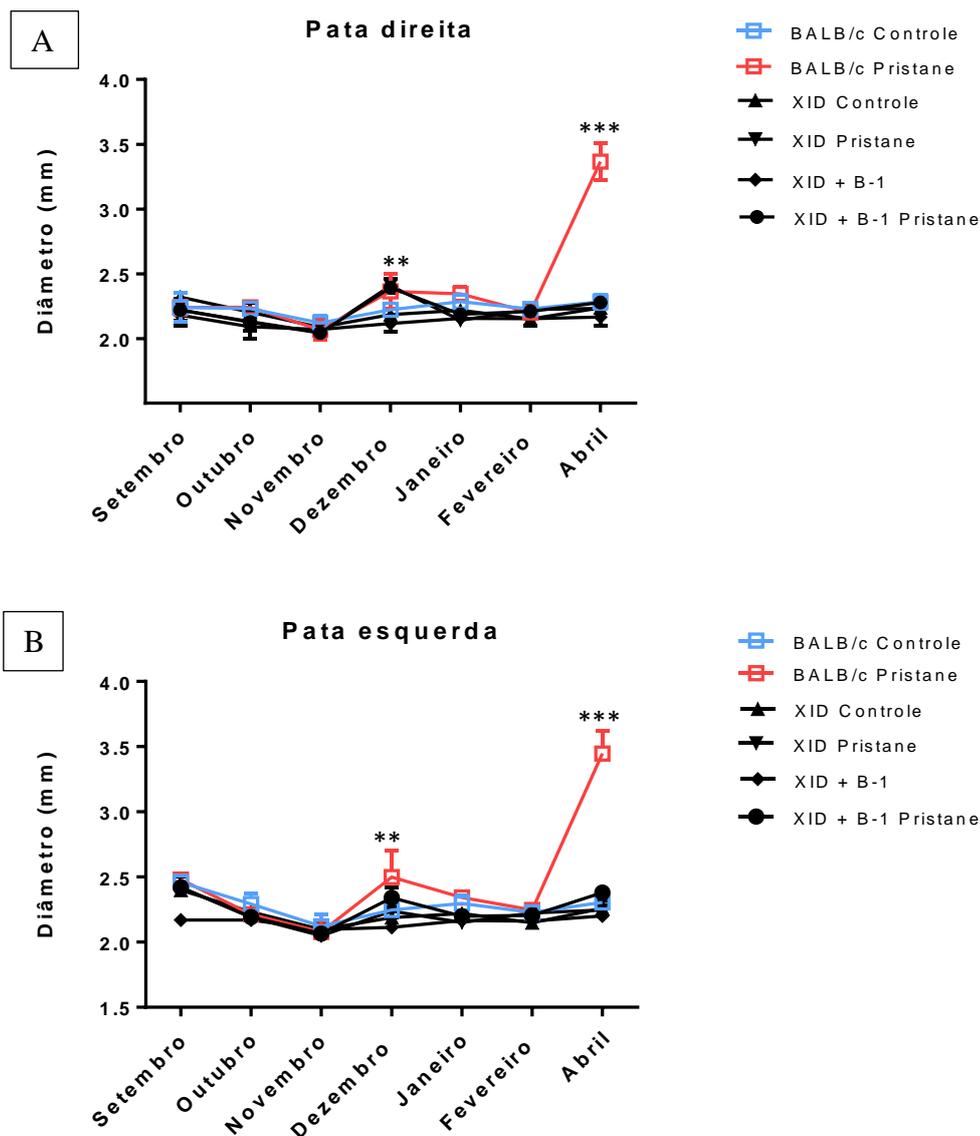


Figura 11 Medida das articulações no modelo LES induzido por pristane. Apenas camundongos BALB/c pristane apresentaram aumento no tamanho das articulações em milímetros (mm). Em (A) medida da articulação do tornozelo do lado direito (B) medida da articulação do tornozelo do lado esquerdo. As diferenças entre o tamanho das articulações no início e final do experimento foi medido por paquímetro digital (Quick Mini Mitutoyo) e foram analisadas estatisticamente n= 5 (***, p < 0,001; **, p < 0,01; *, p < 0,05).

5.1.4 Presença de edema nas articulações dos animais BALB/c pristane

Foi possível observar macroscopicamente que 30% dos animais BALB/c pristane apresentaram edema nas articulações. Essa presença de edema pode estar associada ao quadro inflamatório nas articulações (artrite) (Figura 12).



Figura 12 Presença de edema articular em animais BALB/c induzidos por pristane. Após estímulo, 30% dos camundongos BALB/c apresentaram edema, podendo indicar um possível estabelecimento de um quadro de artrite. Em (A) ausência de edema nos animais controle, (B) BALB/c pristane com edema unilateral, e em (C) BALB/c pristane com edema bilateral após 6 meses de estímulo.

5.1.5 Presença de lipogranulomas

A presença de lipogranulomas é observada tanto em pacientes com LES quanto em modelos induzidos com pristane (FREITAS; DE OLIVEIRA; MONTICIELO, 2017). Para observar a presença de lipogranulomas nos animais após 6 meses de indução com pristane, os animais foram eutanasiados e em seguida foi exposta a cavidade abdominal. Na qual foi observado a presença de lipogranulomas (seta amarela) aderidos ao diafragma, no fígado e em todo o peritônio dos camundongos BALB/c pristane, XID pristane e XID repopulado com B-1 (Figura 13).

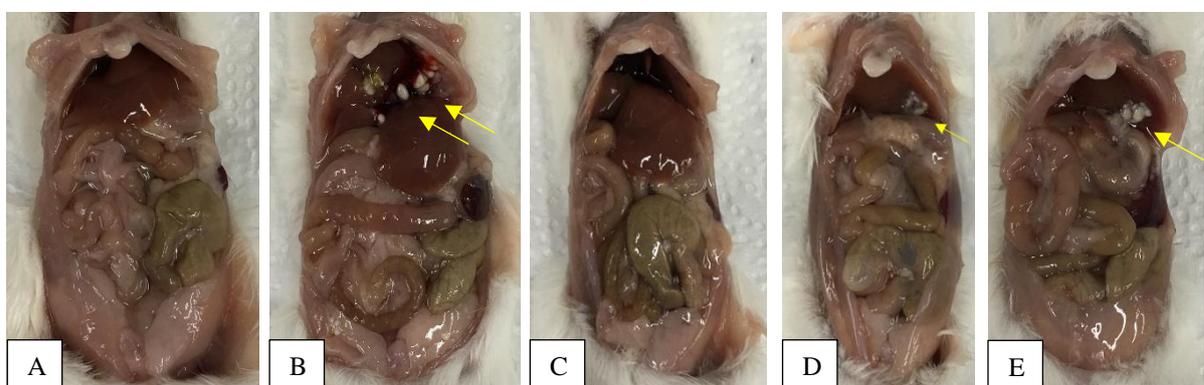


Figura 13 Presença de lipogranulomas em animais após 6 meses de indução por pristane. Camundongos BALB/c pristane, XID pristane e XID repopulado com B-1 apresentaram lipogranulomas (seta amarela). Em (A) BALB/c, (B) BALB/c pristane, (C) XID, (D) XID pristane e (E) XID repopulado com B-1.

5.2 Dinâmica celular do sangue periférico

Até o momento foi observado que animais que possuem B-1 apresentam de forma mais evidente sinais clínicos semelhantes ao LES, em destaque os animais BALB/c pristane. Em comparação, os animais XID apresentaram proteção quanto ao desenvolvimento dos sinais clínicos. Com isso, foi verificado se a presença de linfócitos B-1 poderia alterar outras populações celulares que estariam envolvidas na patogênese do LES. Desse modo, foram avaliadas as células do sangue periférico, do baço e da cavidade peritoneal. A análise foi realizada após 6 meses de indução quando o modelo de LES está bem estabelecido (FREITAS; DE OLIVEIRA; MONTICIELO, 2017).

Foi realizado o esfregaço sanguíneo a partir da punção cardíaca. Em seguida, as lâminas foram coradas em panóptico rápido e feito a contagem diferencial dos leucócitos. Ao avaliar a porcentagem de linfócitos totais no sangue periférico, foi observado que não houve diferença significativa entre os grupos controles e seus respectivos grupos estimulados com pristane. Porém, os animais induzidos com pristane como o BALB/c e XID repopulado com B-1 apresentaram maior número de linfócitos quando comparados aos animais XID (Figura 14).

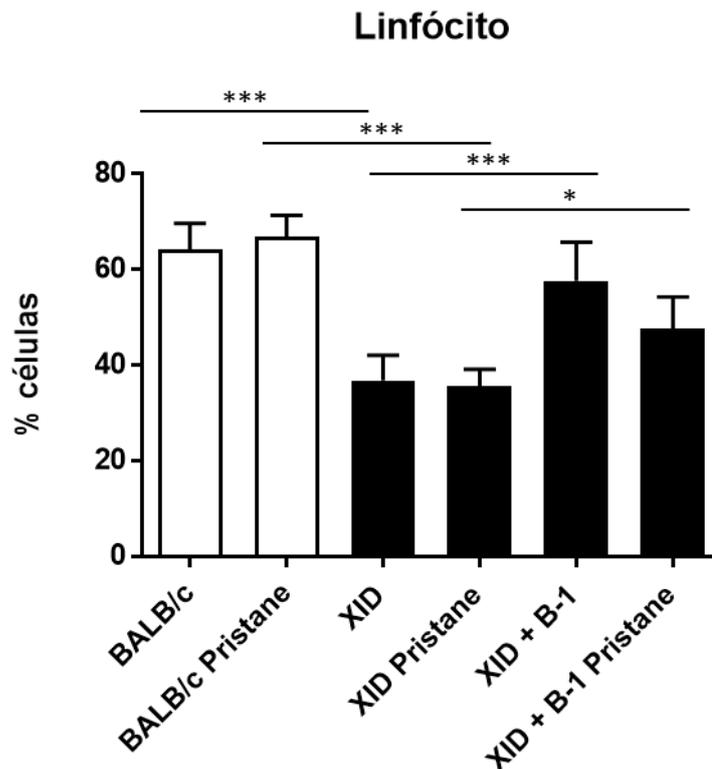


Figura 14 Porcentagem de linfócitos no sangue periférico dos animais BALB/c, XID e XID repopulado com B-1. Porcentagem de linfócitos no sangue periférico de camundongos controle e estimulados com pristane após 6 meses de indução (n=5). O sangue foi obtido através da punção cardíaca, em seguida foi realizado o esfregaço sanguíneo e as lâminas foram coradas com panótico rápido. A leitura foi realizada em microscópio óptico no aumento de 100x. (***, $p < 0,001$; **, $p < 0,01$; *, $p < 0,05$).

Ao analisar a porcentagem de neutrófilos totais no sangue periférico, os animais XID revelaram um padrão significativamente aumentado de neutrófilos quando comparado aos camundongos BALB/c (***, $p < 0,001$) (Figura 15). Um fato interessante foi a observação de que os camundongos XID repopulados apresentaram números de neutrófilos semelhantes aos BALB/c. Além disso, esses animais revelaram elevação significativa após tratamento com pristane.

Não houve diferença significativa entre os animais BALB/c e BALB/c pristane ou XID e XID pristane após 6 meses de indução (Figura 15).

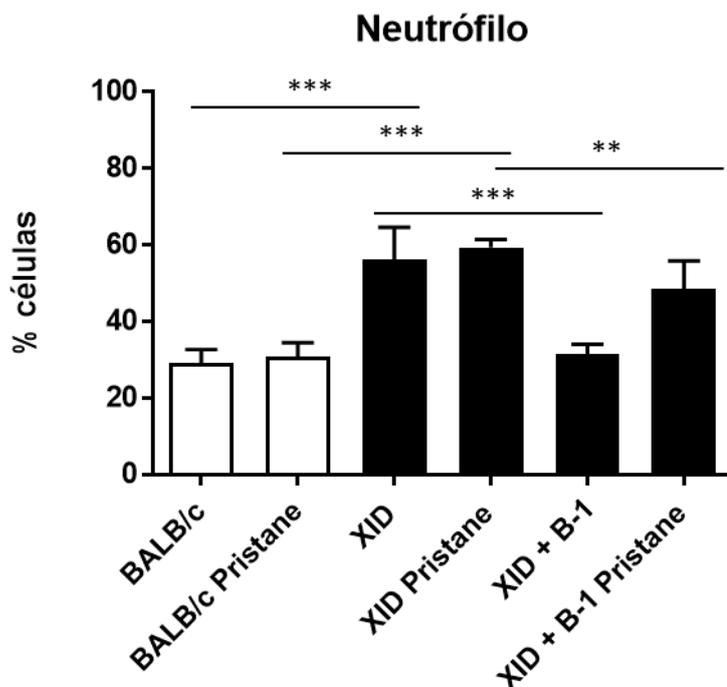


Figura 15 Porcentagem de neutrófilos totais no sangue periférico dos animais BALB/c, XID e XID repopulado com B-1. Porcentagem de neutrófilos no sangue periférico de camundongos controle e estimulados com pristane após 6 meses de indução (n=5). O sangue foi obtido através da punção cardíaca, em seguida foi realizado o esfregaço sanguíneo e as lâminas foram coradas panótico rápido. A leitura foi realizada em microscópio óptico no aumento de 100x. (***, $p < 0,001$; **, $p < 0,01$; *, $p < 0,05$).

Por fim, ao avaliar a porcentagem de monócitos no sangue periférico, após 6 meses de indução, todos os animais estimulados com pristane apresentaram aumento no número de monócitos ao comparar com seus grupos controles. Porém, não houve diferença entre os grupos de animais BALB/c, XID e XID repopulado com B-1 (Figura 16).

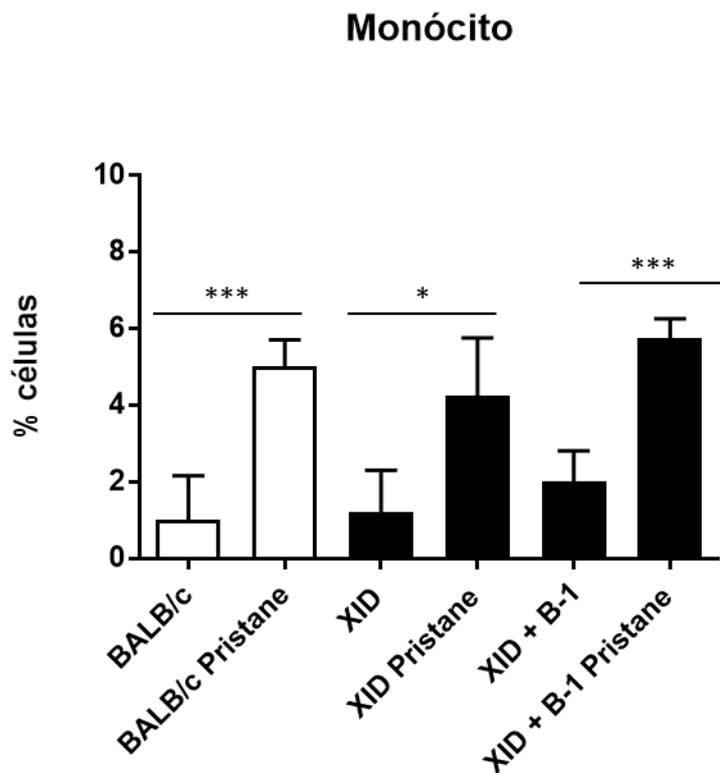


Figura 16 Porcentagem de monócitos no sangue periférico de camundongos BALB/c, XID e XID repopulado com B-1. Porcentagem de monócitos no sangue periférico de camundongos controle e estimulados com pristane após 6 meses de indução (n=5). O sangue foi obtido através da punção cardíaca, em seguida foi realizado o esfregaço sanguíneo e as lâminas foram coradas com panóptico rápido. A leitura foi realizada em microscópio óptico no aumento de 100x. (***, $p < 0,001$; **, $p < 0,01$; *, $p < 0,05$).

5.3 Dinâmica celular do baço

5.3.1 Tamanho e peso do baço

O baço é um órgão linfóide secundário onde residem células do sistema imunitário inato e adaptativo, sendo responsável por iniciar a resposta adaptativa aos antígenos capturados do sangue (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008). É um órgão importante para a resposta humoral, além de ser um dos nichos de sobrevivência dos plasmócitos de vida longa

(BRENDOLAN et al., 2007; HOYER; MANZ; RADBRUCH, 2005). Indivíduos com LES podem apresentar aumento no baço (esplenomegalia) associado a atividade da doença (VAIOPOULOS et al., 2015).

Para avaliar a esplenomegalia nos animais, o baço foi retirado e com auxílio de uma régua foi medido o seu tamanho, e em seguida foi pesado. Ademais, foi feita a caracterização fenotípica das células do baço através da técnica de citometria de fluxo.

Ao pesar o baço dos animais observamos que os animais com B-1 estimulados com pristane tiveram um aumento no peso em gramas do baço (Figura 17). Esse aumento também foi observado macroscopicamente, no qual os baços dos animais que tinham B-1 apresentavam-se maiores e mais escuros ao comparar com os animais XID (Figura 18).

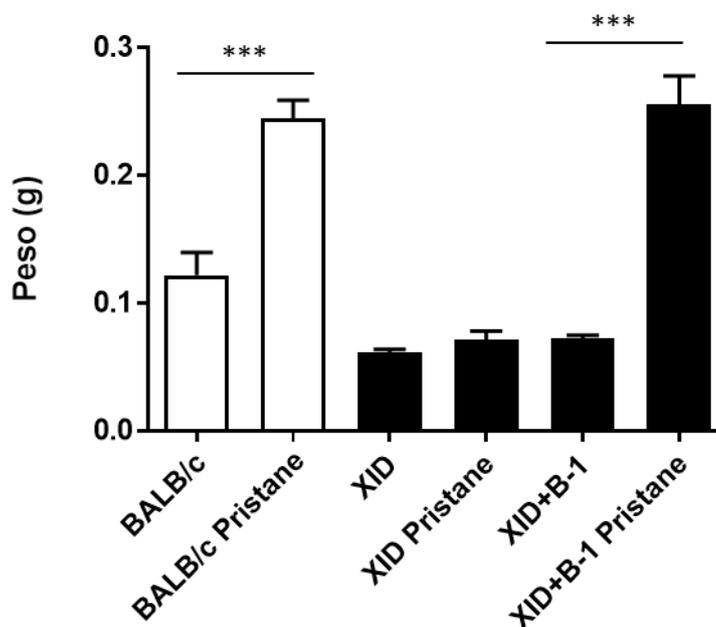


Figura 17 Peso do baço dos animais. Gráfico comparativo do peso dos baços dos animais BALB/c, XID e XID repopulado com B-1 controle e estimulados com pristane. n=5 ***, p < 0,001.

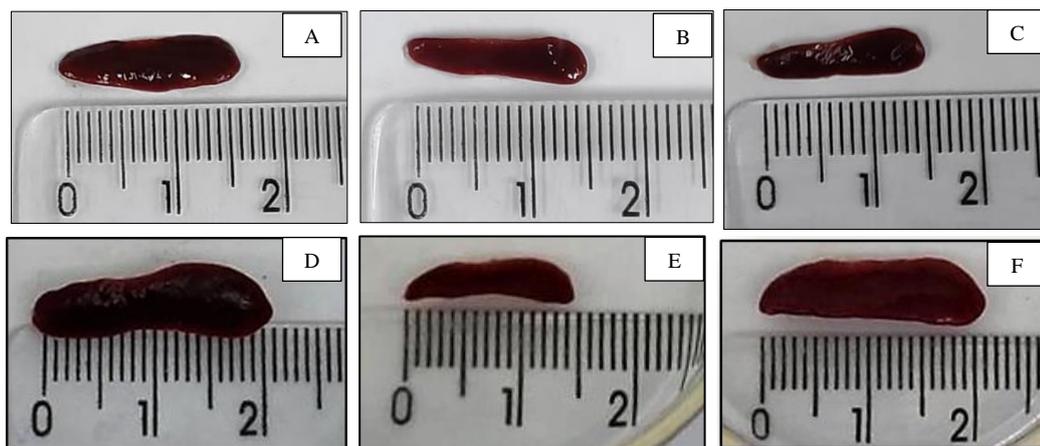
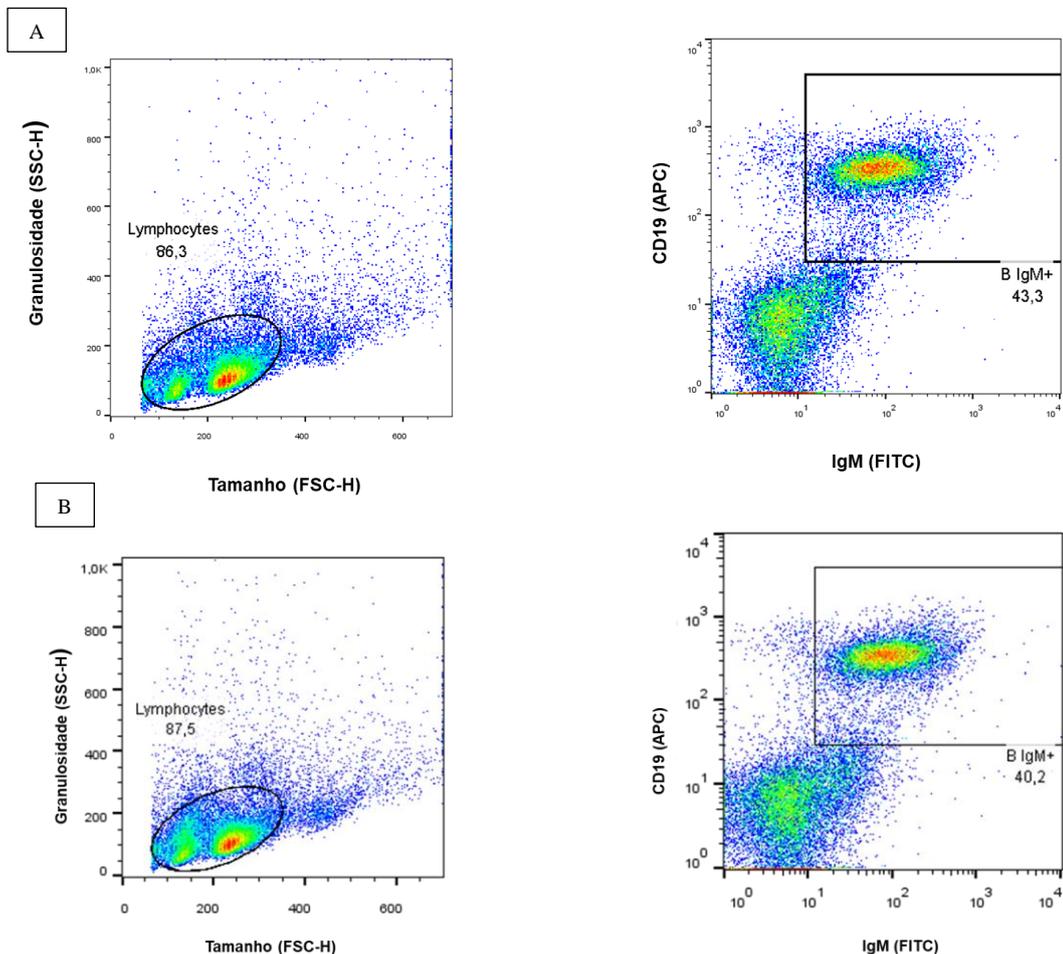


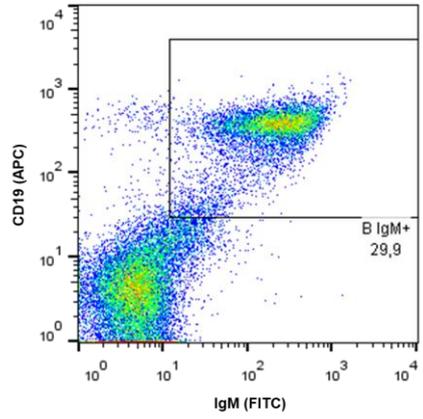
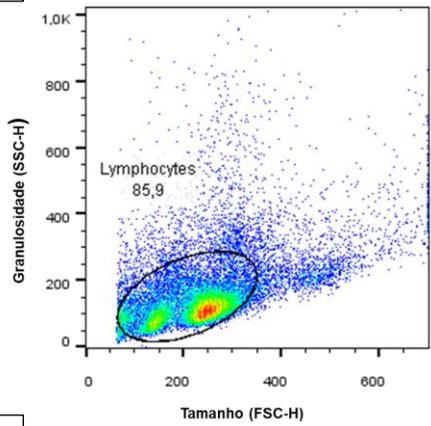
Figura 18 Análise macroscópica do tamanho do baço dos animais estimulados com pristane. Em (A) baço dos animais BALB/c, (B) baço dos animais XID, (C) baço dos animais XID repopulado com B-1, (D) baço dos animais BALB/c pristane, (E) XID pristane e em (F) XID repopulado com B-1.

5.3.2 Caracterização fenotípica das células do baço

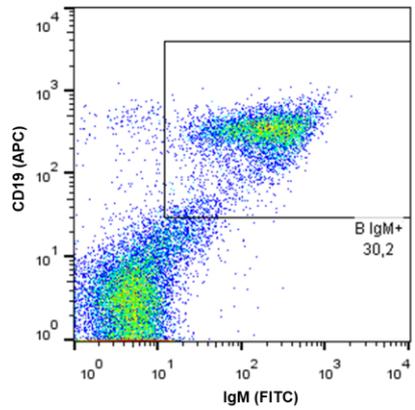
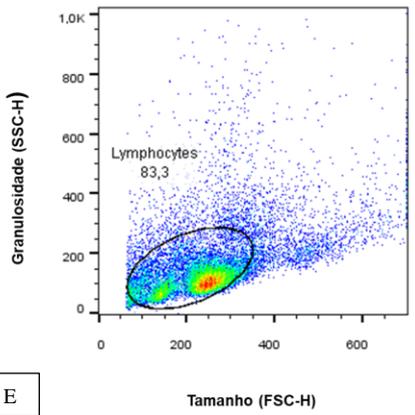
Como dito anteriormente o baço é um órgão importante na resposta humoral (BRENDOLAN et al., 2007; HOYER; MANZ; RADBRUCH, 2005). Com isso, para observar as populações de linfócitos B do baço selecionamos as populações de acordo com o tamanho e granulosidade e pela expressão de CD19 (APC) e IgM (FitC) (Figura 19 e 20), o número total de linfócitos B nos animais BALB/c foi maior do que nos animais XID (** $p < 0,001$) (Figura 21 A). Em contrapartida, ao analisar a população de linfócito T (CD3⁺) os animais XID ao serem estimulados com pristane tiveram um aumento no número de linfócitos T CD4 (CD4⁺) (* $p < 0,05$) (Figura 21 B). Enquanto que ao avaliar os linfócitos T CD8 (CD8⁺) apenas os animais BALB/c pristane tiveram aumento significativo quando comparado aos animais XID pristane (** $p < 0,001$) (Figura 21 C).



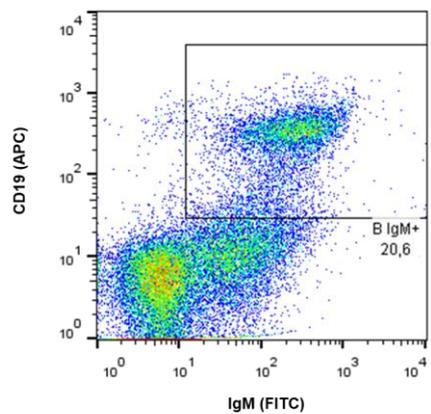
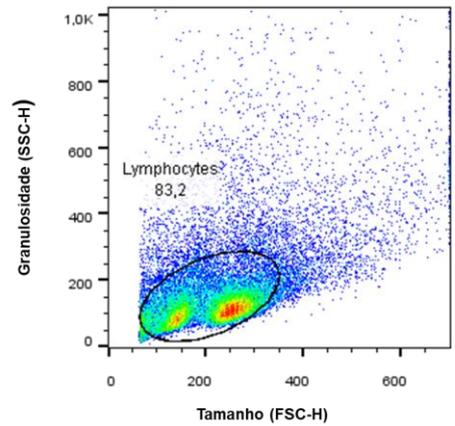
C



D



E



F

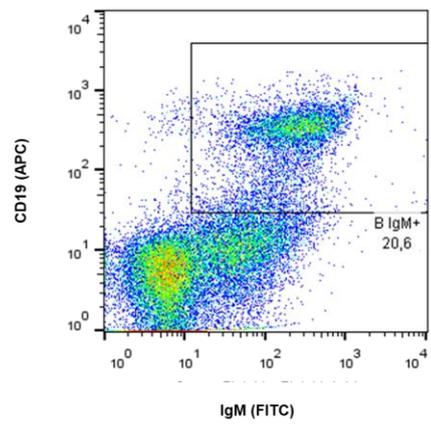
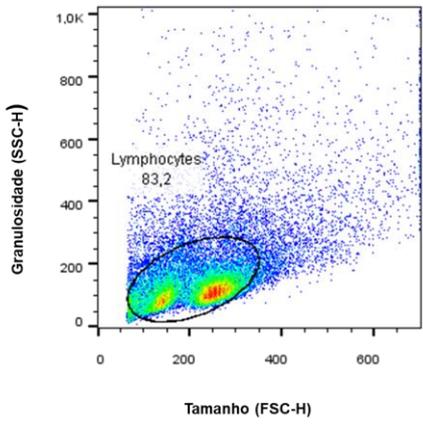
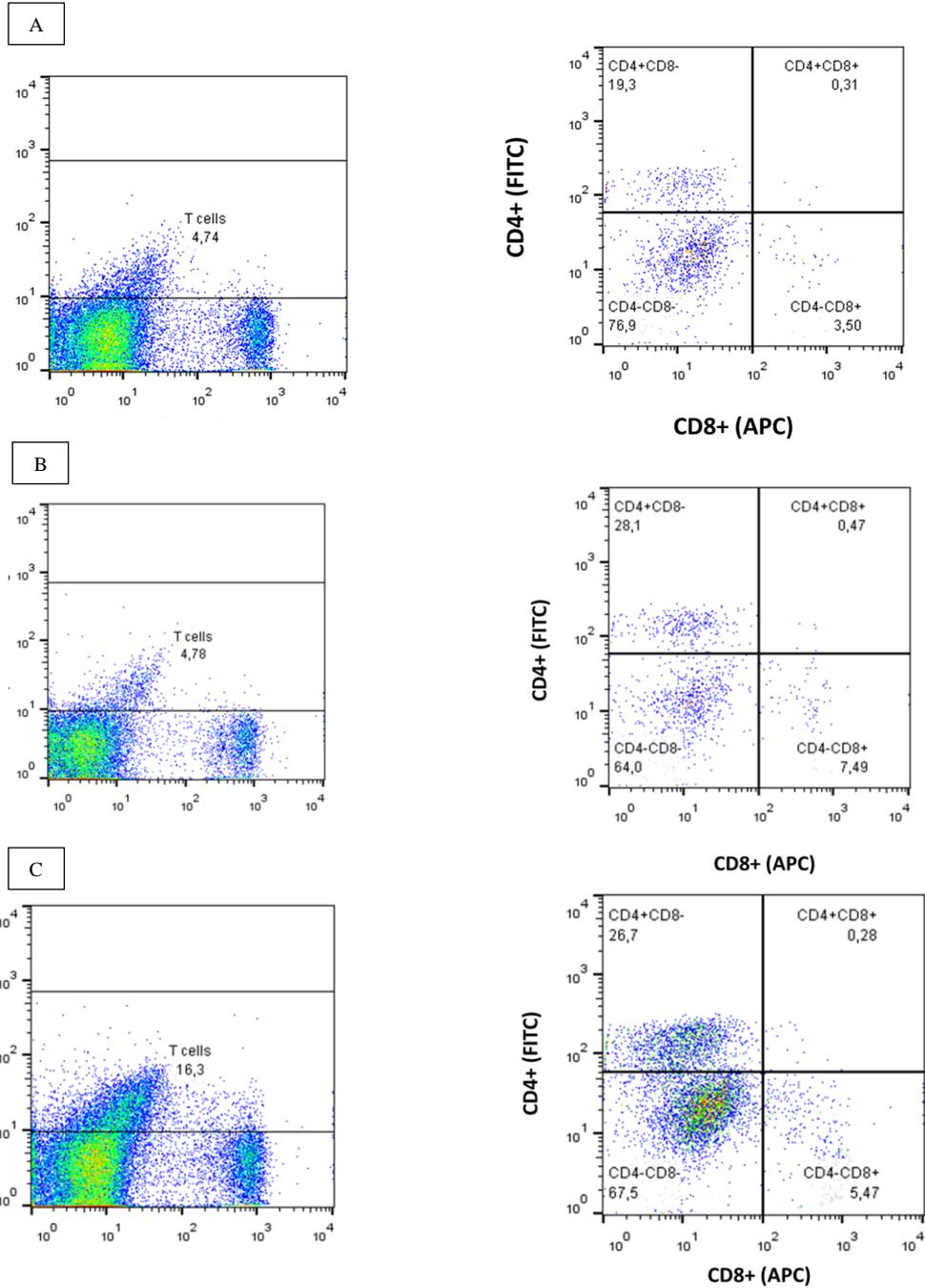


Figura 19 População de linfócitos B totais no baço. Gates representativos da citometria de fluxo dos linfócitos B totais do baço (CD19⁺ IgM⁺) dos camundongos em (A) BALB/c controle, (B) BALB/c pristane, (C) XID controle, (D) XID pristane, (E) XID repopulado com B-1 (F) XID repopulado com B-1 induzido com pristane.



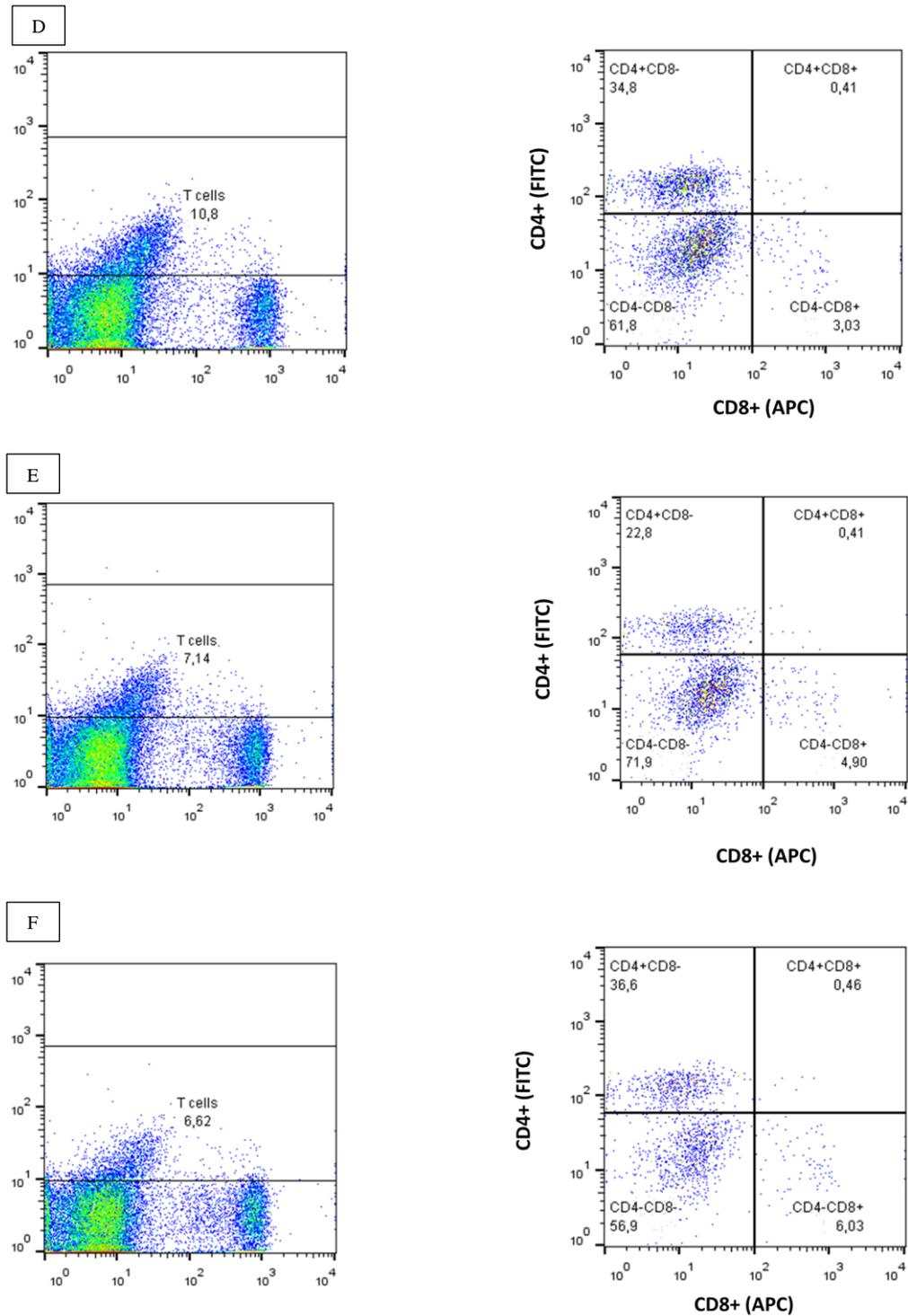


Figura 20 População de linfócitos T totais no baço. Gates representativos da citometria de fluxo dos linfócitos T totais do baço TCD4⁺ (CD4⁺ CD8⁻) e TCD8⁺ (CD4⁺ CD8⁺) dos camundongos em (A) BALB/c controle, (B)BALB/c pristane, (C) XID controle, (D) XID pristane, (E) XID repopulado com B-1 (F) XID repopulado com B-1 induzido com pristane.

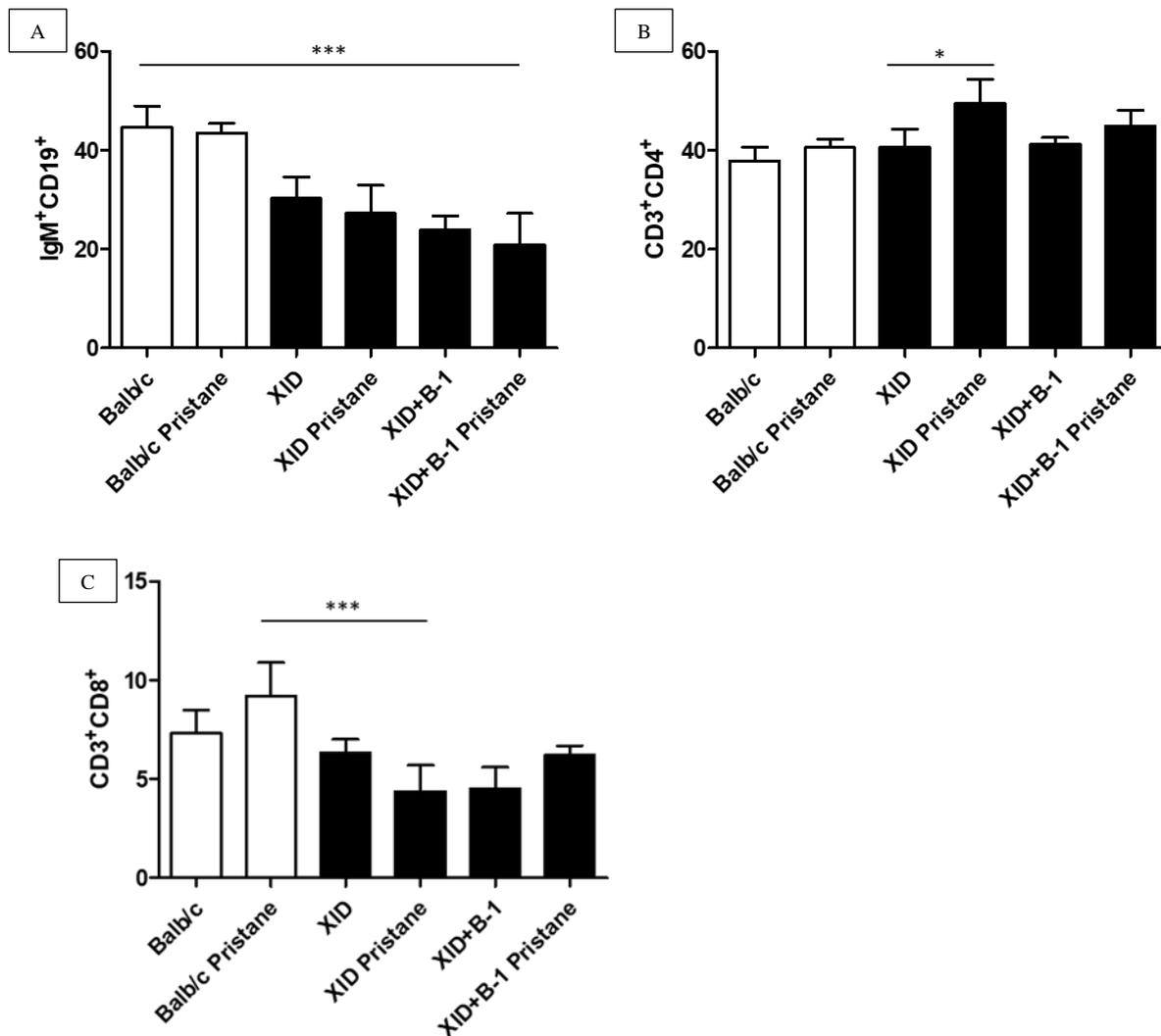
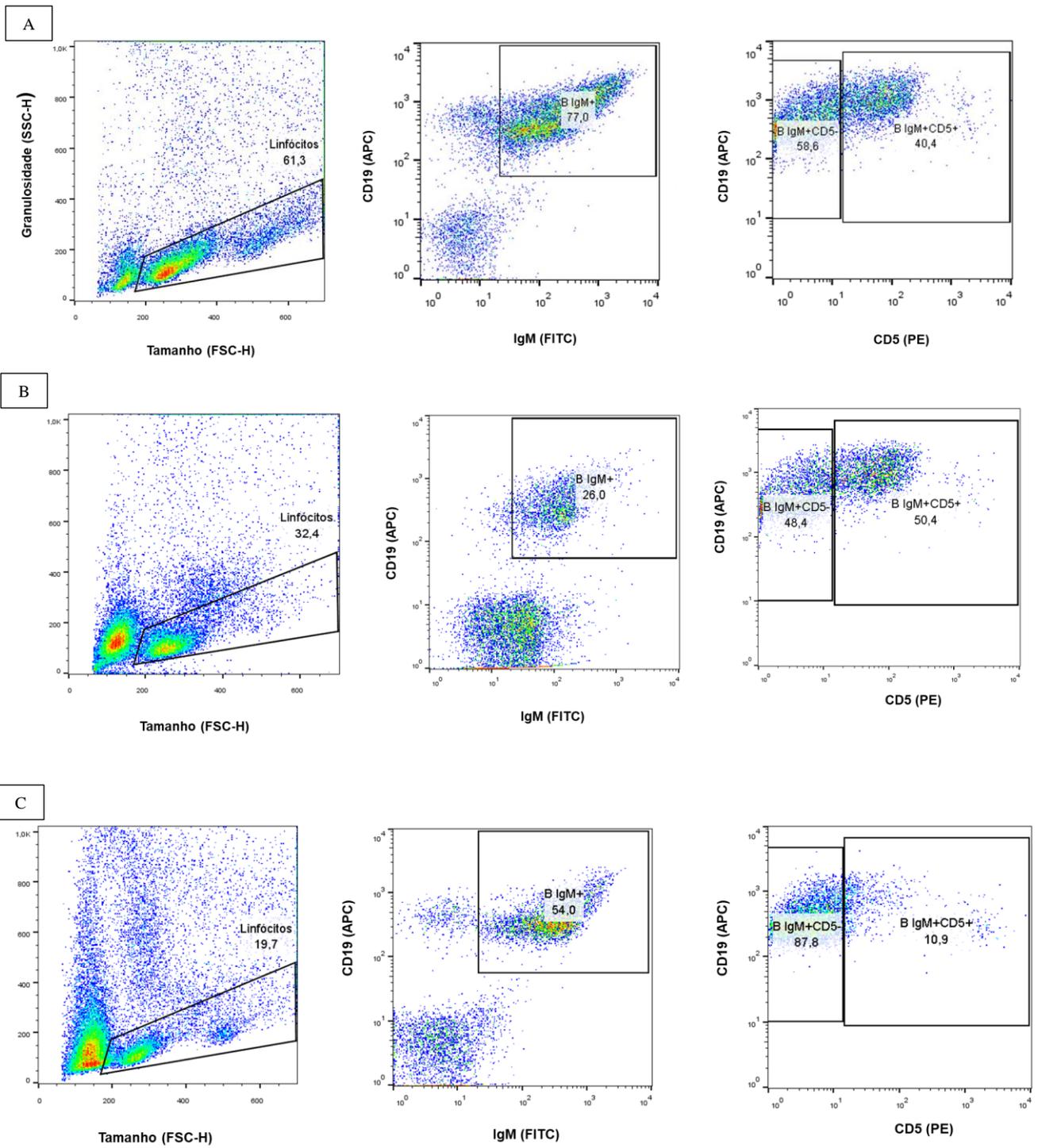


Figura 21. Porcentagem de linfócitos totais no baço. Citometria de fluxo de esplenócitos de camundongos BALB/c, XID e XID repopulados com B-1 controle e estimulados com pristane, mostrando a porcentagem de em (A) linfócitos B (CD19⁺ IgM⁺), (B) linfócito T CD4 (CD3⁺, CD4⁺) e (C) linfócito T CD8 (CD3⁺, CD8⁺) (***, $p < 0,001$; **, $p < 0,01$; *, $p < 0,05$).

5.4 Caracterização fenotípica das células do lavado peritoneal

Foi avaliado a dinâmica das células no peritônio em dos locais de prevalência dos linfócitos B-1. Ao analisar a dinâmica de linfócitos B totais no peritônio (Figura 22), todos os animais controles apresentaram uma diminuição significativa após o estímulo com pristane (***, $p < 0,001$) (Figura 23 A). Animais BALB/c e XID repopulados com B-1 tiveram um aumento no número de linfócitos B-1a no peritônio ao serem estimulados com pristane (Figura 23 B). Não houve diferença significativa no percentual de linfócitos B-1b no peritônio (Figura 23C).



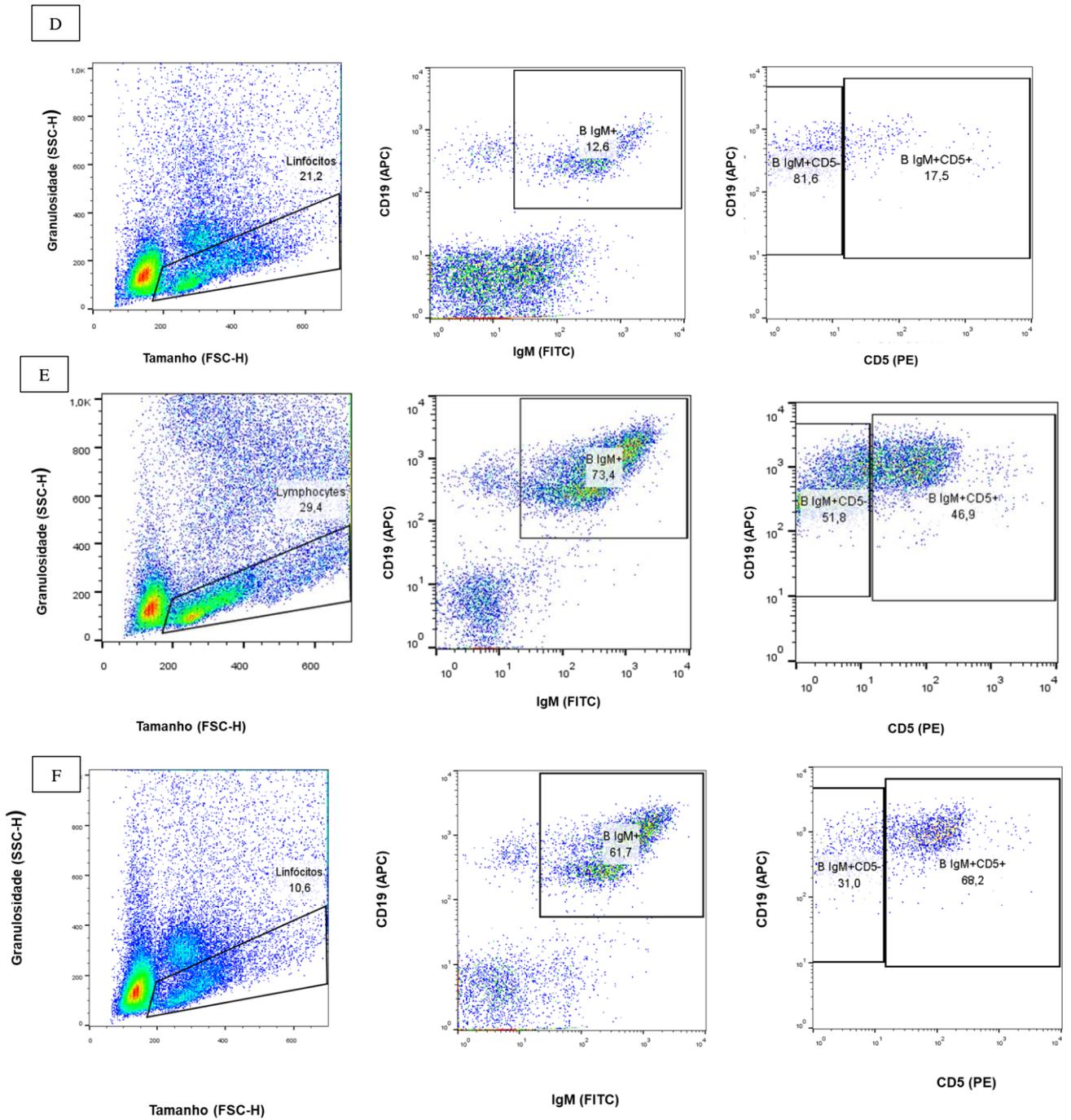


Figura 22 População de linfócitos B totais e B-1 no peritônio. Gates representativos da citometria de fluxo dos linfócitos: B totais do baço (CD19⁺ IgM⁺), B-1a (CD19⁺, IgM⁺, CD5⁺) e B1b (CD19⁺, IgM⁺, CD5⁻) dos camundongos em (A) BALB/c controle, (B) BALB/c pristane, (C) XID controle, (D) XID pristane, (E) XID repopulado com B-1 (F) XID repopulado com B-1 induzido com pristane.

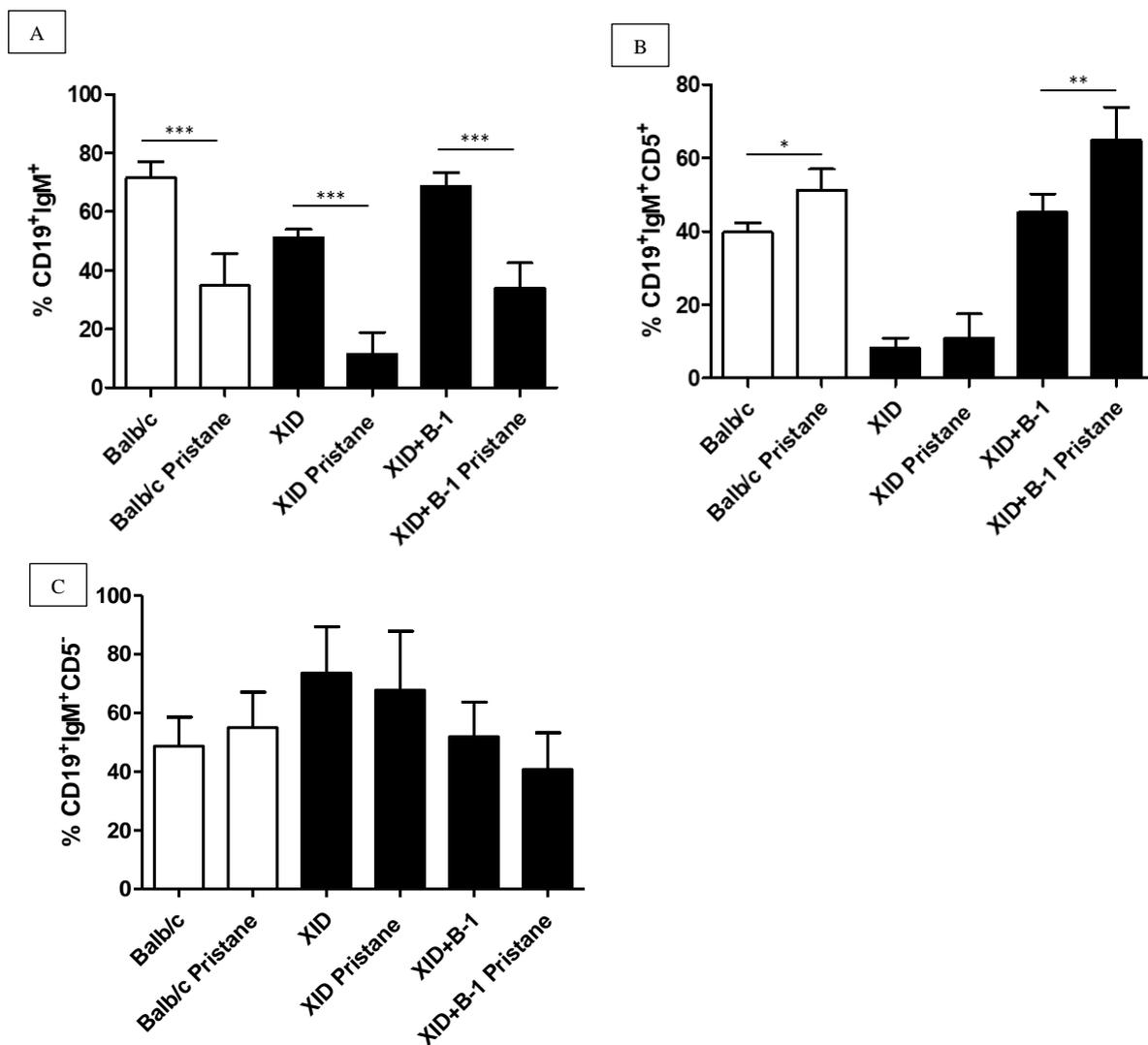


Figura 23 Porcentagem de linfócitos B no peritônio. Citometria de fluxo do lavado peritoneal de camundongos BALB/c, XID e XID repopulados com B-1 controle e estimulados com pristane, mostrando a porcentagem de em (A) linfócitos B (CD19⁺ IgM⁺), (B) linfócito B1a (CD19⁺, IgM⁺, CD5⁺) e (C) linfócito B1b (CD19⁺, IgM⁺, CD5⁻) (***, $p < 0,001$; **, $p < 0,01$; *, $p < 0,05$).

5.5 Produção de citocinas

O LES é marcado pela produção de citocinas inflamatórias como IL-6 e IFN-I e II desempenhando um papel importante na resposta autoimune (POLLARD et al., 2013; HE et al., 2016). Os linfócitos B-1 são fonte de IL-10, e essa citocina também se encontra aumentada no soro de pacientes com LES (GARRA et al., 1992). Com base nessa premissa, foi avaliado como estava a produção de mediadores inflamatórios como IL-6, IFN- γ e IL-10 no soro dos animais.

Animais que apresentam B-1 ao serem estimulados com pristane, houve um aumento na produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 ao comparar com os animais XID

(Figura 24A). O mesmo perfil foi observado ao avaliar a produção da citocina pró-inflamatória IL-6. Os animais BALB/c e XID repopulado com B-1 apresentaram uma maior produção de IL-6 ao comparar com os animais XID. Os animais BALB/c e XID repopulado com B-1 apresentaram um aumento na produção de IL-6 ao serem estimulados com pristane. Não houve diferença significativa entre os animais XID controle e XID pristane (Figura 24B).

Ao avaliar a produção de IFN- γ , observamos que camundongos BALB/c e XID repopulados com B-1 estimulados com pristane apresentaram níveis aumentados de IFN- γ . Os camundongos XID estimulados ou não com pristane não apresentaram alteração na produção de desta citocina, embora apresentem níveis naturalmente elevados quando comparados com BALB/c. Outro dado interessante foi o fato de camundongos XID repopulados com B-1 apresentarem níveis semelhantes ao BALB/c (Figura 24C)

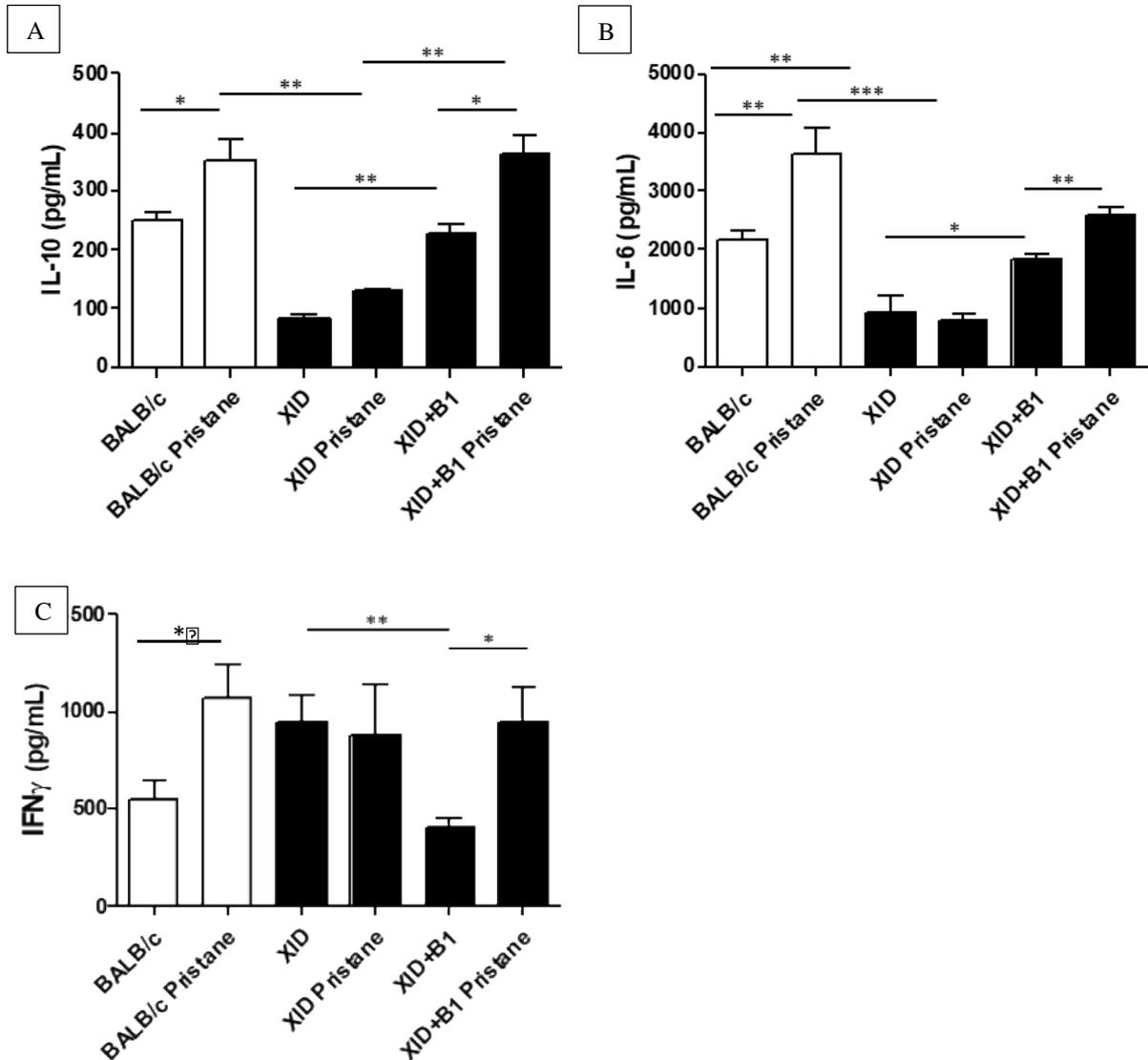


Figura 24 Produção de citocinas no soro dos animais após 6 meses de indução com pristane. Ensaio de ELISA do soro dos animais BALB/c, XID e XID repopulado com B-1 controle e estimulados com pristane, para

dosagem de citocinas em (A) IL-10, (B) e IL-6 e em (C) IFN- γ . O soro foi obtido através da punção cardíaca. A leitura foi feita com leitor de ELISA (VERSAmax Tunable microplate reader – T4.0A) em 450 nm (***, p < 0,001; **, p < 0,01; *, p < 0,05).

5.6 Histopatologia

5.6.1 Análise histológica da articulação da pata

No modelo induzido de LES por pristane é possível observar artrite a partir de 150 dias após a indução (FREITAS; DE OLIVEIRA; MONTICIELO, 2017). Foi observado anteriormente que apenas os animais BALB/c pristane apresentaram edema, eritema e aumento no tamanho (mm) das patas (Figura 10 e 11). Buscou-se observar as alterações microscópicas após 6 meses de indução através da coloração de H.E e PAS. As articulações do tornozelo dos camundongos BALB/c controle não apresentou alterações (Figuras 25 A, B, C e D). Desse modo, os animais apresentaram a cavidade sinovial livre de exsudato inflamatório ou debris celulares e a superfície óssea é retilínea. Por outro lado, os animais BALB/c pristane exibiram lesões, no qual pode se caracterizar através da presença de: proliferação dos sinoviocitos, inflamação na sinóvia (Figuras 25 E, F e G), presença de exsudato e debris celulares na cavidade sinovial (Figura 25 F), e formação de pannus (Figuras 25 E, F, G e H). Foi observado a presença de erosão óssea (concauidade formada na superfície óssea) nos locais onde houve a formação do pannus (Figuras 25 E, F, G e H).

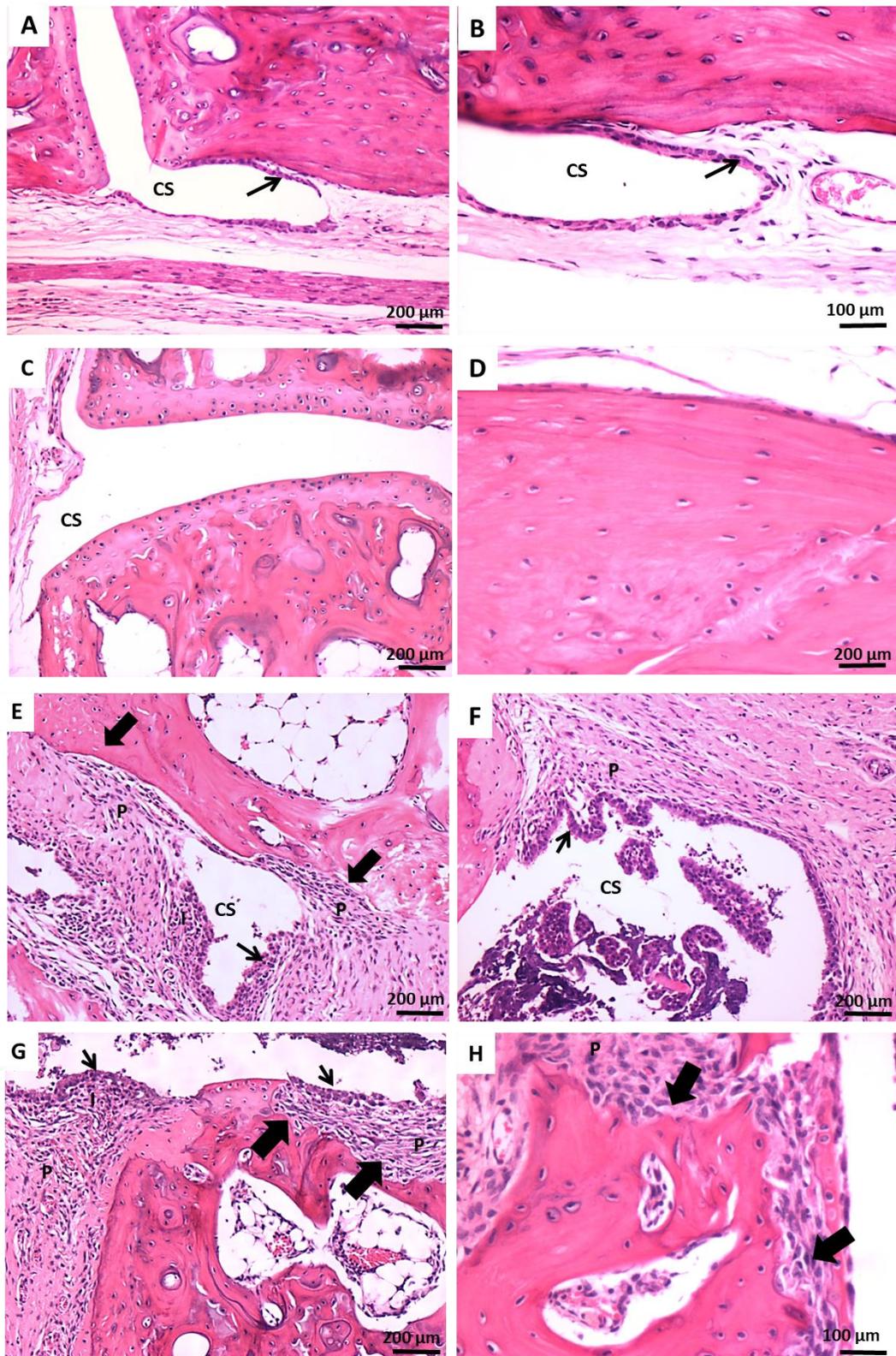


Figura 25 Análise histológica das articulações dos animais BALB/c controle e estimulado com pristane. Os animais BALB/c controle não apresentaram alterações nas articulações. Sendo assim, a cavidade sinovial livre de exsudato inflamatório ou debris celulares e ausência de hiperplasia na membrana sinovial (seta) (A, B e C) e a superfície óssea retilínea (D). Enquanto que, os animais BALB/c pristane observou-se a presença de proliferação dos sinoviócitos, inflamação na sinóvia (seta fina) (E, F e G), presença de exsudato e debris celulares na cavidade sinovial (seta fina) (B), formação de pannus (letra P) (E, F, G e H) e erosão óssea (seta grossa) (H). CS: cavidade sinovial

A presença de linfócitos B-1 parece ter influenciado na artrite. Já que os animais XID pristane apresentaram poucas modificações em suas articulações do tornozelo. Notou-se, a ausência de alterações nos animais XID controle (Figuras 26 A, B, C e D). Enquanto que, nos animais BALB/c pristane notou-se à presença de edema intersticial no tecido subcutâneo (Figura 26 E), sinoviócitos se apresentavam com morfologia escamosa, com raras zonas de proliferação (Figuras 26 F e G), inflamação sinovial mínima (Figura 26 G) e raras zonas de erosão óssea (Figura 26 H).

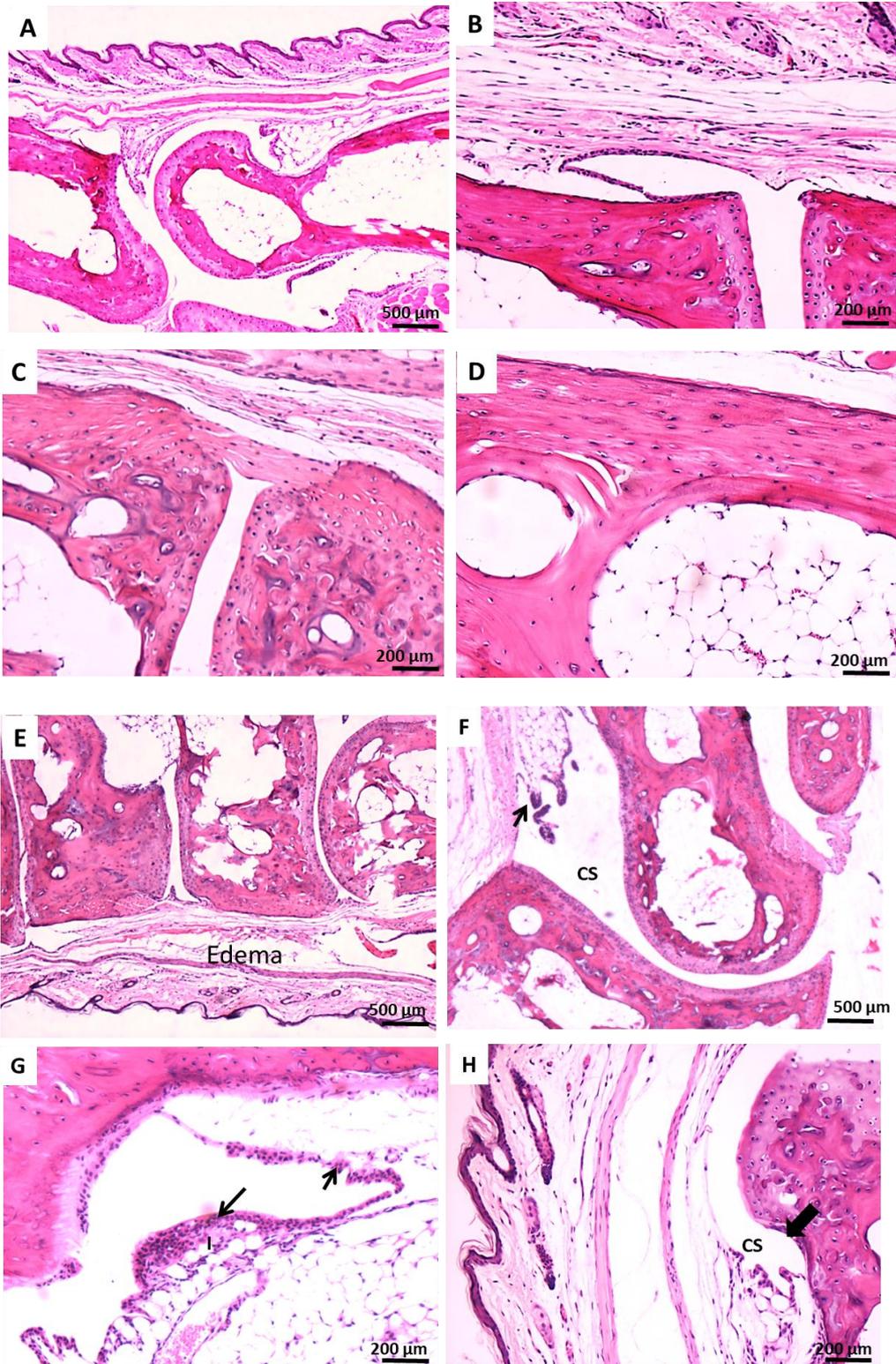


Figura 26 Análise histológica das articulações dos animais XID controle e estimulado com pristane. Ausência de lesões nas articulações dos animais XID controle (A, B, C, D). Os animais XID estimulados com pristane apresentaram a presença de edema intersticial no tecido subcutâneo (E), sinoviocitos com morfologia escamosa, com raras zonas de proliferação (seta fina) (F e G), inflamação sinovial mínima (G) e raras zonas de erosão óssea (seta grossa) (H).

5.6.2 Lesão renal e depósito de complexos imunes

A nefrite lúpica ou glomerulonefrite que ocorre no LES é uma inflamação que acomete a parte funcional dos rins que são os glomérulos. As alterações histológicas que podem ser observadas em pacientes com glomerulonefrite lúpica são: hiperplasia glomerular devido a presença de células inflamatórias no interior das alças capilares, proliferação do endotélio glomerular ou de células mesangiais, alargamento mesangial, presença de células intrínsecas glomerulares (endotélio capilar, podócitos ou células mesangiais) ou extrínsecas (células inflamatórias recrutadas) apoptóticas. Nos casos crônicos pode haver esclerose glomerular, lesão tubular e fibrose intersticial (Koffler et al., 1971). A glomerulonefrite é induzida em cerca de um terço de camundongos BALB/c após a administração de pristane, e é mediada pela interação entre os complexos imunes contendo IgG e células mielóides efectoras, monócitos/macrófagos. Estes animais cursam com proteinúria, que se inicia 4-6 meses após a injeção de pristane (Sato et al., 1995; Chowdhary et al., 2007; Kofler et al., 1971).

Através das colorações HE e PAS, pode-se observar que os animais BALB/c e XID controle não apresentaram modificações aparentes nos glomérulos (Figura 27 e 28). Dessa forma, os glomérulos subcapsulares e de transição cortico-medular apresentaram alças capilares finas, eixo mesangial discreto e ausência de células inflamatórias no interior do glomérulo.

Diferentemente, os animais BALB/c pristane apresentaram lesões renais significativas comparadas aos animais BALB/c controle (Figuras 27,28 e 29). As lesões glomerulares foram caracterizadas através de um escore semi-quantitativo modificado (KIMURA et al., 2011). Foi observado que os animais BALB/c pristane apresentaram alças capilares espessas, presença de células inflamatórias e alargamento significativo do eixo mesangial comparado aos animais BALB/c controle - seta (Figura 27 e 28). Enquanto, que os glomérulos dos animais XID pristane evidenciaram um aumento do eixo mesangial ($p > 0,05$) embora não significativo, quando comparados aos animais XID controle (Figura 28). Houve também um espessamento significativo da alça capilar glomerular dos animais XID pristane (* $p < 0,05$) – seta (Figura 29).

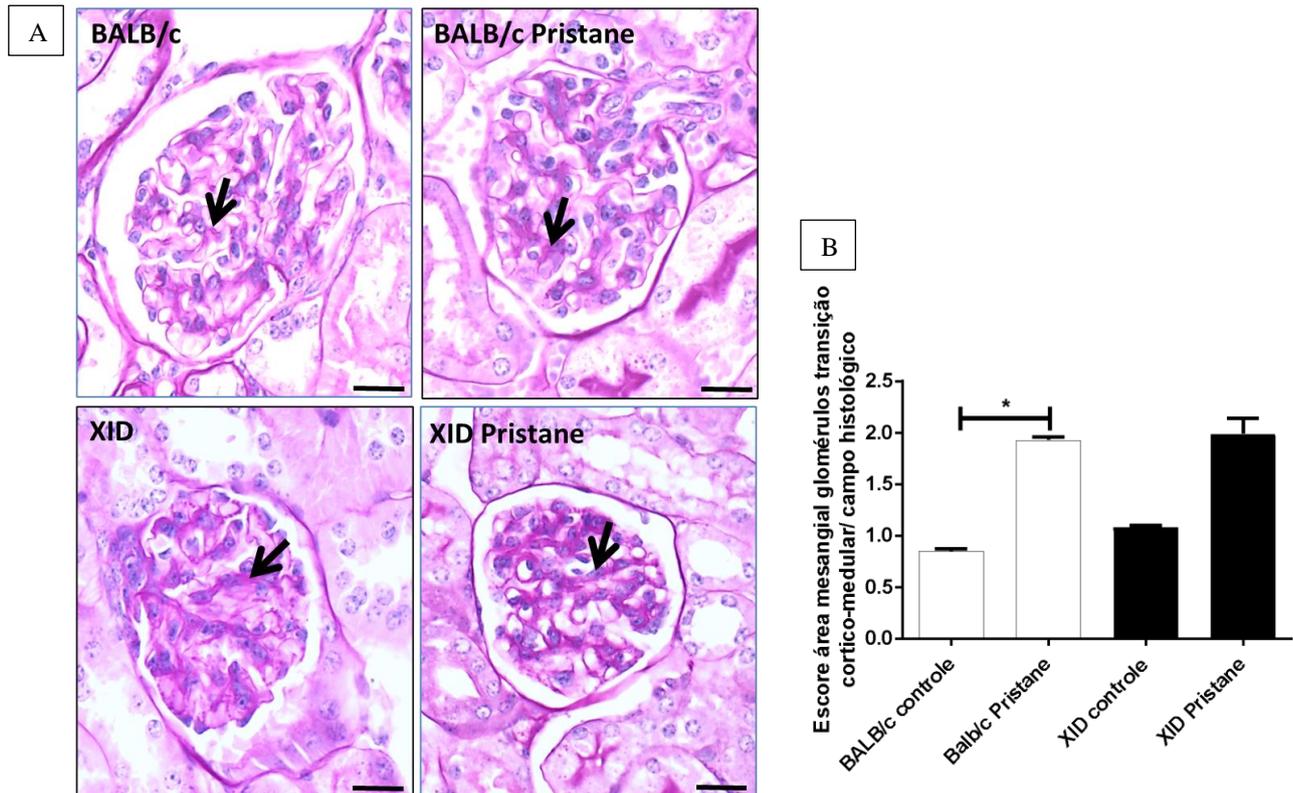


Figura 27 Glomérulos da transição córtico medular dos animais BALB/c e XID controle e induzidos com pristane. Em (A) Imagens representativas de glomérulos da transição córtico-medular em animais BALB/c e XID com ou sem indução com pristane. Eixo mesangial (seta). (B) Representação gráfica do escore histológico para área mesangial. Resultados expressos representam a média \pm SEM (* $p < 0,05$) Coloração: PAS Barra de calibração: 50 μ m

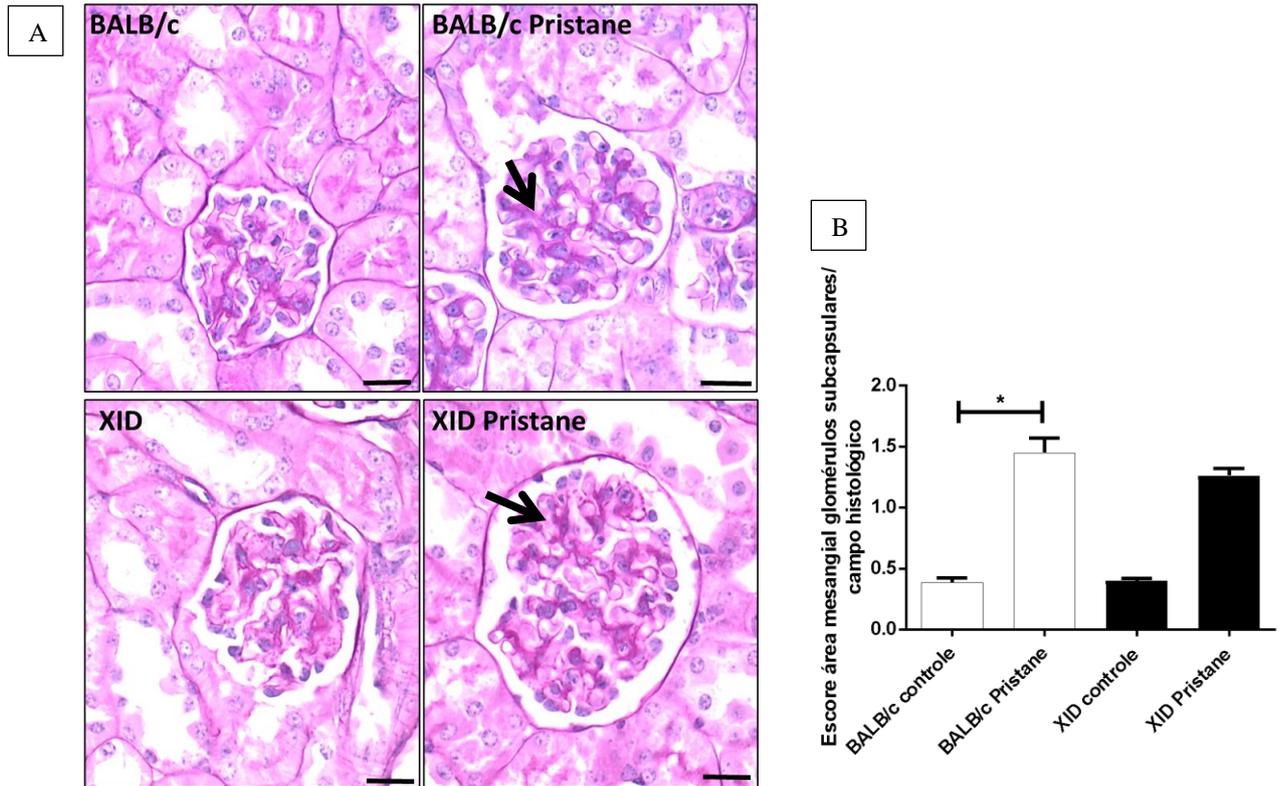


Figura 28 Glomérulos subcapsulares dos animais BALB/c e XID controle e induzidos com pristane. Em (A) Imagens representativas de glomérulos da transição subcapsular em animais BALB/c e XID com ou sem indução com pristane. Eixo mesangial (seta). (B) Representação gráfica do escore histológico para área mesangial. Resultados expressos representam a média \pm SEM (* $p < 0,05$) Coloração: PAS Barra de calibração: 50 μ m

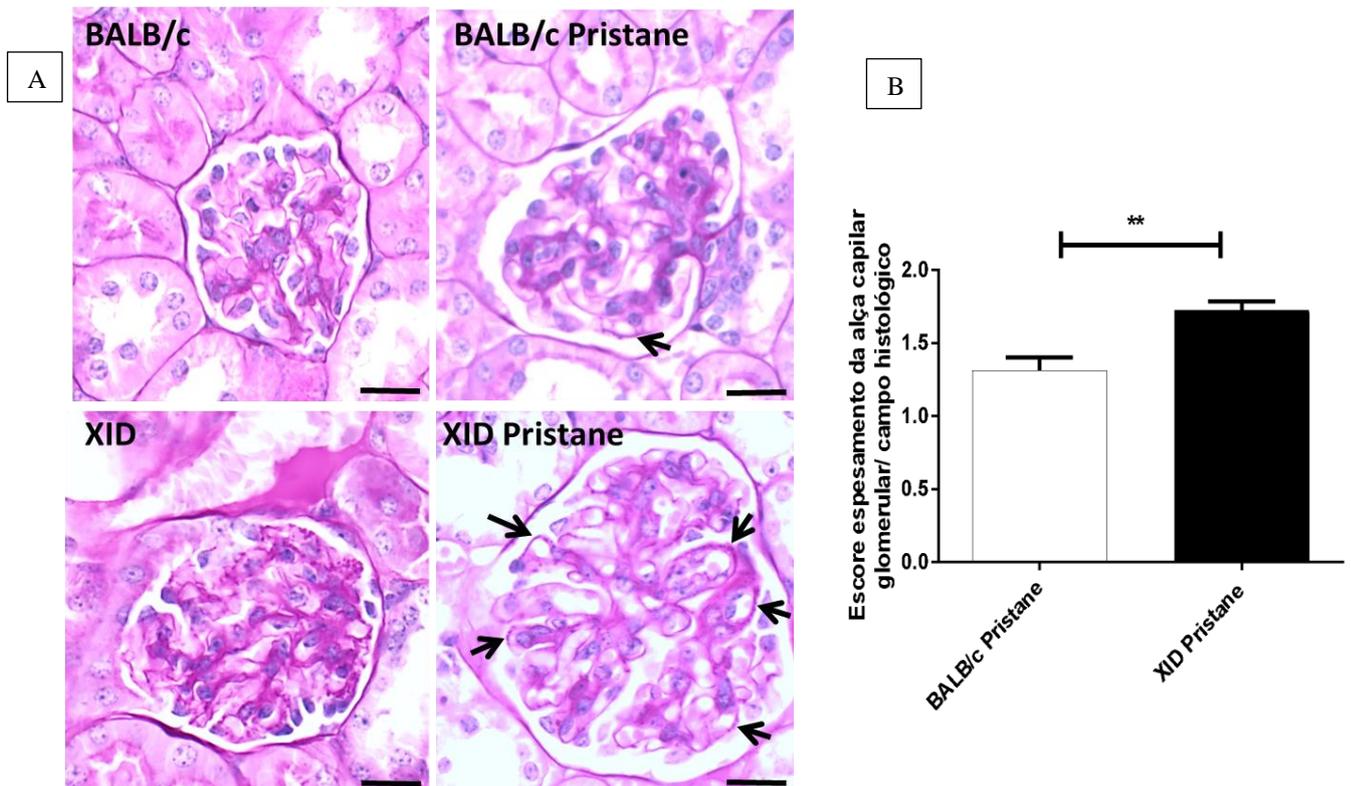


Figura 29 Espessamento da alça capilar glomerular dos animais BALB/c e XID controle e induzidos com pristane. Em (A) Imagens representativas espessamento da alça capilar glomerular dos animais BALB/c e XID com ou sem indução com pristane (seta). (B) Representação gráfica do escore histológico do espessamento da alça capilar. Resultados expressos representam a média \pm SEM (* $p < 0,05$) Coloração: PAS Barra de calibração: 50 μ m

Na coloração pelo tricrômico de Masson modificado (TMM) foi possível visualizar a presença de depósitos de complexos imunes (Figura 30 B). Sendo que animais BALB/c pristane apresentaram depósitos intramembranares (dentro da alça capilar glomerular) e depósitos subepiteliais (embaixo dos podócitos). Em menor quantidade, os animais XID pristane exibiu alça capilar contendo depósitos globulares (Figura 30).

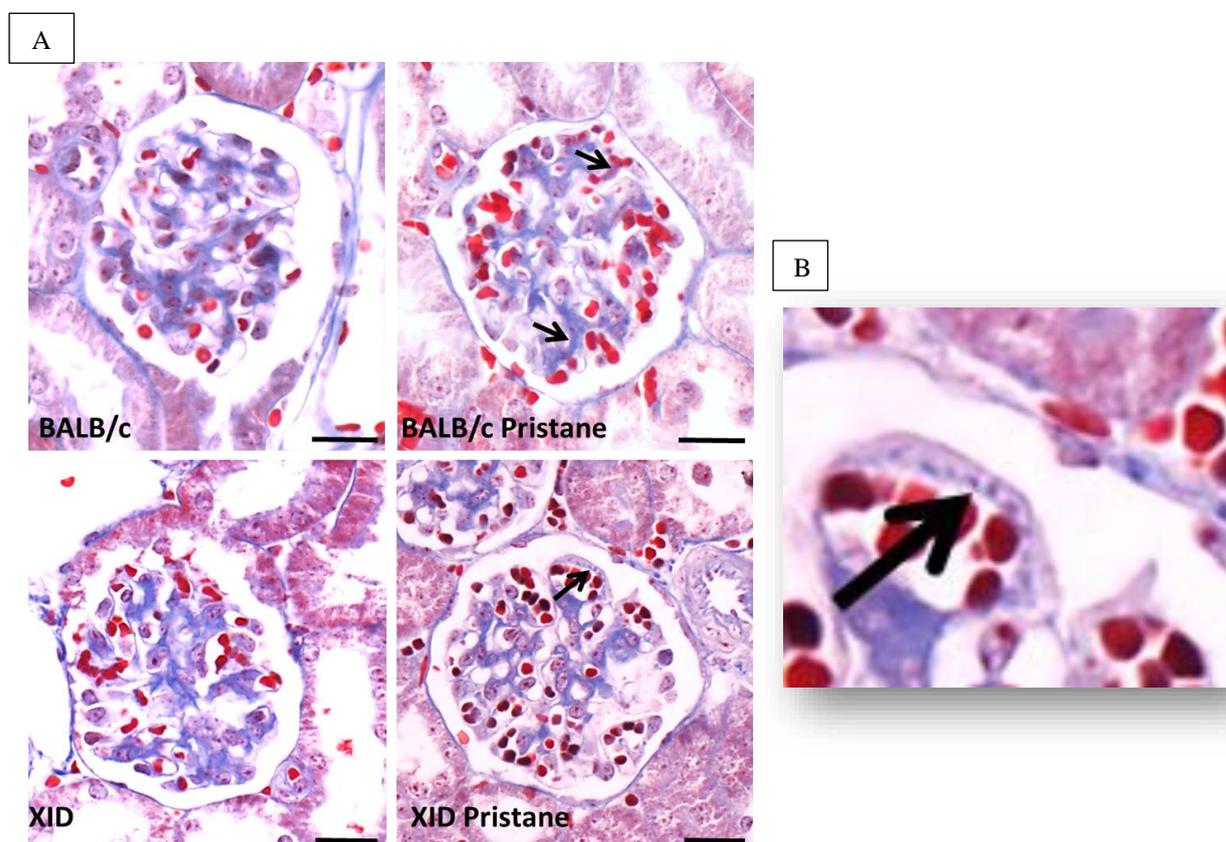


Figura 30 Fotomicrografias representativas dos glomérulos dos animais BALB/c e XID controle e induzidos com pristane. Em (A) Os animais BALB/c pristane apresentaram as alças capilares espessas com zona avermelhada interposta (seta) representando deposição de complexo imune na alça capilar. Enquanto os animais XID pristane exibiu alça capilar contendo depósitos globulares (seta). Em (B) Zoom representativo demonstrando a deposição de complexos imunes (Seta) Coloração: TMM Barra de calibração: 50 μ m

6 DISCUSSÃO

O lúpus eritematoso sistêmico é uma doença autoimune crônica caracterizada pela produção de autoanticorpos e envolvimento de múltiplos órgãos. Embora a patogênese não esteja completamente compreendida, ela está associada a fatores genéticos, ambientais e hormonais. Dentre as células do sistema imunológico que participam da patogênese do LES estão os linfócitos B. Os linfócitos B participam de forma ativa na patogênese da doença, pois são capazes de secretar os autoanticorpos, secretar citocinas, apresentar antígenos e participar da ativação dos linfócitos T (MA et al., 2019).

Diferentes populações de linfócitos B, como os linfócitos B-1 também foram associados às doenças autoimunes. Foi relatado que a eliminação de linfócitos B-1 através da administração contínua de anti-IL-10 ou por meio hipotônico em camundongos predispostos a terem LES como NZB/NZW F1, causou uma diminuição da atividade da doença (ISHIDA et al., 1994). Além disso, camundongos deficientes em B-1 CBA/N (XID) ao serem estimulados com pristane foram refratários na produção de autoanticorpos (SATO et al., 2003). Esses dados podem indicar uma participação dos linfócitos B-1 na patogênese da doença, embora o papel sobre os linfócitos B-1 no LES ainda não esteja claro.

Modelos murinos induzidos com pristane são importantes para estudo do LES. Uma única injeção de pristane intraperitoneal em camundongos saudáveis levam a uma doença similar ao LES, com produção de autoanticorpos, presença de lipogranulomas, acúmulo de líquido no abdômen rico em autoanticorpos (ascite), capilarite pulmonar, glomerulonefrite com deposição de C.I e artrite (FREITAS; DE OLIVEIRA; MONTICIELO, 2017).

Após 6 meses de indução com pristane, foi possível observar algumas manifestações nos animais. Apenas os animais BALB/c pristane apresentaram edema e aumento no tamanho das articulações sendo 30% da população afetada. Ademais, 20% desses animais apresentaram ganho de peso e presença de ascite. Outra manifestação observada foi a presença de lipogranulomas. Essas manifestações são bem documentadas em modelos murinos após a injeção de pristane (PANNU; BHATNAGAR, 2020; SATO; REEVES, 1994).

Os lipogranulomas são tecidos linfóides ectópicos com propriedades funcionais e morfológicas de tecidos linfóides secundários, acrescidos de infiltrado inflamatório com a presença de células B, células T e zonas de células dendríticas (FREITAS; DE OLIVEIRA;

MONTICIELO, 2017; NACIONALES et al., 2006). No presente estudo, após 6 meses de indução com pristane observamos a presença de lipogranulomas na região peritoneal, diafragma e fígado dos animais BALB/c pristane, XID repopulado com B-1, e em menor quantidade nos animais XID pristane. Pannu e colaboradores, 2019 também relataram a presença de lipogranulomas nos animais BALB/c após 6 meses de indução com pristane. E, observaram através da análise histopatológica a presença de células inflamatórias ao redor das gotículas de óleo (pristane). Até o momento, esses dados indicam que a presença de linfócitos B-1 interferiu nas manifestações, já que em animais deficientes de B-1 houve um retardo significativo no aparecimento de tais manifestações e mesmo quando apareceram foram em quantidades inferiores.

O baço participa da patogênese do LES, uma vez que ao realizar a esplenectomia em camundongos com LES diminuiu a produção autoanticorpos, e de doenças renais e hepáticas (YUNG et al., 1997). O baço participa da resposta imunológica a antígenos presentes na circulação sanguínea, sendo importante para homeostase imunológica e para a produção de anticorpos séricos (TISCHENDORF, 1985; MEBIUS & KRAAL, 2005; DREW et al., 1984). Animais BALB/c e XID repopulados com B-1 estimulados com pristane apresentaram aumento no tamanho e peso do baço. A esplenomegalia é observada em humanos e modelos murinos com LES (LI; TITOV; MOREL, 2017). Previamente já foi observado que o baço de camundongos induzidos com pristane mostrou proliferação de linfócitos reativos foliculares e difusos com centro germinativo reativo nos folículos e hiperplasia do centro germinativo (LEISS et al., 2014; PANNU; BHATNAGAR, 2020).

Com base nessas informações, por meio da citometria de fluxo avaliamos a dinâmica populacional de linfócitos no baço. Animais BALB/c apresentaram maior número de linfócitos B quando comparado aos animais XID. Em um trabalho onde foi realizado a esplenectomia em camundongos saudáveis, relatou que as células B-1a dependem da presença do baço, no qual os antígenos esplênicos parecem atuar como fatores de sobrevivência para os linfócitos B-1a, uma vez que após a retirada do baço leva a diminuição de linfócitos B-1a, embora não diminuía linfócitos B-1b (KRETSCHMER et al., 2015) Em algumas situações, os linfócitos B-1 expressam níveis extremamente altos de integrinas e através de sinais diretos por meio de TLRs induzem uma saída massiva de células B-1 da cavidade peritoneal. Os linfócitos B-1 são capazes de migrar do peritônio para o baço (HA et al., 2006a; MARTIN; OLIVER; KEARNEY, 2001).

Logo, suspeita-se que esse aumento de linfócitos B esteja associado a migração de B-1 para o baço. Ademais, animais BALB/c pristane apresentaram aumento em linfócitos T CD8 no baço quando comparado aos XID. Diferente dos nossos achados, camundongos BALB/c pristane não apresentaram diferença em linfócitos T CD8 ao comparar com os animais BALB/c controle (PEIXOTO et al., 2019). Apesar dos linfócitos T CD8 estarem aumentados no LES apresentam defeito em sua função. Alguns autores citam um aumento de linfócitos T CD8 contribuindo para a patologia do lúpus através da geração de autoantígenos (BLANCO; PITARD; TAUPIN, 2005; SHAH et al., 2011). No LES, os linfócitos T CD4 ativados se apresentam aumentados em humanos e podem se diferenciar em perfis pró-inflamatórios como Th1 e Th17 auxiliando na patogênese da doença (CRISPIN et al., 1998; McDONALDS; DEGRASSI, 1993). Surpreendentemente, em nosso modelo, apenas os animais XID apresentaram aumento em linfócitos T CD4 no baço após estímulo com pristane.

Ao analisar a dinâmica celular no sítio dos linfócitos B-1 após a administração de pristane, houve uma diminuição de linfócitos B totais no peritônio dos animais BALB/c pristane e XID repopulado com B-1, o que corrobora com a ideia de migração para o baço. Também foi observado um aumento de linfócitos B-1a no peritônio desses animais. O aumento de B-1a no peritônio na artrite autoimune foi relatada no início da doença com diminuição dessas células com o passar do tempo devido a migração para o local inflamado (DENG et al., 2016). A migração de linfócitos B-1a para órgãos alvo também foi relatada em modelos murinos com LES. O tráfego aberrante de células B-1 contribuiu para a ativação de células T CD4 autorreativas e produção de autoanticorpos nos órgãos-alvo (ISHIKAWA; MATSUSHIMA, 2007). Outros autores comentam da migração de linfócitos B-1 para o baço, timo e rins contribuindo na produção de anticorpos anti-dsDNA IgG em camundongos NZB/W F1 (ENGHARD et al., 2010).

No LES há alterações na população de células do sistema imunitário no sangue periférico devido ao aumento de destruição de células sanguíneas associada a presença de autoanticorpos circulantes (VELO-GARCÍA; GUERREIRO; ISENBERG, 2016). Por meio da contagem diferencial de leucócitos através da técnica de esfregaço sanguíneo, observamos que os animais BALB/c e XID repopulados com B-1 tiveram um maior número de linfócitos no sangue quando comparados aos XID. O menor número de leucócitos em camundongos XID poderia provir do número reduzido de células B. Esses valores indicam o número total de linfócitos no sangue periférico, já que não há distinção morfológica entre os linfócitos obtidos pela técnica de esfregaço sanguíneo (BAIN, 2005).

Pacientes com LES apresentam neutropenia, sendo um fator de risco para o aumento de infecções (MARGARIDA et al., 2009; VELO-GARCÍA; GUERREIRO; ISENBERG, 2016). Diferentemente, os animais XID apresentaram maior número de neutrófilos quando comparado aos outros grupos. Esse perfil neutrofílico dos XID também foi observado por Fiedler et al., 2016, e apesar do aumento estão prejudicados na maturação e função. O maior recrutamento de neutrófilos no sangue em animais XID, pode ser devido a um modo compensatório da ausência de B-1.

Os monócitos são liberados ativamente na medula óssea e são recrutados para tecidos inflamados no LES (LEE et al., 2009) Houve aumento no número de monócitos em todos os grupos estimulados com pristane. Similarmente, em outros estudos houve o aumento de monócitos após indução com pristane seguido de produção de IFN I (BOSSALLER et al., 2015; LEE et al., 2009).

A produção de autoanticorpos e muitas das manifestações clínicas são induzidas pela presença de citocinas no LES. Inúmeros trabalhos citam o aumento de níveis séricos das citocinas IL-10 em humanos e modelos murinos com LES (LEE et al., 2019; PENG et al., 2013; UZRAIL; ASSAF; ABDALLA, 2019). O aumento de IL-10 no LES apresenta um papel patogênico, pois é capaz de desregular a função de linfócitos B e T , aumentar a proliferação e diferenciação dos linfócitos B em células secretoras de autoanticorpos e aumentar a apoptose (GEORGESCU et al., 1997; MOORE et al., 2001). Ao injetar IL-10 em camundongos transgênicos, houve um aumento no número de linfócitos B-1 que se diferenciaram em células produtoras de autoanticorpos *in vivo* (NISITANI et al., 1995). Nós observamos um aumento significativo de IL-10 no soro dos animais BALB/c e XID repopulado com B-1 induzidos com pristane. Além disso, os linfócitos B-1a são fonte de IL-10 e podem ser os responsáveis por esse aumento no soro dos animais (GARRA et al., 1992).

Os camundongos BALB/c e XID repopulados com B-1 apresentaram aumento da citocina pró-inflamatória IFN- γ após indução com pristane. O IFN- γ está relacionado com a produção de autoanticorpos, glomerulonefrite e artrite (JACOB et al, 1987; RICHARDS et al., 2001; OKE et al., 2019). Em animais BALB/c induzidos com pristane com deficiência em IFN- γ (-/-), a deficiência de IFN- γ ocasionou a redução de imunoglobulinas séricas, diminuição na produção de autoanticorpos e diminuição no depósito de CI nos rins e proteinúria comparado com os camundongos selvagens (RICHARDS et al., 2001). O IFN-I é importante em modelos murinos induzidos, no qual apresentam uma assinatura significativa

desse IFN (FREITAS; DE OLIVEIRA; MONTICIELO, 2017). Entretanto, em camundongos com deficiência de receptor de IFN-I (Ifnar), essa deficiência não modificou o depósito de CI nos rins, e permaneceu ANA positivo embora apresentasse em menor quantidade (NACIONALES et al., 2007) demonstrando que os outros tipos de IFN são importantes para a patogênese da doença. Em nosso modelo, o aumento significativo de IFN- γ em camundongos com linfócitos B-1 poderia estar contribuindo com a patogênese da doença.

A IL-6 também é uma citocina inflamatória que participa da patogênese do LES, sendo capaz de induzir a diferenciação de linfócitos B em plasmócitos e de participar da ativação de linfócitos T (JAIN et al., 2016). Níveis elevados de IL-6 no soro de pacientes com LES, está associado a produção de autoanticorpos, presença de lipogranulomas, desenvolvimento da glomerulonefrite e progressão rápida da doença levando a mortalidade em modelos de camundongos (RICHARDS et al., 1998; RYFFEL et al., 1994; SATOH; REEVES, 1994; REEVES et al., 2009). Em nosso trabalho, apenas os animais que apresentam B-1 (BALB/c e XID repopulado com B-1) ao serem estimulados com pristane tiveram aumento na produção de IL-6 quando comparado aos grupos controles. Outros autores, também observaram aumento de IL-6 após a administração de pristane nos animais BALB/c (PANNU; BHATNAGAR, 2020), e baixos níveis de IL-6 em animais CBA/N XID estimulados com pristane (SATOH et al., 2003). Nossos resultados revelaram que a tríade de citocinas IL-6, IFN- γ e IL-10 estavam elevados apenas nos animais estimulados com pristane que possiam células B-1 naturalmente ou repopulados. Desse modo nossos dados corroboram a literatura e sugerem que o agravamento do LES desses animais pode estar intimamente relacionado a presença de células B-1.

A presença de linfócitos B-1, interferiu na produção de níveis elevados de citocinas como IL-6, IFN- γ e IL-10. Essas citocinas são importantes na patogênese do LES, pois seu aumento está relacionado com as manifestações clínicas e com atividade da doença (CHUN et al., 2007).

Com o intuito de avaliar se a presença de linfócitos B-1 interferiu na atividade do LES foi realizada a análise histológica dos rins e das articulações do tornozelo dos animais. Leiss et al., 2014 observou que em camundongos BALB/c induzidos com pristane houve um envolvimento grave das articulações após 8 meses de indução apresentando uma artrite erosiva. Sendo assim, o modelo induzido por pristane uma importante ferramenta para o estudo da artrite.

As patas traseiras são as mais utilizadas para análise de artrite em animais, permitindo uma combinação de parâmetros clínicos e histopatológicos da doença (HAYER et al., 2021). Como observado anteriormente, Animais BALB/c estimulados com pristane apresentaram aumento do tamanho e edema nas articulações, no qual foi possível observar apenas em animais BALB/c pristane lesões mais graves, com diversas alterações nas articulações como: proliferação dos sinoviócitos, inflamação na sinóvia, presença de exsudato e debris celulares na cavidade sinovial e formação de pannus com a presença de erosão óssea. A presença de inflamação das articulações, danos à cartilagem e erosão óssea são lesões características da artrite (HAYER et al., 2021). Animais XID estimulado com pristane apresentaram alterações brandas quando comparado aos animais BALB/c pristane.

No modelo de LES induzido por pristane há a indução de uma série de autoanticorpos específicos ou associados com o LES (Sato; Reeves, 1994; Sato et al., 1999; Elkon et al., 1992; Hamilton et al., 1998). Em camundongos BALB/c, uma única injeção intraperitoneal de pristane (0.5 mL) estimula a produção de autoanticorpos contra RNA (Christensen et al., 2006) e uma glomerulonefrite com deposição de CI. A glomerulonefrite é induzida em cerca de um terço de camundongos BALB/c após a administração de pristane, e é mediada pela interação entre o CI contendo IgG e células mielóides efectoras, monócitos/macrófagos. Estes animais cursam com proteinúria, que se inicia 4-6 meses após a injeção de pristane (Sato et al., 1995; Chowdhary et al., 2007; Kofler et al., 1971).

A glomérulo nefrite crônica inicia com danos nos glomérulos. Os danos em glomérulos e nos túbulos intersticiais diminui o número de néfrons funcionais causando danos na anatomia e fisiologia dos rins desencadeando uma disfunção renal (KIMURA et al., 2011). Animais BALB/c pristane apresentaram alças capilares espessas, alargamento do eixo mesangial e presença de células inflamatórias indicando uma glomerulopatia. Embora as alterações histológicas sejam semelhantes às encontradas na glomerulonefrite, para confirmar o quadro de glomerulonefrite torna-se necessário a presença de achados clínicos e laboratoriais como presença de autoanticorpos, presença de proteinúria entre outros (ANDERS et al., 2020).

Com intuito de avaliar os danos renais nos animais, as lesões glomerulares foram caracterizadas através de um escore semi-quantitativo modificado (KIMURA et al., 2011). Animais BALB/c pristane apresentaram lesões renais graves significativas (>1+) quando comparado aos animais XID pristane. Como a glomerulopatia poderia estar associada a

deposito de CI, avaliou-se a deposição de CI de forma indireta nos glomérulos através da coloração TMM. Animais BALB/c pristane apresentaram em maior quantidade a presença de CI intramembranares e subepiteliais. Enquanto, animais XID apresentou complexos em menor quantidade, associado a um espessamento na alça capilar que poderia estar associada a deposição de CI. A lesão renal significativa observada nos animais BALB/c pristane pode ter sido mediada pela presença CI e consequente resposta inflamatória.

Este trabalho abre novas vertentes para o entendimento do papel dos linfócitos B-1 no LES. A presença de linfócitos B-1 sugere uma influência na dinâmica celular do baço e peritônio, na produção de citocinas e na atividade da doença sendo importante sua participação na patogênese do LES. Dessa forma, o entendimento do papel dos linfócitos B-1 na imunopatogênese do LES pode abrir frentes de estudos sobre estratégias de imunoterapias que possibilitariam um controle mais seguro dessa doença complexa e multifatorial.

7 CONCLUSÕES

Os linfócitos B apresentam um papel fundamental na patogênese do LES, através da produção de autoanticorpos, produção de citocinas e apresentação de antígenos. Embora o papel sobre os linfócitos B-1 no LES ainda não esteja claro, em nosso modelo ao induzir com pristane os animais BALB/c, XID e XID repopulado com B-1, mostrou que, na presença de linfócitos B-1, há o desenvolvimento de manifestações clínicas características da doença, com deposito de CI nos rins e produção de citocinas importantes para a atividade da doença como IL-6, IFN- γ e IL-10. Animais XID apresentaram apenas algumas manifestações, sendo de modo significativamente mais brando e tardio. Além disso, a presença de linfócitos B-1 interferiu na dinâmica populacional de células do baço, peritônio e sangue periférico. Esses dados revelam que há uma certa proteção no desenvolvimento da doença na presença de linfócitos B-1. Com base nesses resultados, podemos concluir que os linfócitos B-1 apresentam um papel modulador na resposta imunitária contribuindo para a patogênese do LES.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGGARWAL, R. et al. This article is protected by copyright. All rights reserved. p. 1–14, 2015.
- ALBERTO, C. et al. eritematoso sistêmico em cidade do Sul do Brasil. v. 51, n. 3, p. 235–239, 2011.
- ANDERS, H. J. et al. Lupus nephritis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 6, n. 1, 2020.
- ARBUCKLE, M. R. et al. Development of Autoantibodies before the Clinical Onset of Systemic Lupus Erythematosus. **New England Journal of Medicine**, v. 349, n. 16, p. 1526–1533, 2003.
- ARINGER, M. et al. 2019 European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology classification criteria for systemic lupus erythematosus. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 78, n. 9, p. 1151–1159, 1 set. 2019.
- ARINGER, M. EULAR/ACR classification criteria for SLE. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 49, n. 3, p. S14–S17, 1 dez. 2019.
- ARRIENS, C. et al. Systemic lupus erythematosus biomarkers: the challenging quest. **Rheumatology (Oxford, England)**, v. 56, n. 1, p. i32–i45, 2017.
- BAIN, B. J. Diagnosis from the Blood Smear. **New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 5, p. 498–507, 2005.
- BANCHEREAU, J.; STEINMAN, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. v. 392, n. March, p. 245–252, 1998.
- BAUMGARTH, N. et al. B-1 and b-2 cell-derived immunoglobulin m antibodies are nonredundant components of the protective response to influenza virus infection. **Journal of Experimental Medicine**, v. 192, n. 2, p. 271–280, 2000.
- BAUMGARTH, N. The double life of a B-1 cell: Self-reactivity selects for protective effector functions. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 1, p. 34–46, 2011.
- BINDER, C. J.; SILVERMAN, G. J. Natural antibodies and the autoimmunity of atherosclerosis. **Springer Seminars in Immunopathology**, v. 26, n. 4, p. 385–404, 2005.
- BLANCO, P.; PITARD, V.; TAUPIN, J. Increase in Activated CD8 γ T Lymphocytes Expressing Perforin and Granzyme B Correlates With Disease Activity in Patients With Systemic Lupus Erythematosus. v. 52, n. 1, p. 201–211, 2005.
- BORBA, E. F. et al. Consenso de lúpus eritematoso sistêmico. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 48, n. 4, p. 196–207, 2008.
- BOSSALLER, L. et al. Overexpression of Membrane-Bound Fas Ligand (CD95L) Exacerbates Autoimmune Disease and Renal Pathology in Pristane-Induced Lupus. 2015.
- BOUYS, Y. M. et al. Apoptosis and NET formation in the pathogenesis of SLE. v. 45, n. December, p. 597–601, 2012.
- BRENDOLAN, A. et al. Development and function of the mammalian spleen. p. 166–177, 2007.
- CHOI, S.-C. et al. The Lupus Susceptibility Gene Pbx1 Regulates the Balance between Follicular Helper T Cell and Regulatory T Cell Differentiation . **The Journal of**

Immunology, v. 197, n. 2, p. 458–469, 2016.

CHOU, M. Y. et al. Oxidation-specific epitopes are dominant targets of innate natural antibodies in mice and humans. **Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 5, p. 1335–1349, 2009.

CHOUSTERMAN, B. G.; SWIRSKI, F. K. Innate response activator B cells: Origins and functions. **International Immunology**, v. 27, n. 10, p. 537–541, 2015.

CHUN, H. et al. Cytokine IL-6 and IL-10 as Biomarkers in Systemic Lupus Erythematosus. p. 461–466, 2007.

COMTE, D.; KARAMPETSOU, M. P.; TSOKOS, G. C. T cells as a therapeutic target in SLE. **Lupus**, v. 24, n. 4–5, p. 351–363, 2015.

COSTENBADER, K. H. et al. Cigarette Smoking and the Risk of Systemic Lupus Erythematosus: A Meta-Analysis. **Arthritis and Rheumatism**, v. 50, n. 3, p. 849–857, 2004.

COSTI, L. R. et al. Artigo original Mortalidade por lúpus eritematoso sistêmico no Brasil : avaliação das causas de acordo com o banco de dados de saúde do governo &. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 57, n. 6, p. 574–582, 2017.

DAUPHINEE, M.; TOVAR, Z.; TALAL, N. B CELLS EXPRESSING CD5 ARE INCREASED IN SJOGREN ' S SYNDROME. n. 8, p. 642–647, [s.d.].

DEAFEN, D. et al. A revised estimate of twin concordance in systemic lupus erythematosus. **Arthritis & Rheumatism**, v. 35, n. 3, p. 311–318, 1992.

DENG, J. et al. B1a cells play a pathogenic role in the development of autoimmune arthritis. v. 7, n. 15, 2016.

DIANA, J. et al. Crosstalk between neutrophils , B-1a cells and plasmacytoid dendritic cells initiates autoimmune diabetes. n. December, 2012.

DÍAZ-ZARAGOZA, M. et al. Natural and adaptive IgM antibodies in the recognition of tumor-associated antigens of breast cancer (Review). **Oncology Reports**, v. 34, n. 3, p. 1106–1114, 2015.

DING, H. J.; GORDON, C. New biologic therapy for systemic lupus erythematosus. **Current Opinion in Pharmacology**, p. 1–8, 2013.

DÖRNER, T.; FURIE, R. Novel paradigms in systemic lupus erythematosus. **The Lancet**, v. 393, n. 10188, 2019.

DÖRNER, T.; GIESECKE, C.; LIPSKY, P. E. Mechanisms of B cell autoimmunity in SLE. p. 1–12, 2011.

DORSHKIND, K.; MONTECINO-RODRIGUEZ, E. Fetal B-cell lymphopoiesis and the emergence of B-1-cell potential. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, n. 3, p. 213–219, 2007.

DUAN, B.; MOREL, L. Role of B-1a cells in autoimmunity. **Autoimmunity Reviews**, v. 5, n. 6, p. 403–408, 2006.

DURCAN, L.; DWYER, T. O.; PETRI, M. Seminar Management strategies and future directions for systemic lupus erythematosus in adults. **The Lancet**, v. 393, n. 10188, p. 2332–2343, 2019.

- ENGHARD, P. et al. Class switching and consecutive loss of dsDNA-reactive B1a B cells from the peritoneal cavity during murine lupus development. p. 1809–1818, 2010.
- FAGARASAN, S.; HONJO, T. T-independent immune response: New aspects of B cell biology. **Science**, v. 290, n. 5489, p. 89–92, 2000.
- FARKAS, L. et al. Plasmacytoid Dendritic Cells (Natural Interferon- α / β -Producing Cells) Accumulate in Cutaneous Lupus Erythematosus Lesions. **The American Journal of Pathology**, v. 159, n. 1, p. 237–243, 2001.
- FAVA, A.; PETRI, M. Systemic lupus erythematosus: Diagnosis and clinical management. **Journal of Autoimmunity**, v. 96, n. September, p. 1–13, 2019.
- FIEDLER, K. et al. Neutrophil development and function critically depend on Bruton tyrosine kinase in a mouse model of X-linked agammaglobulinemia. v. 117, n. 4, p. 1329–1340, 2016.
- FLORES-MENDOZA, G. et al. Mechanisms of Tissue Injury in Lupus Nephritis. **Trends in Molecular Medicine**, v. xx, p. 1–15, 2018.
- FORTUNA, G.; BRENNAN, M. T. Systemic lupus erythematosus. Epidemiology, pathophysiology, manifestations, and management. **Dental Clinics of North America**, v. 57, n. 4, p. 631–655, 2013.
- FRANSEN, J. H. et al. The role of dendritic cells in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. v. 1, p. 1–8, 2010.
- FREITAS, E. C.; DE OLIVEIRA, M. S.; MONTICIELO, O. A. Pristane-induced lupus: considerations on this experimental model. **Clinical Rheumatology**, v. 36, n. 11, p. 2403–2414, 2017.
- FURIE, R. et al. A Phase III , Randomized , Placebo-Controlled Study of Belimumab , a Monoclonal Antibody That Inhibits B Lymphocyte Stimulator , in Patients With Systemic Lupus Erythematosus. v. 63, n. 12, p. 3918–3930, 2011.
- GARRA, A. O. et al. Ly-1 B (B-1) cells are the main source of B cell-derived interleukin 10. p. 711–717, 1992.
- GEORGESCU, L. et al. Interleukin-10 promotes activation-induced cell death of SLE lymphocytes mediated by Fas ligand. **Journal of Clinical Investigation**, v. 100, n. 10, p. 2622–2633, 1997.
- GRIFFIN, D. O.; ROTHSTEIN, T. L. A small CD11b + human B1 cell subpopulation stimulates T cells and is expanded in lupus. v. 208, n. 13, p. 2591–2598, 2011.
- GRIMALDI, C. M. et al. Estrogen alters thresholds for B cell apoptosis and activation. **Journal of Clinical Investigation**, v. 109, n. 12, p. 1625–1633, 2002.
- GRÖNWALL, C.; VAS, J.; SILVERMAN, G. J. Protective roles of natural IgM antibodies. **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. APR, p. 1–10, 2012.
- GROSSMAN, J. M.; CLINICAL, A. Best Practice & Research Clinical Rheumatology Lupus arthritis. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**, v. 23, n. 4, p. 495–506, 2009.
- HA, S. et al. Regulation of B1 cell migration by signals through Toll-like receptors. v. 203, n. 11, p. 2541–2550, 2006a.
- HA, S. A. et al. Regulation of B1 cell migration by signals through Toll-like receptors.

Journal of Experimental Medicine, v. 203, n. 11, p. 2541–2550, 2006b.

HAN, S. et al. Maintenance of autoantibody production in pristane-induced murine lupus. **Arthritis Research and Therapy**, v. 17, n. 1, p. 1–13, 2015.

HARDY, R.; HERZENBERG, L. A.; KANTOR, A. B. Debate : the nature of B-cell subpopulations B-cell lineages exist in the mouse. v. 14, n. 2, p. 79–83, 1993.

HARDY, R. R. B-1 B cells: development, selection, natural autoantibody and leukemia. **Current Opinion in Immunology**, v. 18, n. 5, p. 547–555, 2006.

HAUGHTON, G. et al. debate B-1-e ! ls are made , not born. **Immunology today**, n. 2, p. 84–87, 1993.

HAYAKAWA, B. Y. K. et al. PROGENITORS. v. 161, n. June, p. 1554–1568, 1985.

HAYER, S. et al. ‘ SMASH ’ recommendations for standardised microscopic arthritis scoring of histological sections from inflammatory arthritis animal models. p. 714–726, 2021.

HE, J. et al. Low-dose interleukin-2 treatment selectively modulates CD4+ T cell subsets in patients with systemic lupus erythematosus. **Nature Medicine**, v. 22, n. 9, p. 991–993, 2016.

HIROSE, T. et al. PD-L1/PD-L2-expressing B-1 cells inhibit alloreactive T cells in mice. **PLoS ONE**, v. 12, n. 6, 2017.

HOLODICK, N. E.; RODRÍGUEZ-ZHURBENKO, N.; HERNÁNDEZ, A. M. Defining natural antibodies. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. JUL, p. 2–9, 2017.

HOYER, B. F.; MANZ, R. A.; RADBRUCH, A. Long-Lived Plasma Cells and Their Contribution to Autoimmunity. v. 133, p. 124–133, 2005.

ISHIDA, B. H. et al. Continuous Administration of Anti-Interleukin 10 Antibodies Delays Onset of Autoimmunity in N Z B / W F1 Mice. v. 179, n. January, 1994.

JAIN, S. et al. Interleukin 6 Accelerates Mortality by Promoting the Progression of the Systemic Lupus Erythematosus-Like Disease of BXSB . Yaa Mice. p. 1–19, 2016.

JIMÉNEZ, S. et al. The Epidemiology of Systemic Lupus Erythematosus Index Entries : v. 25, 2003.

KALIM, H. et al. Regulatory T cells compensation failure cause the dysregulation of immune response in pristane induced lupus mice model. **Malaysian Journal of Medical Sciences**, v. 25, n. 3, p. 17–26, 2018.

KAMMER, G. M. et al. Abnormal T Cell Signal Transduction in Systemic Lupus Erythematosus. v. 46, n. 5, p. 1139–1154, 2002.

KERNER, J. D. et al. Impaired expansion of mouse B cell progenitors lacking Btk. **Immunity**, v. 3, n. 3, p. 301–312, 1995.

KIMURA, J. et al. Quantitative and qualitative urinary cellular patterns correlate with progression of murine glomerulonephritis. **PLoS ONE**, v. 6, n. 1, 2011.

KRETSCHMER, K. et al. Maintenance of Peritoneal B-1a Lymphocytes in the Absence of the Spleen. 2015.

KULIK, L. et al. Pathogenic Natural Antibodies Recognizing Annexin IV Are Required to Develop Intestinal Ischemia-Reperfusion Injury. **The Journal of Immunology**, v. 182, n. 9,

p. 5363–5373, 2009.

LAFFONT, S.; SEILLET, C.; GUÉRY, J. C. Estrogen receptor-dependent regulation of dendritic cell development and function. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. FEB, 2017.

LAURENCE, A. et al. Interleukin-2 Signaling via STAT5 Constrains T Helper 17 Cell Generation. **Immunity**, v. 26, n. 3, p. 371–381, 2007.

LEE, M. H. et al. The cytokine network type I IFN-IL-27-IL-10 is augmented in murine and human lupus. n. May 2018, p. 1–9, 2019.

LEE, P. Y. et al. Type I Interferon Modulates Monocyte Recruitment and Maturation in Chronic Inflammation. v. 175, n. 5, p. 2023–2033, 2009.

LEISS, H. et al. <http://lup.sagepub.com/>. 2014.

LEWIS, M. J.; JAWAD, A. S. The SLE review series : working for a better standard of Care The effect of ethnicity and genetic ancestry on the epidemiology , clinical features and outcome of systemic lupus erythematosus. p. 1–11, 2016.

LI, W.; TITOV, A. A.; MOREL, L. An update on lupus animal models. p. 1–8, 2017.

LUSSON, D. et al. REPORT Circulating lupus anticoagulant systemic lupus erythematosus. **Dermatology**, 1999.

MA, K. et al. Multiple functions of B cells in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 23, 2019.

MAGNOL, J. P.; MONIER, J. C. Canine Systemic Lupus Erythematosus . I : A Study of 75. p. 133–139, [s.d.].

MARGARIDA, A. et al. White Blood Cell Count Abnormalities and Infections in One-year Follow-up of 124 Patients with SLE. v. 107, p. 103–107, 2009.

MARTIN, F.; OLIVER, A. M.; KEARNEY, J. F. Marginal Zone and B1 B Cells Unite in the Early Response against T-Independent Blood-Borne Particulate Antigens. v. 14, p. 617–629, 2001.

MCCLAIN, M. T. et al. Early events in lupus humoral autoimmunity suggest initiation through molecular mimicry. **Nature Medicine**, v. 11, n. 1, p. 85–89, 2005.

MCVORRAN, S.; SONG, J.; POCHINENI, V. Case Report Systemic Lupus Erythematosus Presenting with Massive Ascites : A Case of Pseudo-Pseudo Meigs Syndrome. v. 2016, n. c, p. 1–6, 2016.

MENDES, E. et al. Artigo original Consenso da Sociedade Brasileira de Reumatologia para o diagnóstico , manejo e tratamento da nefrite lúpica. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 55, n. 1, p. 1–21, 2014.

MIGUEL, D. et al. Cutaneous Manifestations of Systemic Lupus Erythematosus. v. 2012, n. Figure 1, 2012.

MOHAN, B. C. et al. Nucleosome : A Major Immunogen for Pathogenic. v. 177, n. May, 1993.

MONTECINO-RODRIGUEZ, E. et al. Distinct Genetic Networks Orchestrate the Emergence of Specific Waves of Fetal and Adult B-1 and B-2 Development. **Immunity**, v. 45, n. 3, p. 527–539, 2016.

- MONTECINO-RODRIGUEZ, E.; DORSHKIND, K. New perspectives in B-1 B cell development and function. **Trends in Immunology**, v. 27, n. 9, p. 428–433, 2006.
- MOON, H. et al. LPS-induced migration of peritoneal B-1 cells is associated with upregulation of CXCR4 and increased migratory sensitivity to CXCL12. **Journal of Korean Medical Science**, v. 27, n. 1, p. 27–35, 2012.
- MOORE, K. W. et al. INTERLEUKIN -10 AND THE INTERLEUKIN -10. v. 1, p. 683–765, 2001.
- MOREL, L. et al. Murine models of systemic lupus erythematosus. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2011, 2011.
- MOULTON, V. R.; TSOKOS, G. C. T cell signaling abnormalities contribute to aberrant immune cell function and autoimmunity. v. 125, n. 6, 2015.
- MUNROE, M. E. et al. Altered type II interferon precedes autoantibody accrual and elevated type I interferon activity prior to systemic lupus erythematosus classification. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 75, n. 11, p. 2014–2021, 2016.
- MURAKAMI, M. et al. **Prevention of autoimmune symptoms in autoimmune-prone mice by elimination of B-1 cells.** [s.l: s.n.].
- NACIONALES, D. C. et al. Type I Interferon Production by Tertiary Lymphoid Tissue Developing in Response to. v. 168, n. 4, p. 1227–1240, 2006.
- NACIONALES, D. C. et al. Deficiency of the type I interferon receptor protects mice from experimental lupus. **Arthritis and Rheumatism**, v. 56, n. 11, p. 3770–3783, 2007.
- NISITANI, S. et al. Administration of interleukin -5 or -10 activates peritoneal B-1 cells and induces autoimmune hemolytic anemia in anti-erythrocyte autoantibody-transgenic mice. **European Journal of Immunology**, v. 25, n. 11, p. 3047–3052, 1995.
- OCAMPO-PIRAQUIVE, V. et al. Expert Review of Clinical Immunology Mortality in systemic lupus erythematosus : causes , predictors and interventions. **Expert Review of Clinical Immunology**, v. 14, n. 12, p. 1043–1053, 2018.
- ODENDAHL, M. et al. Disturbed Peripheral B Lymphocyte Homeostasis in Systemic Lupus Erythematosus. **The Journal of Immunology**, v. 165, n. 10, p. 5970–5979, 2000.
- OKE, V. et al. High levels of circulating interferons type I , type II and type III associate with distinct clinical features of active systemic lupus erythematosus. p. 1–11, 2019.
- PALUMBO, P. et al. Incidência das dermatopatias auto-imunes em cães e gatos e estudo retrospectivo de 40 casos de lupus eritematoso discóide atendidos no serviço de dermatologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP – Botucatu Incidence of the autoimmune. 2010.
- PANNU, N.; BHATNAGAR, A. Oxidative stress and immune complexes: Pathogenic mechanisms in pristane induced murine model of lupus. **Immunobiology**, v. 225, n. 1, p. 0–1, 2020.
- PARKS, C. G. et al. Occupational exposure to crystalline silica and risk of systemic lupus erythematosus: A population-based, case-control study in the southeastern United States. **Arthritis and Rheumatism**, v. 46, n. 7, p. 1840–1850, 2002.
- PENG, H. et al. Role of interleukin-10 and interleukin-10 receptor in systemic lupus

erythematosus. p. 1255–1266, 2013.

PETRI, M. et al. Derivation and Validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics Classification Criteria for Systemic Lupus Erythematosus. v. 64, n. 8, p. 2677–2686, 2012.

POLLARD, K. M. et al. Interferon- γ and systemic autoimmunity. **Discovery medicine**, v. 16, n. 87, p. 123–31, 2013.

RICHARDS, B. H. B. et al. Interleukin 6 Dependence of Anti-DNA Antibody Production : Evidence for Two Pathways of Autoantibody Formation in Pristane-induced Lupus. v. 188, n. 5, p. 985–990, 1998.

RICHARDS, H. B. et al. Interferon- γ is required for lupus nephritis in mice treated with the hydrocarbon oil pristane. **Kidney International**, v. 60, n. 6, p. 2173–2180, 2001.

RÖNNBLUM, L.; ELORANTA, M. L.; ALM, G. V. The type I interferon system in systemic lupus erythematosus. **Arthritis and Rheumatism**, v. 54, n. 2, p. 408–420, 2006.

ROSEN, L. A. C.; ANHAH, G.; ROSEN, A. Autoantigens targeted in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic keratinocytes. **Journal of Experimental Medicine**, v. 179, n. 4, p. 1317–1330, 1994.

ROWLAND, S. L. et al. Early, transient depletion of plasmacytoid dendritic cells ameliorates autoimmunity in a lupus model. **Journal of Experimental Medicine**, v. 211, n. 10, p. 1977–1991, 2014.

RUCHAKORN, N. et al. Performance of cytokine models in predicting SLE activity. **Arthritis Research and Therapy**, v. 21, n. 1, p. 1–11, 2019.

RYFFEL, B. et al. Interleukin-6 Exacerbates Glomerulonephritis in (NZBxNZW) F1 Mice. p. 927–937, 1994.

SANG, A. et al. in lupus. n. 2018, [s.d.].

SATO, T. et al. Aberrant B1 cell migration into the thymus results in activation of CD4 T cells through its potent antigen-presenting activity in the development of murine lupus. p. 3346–3358, 2004.

SATOH, M. et al. An Evaluation on the 1982 Revised Criteria for the Classification of Systemic Lupus Erythematosus. **Japanese Journal of Clinical Immunology**, v. 10, n. 2, p. 186–193, 1987.

SATOH, M. et al. X-linked immunodeficient mice spontaneously produce lupus-related anti-RNA helicase A autoantibodies, by are resistant to pristane-induced lupus. **International Immunology**, v. 15, n. 9, p. 1117–1124, 2003.

SATOH, M.; REEVES, W. H. Induction of lupus-associated autoantibodies in BALB/c mice by intraperitoneal injection of pristane. **Journal of Experimental Medicine**, v. 180, n. 6, p. 2341–2346, 1994.

SATTERTHWAITE, A. B.; LI, Z.; WITTE, O. N. Btk function in B cell development and response. **Seminars in Immunology**, v. 10, n. 4, p. 309–316, 1998.

SAUMA, D. et al. Adoptive transfer of autoimmune splenic dendritic cells to lupus-prone mice triggers a B lymphocyte humoral response. **Immunologic Research**, v. 65, n. 4, p. 957–968, 2017.

- SCAPINI, P. et al. B cell-derived IL-10 suppresses inflammatory disease in Lyn-deficient mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 41, p. 16873–16874, 2011.
- SCOFIELD, R. H. et al. Klinefelter's syndrome (47,XXY) in male systemic lupus erythematosus patients: Support for the notion of a gene-dose effect from the X chromosome. **Arthritis and Rheumatism**, v. 58, n. 8, p. 2511–2517, 2008.
- SHAH, D. et al. Soluble granzyme B and cytotoxic T lymphocyte activity in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. **Cellular Immunology**, v. 269, n. 1, p. 16–21, 2011.
- SHARABI, A.; KASPER, I. R.; TSOKOS, G. C. The serine/threonine protein phosphatase 2A controls autoimmunity. **Clinical Immunology**, v. 186, p. 38–42, 2018.
- SHAW, P. X. et al. Natural antibodies with the T15 idiotype may act in atherosclerosis, apoptotic clearance, and protective immunity. **Journal of Clinical Investigation**, v. 105, n. 12, p. 1731–1740, 2000.
- SHELLY, S.; BOAZ, M.; ORBACH, H. Prolactin and autoimmunity. **Autoimmunity Reviews**, v. 11, n. 6–7, p. A465–A470, 2012.
- SMITH-BOUVIER, D. L. et al. ARTICLE A role for sex chromosome complement in the female bias in autoimmune disease. v. 205, n. 5, p. 1099–1108, 2008.
- SMITH, F. L.; BAUMGARTH, N. B-1 cell responses to infections. **Current Opinion in Immunology**, v. 57, p. 23–31, 2019.
- SOUZA, D. C. C. et al. Mortality Profile Related to Systemic Lupus Erythematosus : A Multiple Cause-of-death Analysis. p. 496–503, 2012.
- STEINMETZ, O. M. et al. CXCR3 Mediates Renal Th1 and Th17 Immune Response in Murine Lupus Nephritis. **The Journal of Immunology**, v. 183, n. 7, p. 4693–4704, 2009.
- TEDDE-FILHO, G.; NUNES, M. S. Internações hospitalares e mortalidade em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico no Brasil Hospital admissions and mortality in patients with systemic lupus erythematosus in Brazil. p. 54091–54100, 2021.
- TEICHMANN, L. L. et al. Article Dendritic Cells in Lupus Are Not Required for Activation of T and B Cells but Promote Their Expansion , Resulting in Tissue Damage. **Immunity**, v. 33, n. 6, p. 967–978, 2010.
- TEL, J. et al. Circulating Apoptotic Microparticles in Systemic Lupus Erythematosus Patients Drive the Activation of Dendritic Cell Subsets and Prime Neutrophils for NETosis. v. 68, n. 2, p. 462–472, 2016.
- THONG, B.; OLSEN, N. J. Systemic lupus erythematosus diagnosis and management. **Rheumatology (United Kingdom)**, v. 56, n. October, p. i3–i13, 2017.
- TSOKOS, G. C. et al. New insights into the immunopathogenesis of systemic lupus erythematosus. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 12, n. 12, p. 716–730, 2016.
- TSOKOS, G. C. Autoimmunity and organ damage in systemic lupus erythematosus. **Nature Immunology**, v. 21, n. 6, p. 605–614, 2020.
- TUNG, J. W. et al. Identification of B-Cell Subsets. v. 271, [s.d.].
- UZRAIL, A. H.; ASSAF, A. M.; ABDALLA, S. S. Correlations of Expression Levels of a

- Panel of Genes (IRF5 , Erythematosus Outcomes in Jordanian Patients. v. 2019, 2019.
- VAIOPOULOS, A. G. et al. Case Report Diffuse Calcifications of the Spleen in a Woman with Systemic Lupus Erythematosus. v. 2015, n. February 2013, p. 9–12, 2015.
- VEDOVE, C. D. et al. Drug-induced lupus erythematosus. **Archives of Dermatological Research**, v. 301, n. 1, p. 99–105, 2009.
- VELO-GARCÍA, A.; GUERREIRO, S.; ISENBERG, D. A. The diagnosis and management of the haematologic manifestations of lupus. 2016.
- VILAR, M. J. P.; SATO, E. I. in a tropical region (Natal , Brazil). 2002.
- WAHREN-HERLENIUS, M.; DÖRNER, T. Immunopathogenic mechanisms of systemic autoimmune disease. **The Lancet**, v. 382, n. 9894, p. 819–831, 2013.
- WHITE, S. D. DISEASES OF THE NASAL. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 24, n. 5, p. 887–895, [s.d.].
- YANG, Y. et al. Division and differentiation of natural antibody-producing cells in mouse spleen. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 11, p. 4542–4546, 2007.
- YULIASIH, Y.; RAHMAWATI, L. D.; PUTRI, R. M. Th17/Treg ratio and disease activity in systemic lupus erythematosus. **Caspian Journal of Internal Medicine**, v. 10, n. 1, p. 65–72, 2019.
- YUNG, R. et al. MECHANISMS OF DRUG-INDUCED LUPUS 111 . Sex-Specific Differences in T Cell Homing May Explain Increased Disease Severity in Female Mice. v. 40, n. 7, p. 1334–1343, 1997.
- YURASOV, S. et al. Persistent expression of autoantibodies in SLE patients in remission. **Journal of Experimental Medicine**, v. 203, n. 10, p. 2255–2261, 2006.
- ZAMANSKY, G. B. Sunlight-induced pathogenesis in systemic lupus erythematosus. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 85, n. 3, p. 179–180, 1985.
- ZHONG, X. et al. Reciprocal generation of Th1/Th17 and Treg cells by B1 and B2 B cells. **European Journal of Immunology**, v. 37, n. 9, p. 2400–2404, 2007.
- Zollinger HU, Mihatsch MJ. Renal pathology in biopsy. Light, electron an immunofluorescent microscopy and clinical aspects. Chapter 3. Renal biopsy management and processing by the pathologist. Springer Verlag, Berlin, 1978, p. 8-20.