



Sara Rodrigues Duarte

O envolvimento das Células Dendríticas no Lúpus Eritematoso Sistémico

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pela Professora Doutora Maria Teresa Rosete e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Sara Rodrigues Duarte

O envolvimento das Células Dendríticas no Lúpus Eritematoso Sistémico

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pela Professora Doutora Maria Teresa Rosete e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, Sara Rodrigues Duarte, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2010125471, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de estágio Curricular.

Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia desta Monografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os direitos de autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 10 de Setembro de 2015.

(Sara Rodrigues Duarte)

A Tutora

Professora Doutora Maria Teresa Teixeira Cruz Rosete

A Aluna

Sara Rodrigues Duarte

Agradecimentos

Agradeço à Professora Doutora Maria Teresa Rosete que me disponibilizou bastante material utilizado para a elaboração da presente monografia assim como me ajudou no esclarecimento de dúvidas e na melhoria de alguns aspetos científicos.

Às orientadoras do meu estágio curricular, Dra Joana Martins de Carvalho e Dra Ana Isabel Nunes, que se mostraram sempre disponíveis durante o período de elaboração da monografia.

À minha família que esteve sempre do meu lado nesta última etapa crucial para o término do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Aos meus amigos que se mostraram interessados em ajudar no que fosse possível.

Índice

Resumo	2
Abreviaturas.....	3
Introdução	4
O Sistema Imunitário	5
Lúpus Eritematoso Sistêmico – uma doença autoimune	6
Prevalência e Incidência do LES.....	6
Fatores para a predisposição de LES.....	7
Intervenientes na fisiopatologia do LES	8
Apoptose	10
Alterações na apoptose e resposta autoimune	11
Células Dendríticas.....	15
Tipos de DCs	16
As mDCs.....	16
As pDCs	17
Terapêutica Convencional	18
Perspectivas Terapêuticas baseadas em Células Dendríticas	19
Conclusão.....	21
Referências bibliográficas	22

Resumo

O Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) resulta de um funcionamento incorreto do sistema imunitário, afetando preferencialmente mulheres na sua idade fértil. O desenvolvimento desta patologia é modulado por fatores genéticos, hormonais e ambientais, apresentando ainda um vasto leque de sintomas e um decurso imprevisível, o que torna o diagnóstico do LES difícil.

As células dendríticas (DCs) são células imunitárias com um papel crucial na imunidade dos indivíduos, e por isso, constituem alvos terapêuticos promissores para doenças autoimunes, como o LES. DCs imaturas, e por isso com um perfil tolerogênico, possuem a capacidade de induzir tolerância pelas células imunitárias, como linfócitos T CD4 e linfócitos B, reduzindo respostas inflamatórias aos auto-antígenos provenientes de células apoptóticas. A presente monografia tem por objetivo apresentar estudos recentes focados nestas células, especificamente em estratégias de terapia celular para o LES, uma doença com elevada morbidade e mortalidade.

Abstract

The Systemic Lupus Erythematosus (SLE) results from a malfunction of the immune system, mainly affecting women in their childbearing years. The development of this disease is modulated by genetic, hormonal and environmental factors, still presenting a wide range of symptoms and an unpredictable course, what makes a SLE diagnosis difficult.

Dendritic cells (DCs) are immune cells with a key role in immunity of individuals, and therefore, are promising therapeutic targets for autoimmune diseases such as SLE. Immature DCs and therefore with a tolerogenic profile, have the ability to induce tolerance by immune cells, such as CD4 T-lymphocytes and B lymphocytes, reducing inflammatory responses to autoantigens from apoptotic cells. This monograph aims to present recent studies focused on these cells, specifically in cell therapy strategies for SLE, a disease with high morbidity and mortality.

Abreviaturas

Ac – Anticorpos

Ag – Antígeno

ANA – Anticorpo Antinuclear

APC – Célula Apresentadora de Antígeno

ATP – Adenosina Trifosfato

BAFF – *B-cell activating factor*

BlyS – *B lymphocyte stimulator*

CIC – Imunocomplexos Circulantes

DC – Células Dendríticas

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DsDNA – Ácido desoxirribonucleico de dupla cadeia

HMGB1 – Proteínas de grupo I de elevada mobilidade

IC – Imunocomplexos

IFN – Interferão

Ig – Imunoglobulina

IL – Interleucina

LES – Lupus Eritematoso Sistémico

mDC – Células Dendríticas Mielóides

MHC – Complexo *major* de histocompatibilidade

mRNA – Ácido Ribonucleico mensageiro

NET – *Neutrophil extracellular traps*

NK – *Natural Killer*

PAMP – Padrões Moleculares Associados a Agentes Patogénicos

pDC – Células Dendríticas plasmocitóides

RNA – Ácido Ribonucleico

ssRNA – Ácido Ribonucleico cadeia simples

T_c – Linfócitos T Citotóxicos

TGF – Fator de Transformação de Crescimento

T_h – Linfócitos T auxiliares

TLR – Recetores *Toll-like*

TNF – Fator de Necrose Tumoral

ToIDC – Células Dendríticas Tolerogénicas

Treg – Linfócitos T reguladores

UV – Ultravioleta

Introdução

O Lúpus Eritematoso Sistémico (LES) é uma doença autoimune crónica caracterizada por uma enorme variedade de sintomas, de diagnóstico complexo e causada por inúmeros fatores internos e externos ao indivíduo.

Linfócitos B, T e células dendríticas e as suas interações funcionais durante as respostas imunológicas contribuem fortemente para a fisiopatologia do LES, apesar da origem desta doença ser ainda alvo de investigação clínica e científica.

Esta patologia tem uma incidência estimada entre 1 a 10 casos por 100 000 pessoas por ano e uma prevalência entre 20 a 150 casos em cada 100 000 indivíduos[1], sendo crucial o estudo das células imunitárias envolvidas na fisiopatologia e dos mecanismos celulares e moleculares subjacentes ao LES, por forma a identificar alvos terapêuticos suscetíveis de manipulação farmacológica e celular.

Atualmente existem alguns fármacos utilizados para o tratamento desta doença, contudo, não existe ainda um tratamento universal que seja eficaz para a maioria dos doentes, em parte devido ao facto do LES apresentar elevada heterogeneidade nos seus sintomas e decurso. Deste modo, a terapêutica do LES é também sujeita a estudos científicos e clínicos.

Durante a presente monografia irão ser descritos os mecanismos envolvidos na fisiopatologia da doença, os fatores que predis põem a população para o lúpus, as estratégias terapêuticas atualmente utilizadas e ainda novas abordagens promissoras para o seu tratamento.

○ Sistema Imunitário

O sistema imunitário, ao contrário dos restantes sistemas do organismo humano, não tem uma unidade anatómica circunscrita e a sua principal função é a de manter a integridade do organismo, promovendo a sua adaptação a estímulos externos. As células protagonistas do sistema imunitário são os glóbulos brancos ou leucócitos que se subdividem em linfócitos (T e B), células *natural killer* (NK), neutrófilos, eosinófilos, basófilos, células dendríticas e monócitos, que nos tecidos se diferenciam em macrófagos.

Quando o organismo humano é afetado por agentes externos, a imunidade inata, constituída pelas barreiras físico-químicas externas, células fagocitárias (macrófagos, neutrófilos, células NK e células dendríticas) e o sistema do complemento, é imediatamente ativada. Esta vai atuar inicialmente e caso seja insuficiente no combate aos agentes patogénicos, é a imunidade adaptativa, mediada pelos linfócitos, que irá atuar.

Existem dois grupos de linfócitos:

→ Os linfócitos B diferenciam-se em plasmócitos, em resposta a antígenos (Ag) e estes por sua vez produzem imunoglobulinas (Ig) ou anticorpos (Ac) específicos para esses antígenos por forma a combater os agentes invasores. Após a eliminação dos agentes patogénicos, os linfócitos B reduzem a produção de Ac, sendo que alguns se mantêm ativos, memorizando o antígeno em questão e proporcionando uma resposta mais rápida e eficaz caso o organismo volte a ser infetado pelo mesmo Ag. A este mecanismo dá-se o nome de resposta imunitária humoral.

→ Os linfócitos T podem ser linfócitos T_h (também conhecidos como células CD4) ou auxiliares, que ao libertarem citocinas, além de regularem a diferenciação, crescimento e função de várias células, vão ainda ativar os linfócitos T_c (também conhecidos como células CD8) ou citotóxicos que destroem as células infetadas. A este processo dá-se o nome de imunidade celular.

Durante as respostas inflamatórias, além do envolvimento das células anteriormente referidas, ocorre também a ativação dos mastócitos, que são células produtoras de histamina, responsáveis por vasodilatação e aumento da permeabilidade dos capilares, com consequente aumento do fluxo sanguíneo e recrutamento de um maior número de leucócitos ao local. Assim, há passagem de plasma para os tecidos e irritação das terminações nervosas sensitivas, traduzindo-se numa sensação dolorosa [2,3].

Lúpus Eritematoso Sistêmico – uma doença autoimune

Numa doença autoimune, o sistema imunitário está alterado e é incapaz de distinguir as células e tecidos saudáveis do organismo de agentes externos, resultando na produção de anticorpos contra o próprio organismo – auto-anticorpos.

Especificamente, no caso do Lúpus Eritematoso Sistêmico são produzidos auto-anticorpos principalmente contra antígenos nucleares, embora também possam reconhecer componentes citoplasmáticos e da membrana celular, levando a uma lesão tecidual generalizada [4]. Assim, os principais sintomas associados a esta doença devem-se à acumulação ou origem *in situ* de antígenos nucleares como histonas ou DNA de dupla cadeia, alguns antígenos citoplasmáticos e correspondentes IgGs auto-reativas.

Os sintomas do LES incluem artrite, dor, febre, dificuldade na locomoção, problemas de visão, inflamação dos rins (dos sintomas mais severos e alarmantes), pressão arterial elevada, fotossensibilidade, fenómeno de *Reynaud*, cansaço, perda de peso e lesões na pele, como vermelhidão em forma de “asa de borboleta”. Excetuando este último, todos os outros sintomas são heterogêneos e similares noutras doenças, o que tornam o diagnóstico do LES ambíguo. Esta doença pode manifestar-se numa fase passiva, em que os sintomas são menos acentuados, ou numa outra mais ativa, em que estes são bastante exacerbados [5,6,7].



Ilustração 1 [26] – lesões cutâneas características do LES.

Prevalência e Incidência do LES

A prevalência determina a proporção de indivíduos que têm a doença num determinado momento no tempo, enquanto a incidência prediz o risco de um indivíduo saudável vir a desenvolver a doença num período de tempo.

Foi demonstrado que fatores hereditários e ambientais podem predispor um indivíduo para um decurso e severidade da doença diferentes. Estudos demonstraram que a incidência do LES é

Tabela 1 [8] – estudos epidemiológicos do LES de acordo com país e etnia.

Country	Study period	Age	Ethnicity	Incidence, overall	Prevalence, overall
USA, rural Wisconsin	1991-2001	All	All	5.1	78.5
USA, CA		≥ 18	All		107.6
			African American		
			Hispanic		
			Asian/Pacific Islander		
			White		
USA, PA			All		148.5
			African American		
			Hispanic		
			Asian/Pacific Islander		
			White		
Canada, Manitoba	1980-1996		Native American	2.0-7.4	42.3
			White	0.9-2.3	20.6
Canada, Quebec	1994-2003	All	All	2.8-3.0	44.7
UK, Birmingham	1981	≥ 18	All	3.8	27.7
			Afro-Caribbean	11.9	111.8
			Asian	15.2	46.7
			White	2.5	20.7
UK, Nottingham	1989-90	All	All	4.0	24.6
			Afro-Caribbean	31.9	207.0
			Asian	4.1	48.8
			White	3.4	20.3
UK	1990-99	All	All	4.7	
Australia, central	1999		Aborigines		73.5*
			European Australians		19.3
Denmark, Funen	1995-2003		All	1.0	28.3
Norway, Arctic	1996-2006	≥ 30	All	3.0	64.1*
Norway, Arctic	1978-96	≥ 30	All	2.6	49.7
Greece	1982-2001	All	All	1.9	38.1
Martinique	1990-99	All	All (Afro-Caribbean)	4.7	64.2
Curacao	1980-89		All	4.6	47
Brazil	2000	≥ 15	All	8.3	

superior em afro-americanos, hispânicos e asiáticos, comparativamente aos caucasianos, pelo que os sintomas também tendem a ser mais severos nestas raças/etnias. Nestes casos, o compromisso renal tende a ser muito mais comum do que nos europeus [8]. Além disto, verificou-se uma maior predisposição para esta doença na mulher quando comparada com o homem, numa proporção de 9:1, principalmente durante o seu período fértil [1].

Fatores para a predisposição de LES

A origem do Lúpus Eritematoso Sistémico ainda não é totalmente conhecida, apesar de se saber que existem vários fatores que contribuem para a patogénese desta doença.

Fatores Genéticos:

Foi comprovado que a taxa de incidência da doença é muito superior em gémeos monozigóticos (25%) quando comparada com gémeos dizigóticos (2%). Contudo, verificou-se que a mutação num único gene é um fator pouco significativo quando comparado com a combinação de vários genes e fatores ambientais.

Estudos realizados mostraram ocorrer incapacidade da metilação do DNA em indivíduos com LES, facto que contribui para a expressão aumentada de proteínas inflamatórias. Foi demonstrado que fármacos como hidralazina ou procainamida, assim como herbicidas, conservantes, tintas, plásticos e tabaco, estão associados ao LES por também induzirem hipometilação do DNA.

Por fim, também a hipometilação do DNA aumenta a taxa de apoptose das células mononucleares do sangue periférico, evento potenciador de reações autoimunes [1].

Fatores ambientais e hormonais:

A razão da enorme discrepância verificada para a predisposição do LES entre mulheres e homens é um assunto ainda em discussão e o papel das hormonas sexuais na contribuição da patogénese do lúpus ainda permanece por esclarecer. Contudo, verificou-se que mulheres com lúpus apresentam níveis de estrogénios anormalmente elevados quando comparados com androgénios, devido a um aumento na atividade da enzima que converte androgénios em estrogénios - a aromatase. Estudos *in vitro* demonstraram um aumento da produção de citocinas inflamatórias, especialmente interferão α (IFN- α), provenientes das células dendríticas (DCs), linfócitos T e B expostos aos estrogénios. Por este motivo, o risco de desenvolvimento de LES é também elevado durante a gravidez, devido ao aumento das hormonas sexuais circulantes. Na fase pós-parto, há níveis elevados de prolactina que estimulam também o sistema imunitário, particularmente as células B [1]. Além disto,

verificou-se que mulheres que se encontram já no período da menopausa, mas que recebem terapia de substituição hormonal, mostram elevado risco de desenvolver LES comparativamente às que não efetuam este tratamento [9].

Agentes externos:

A presença de agentes exógenos ao organismo irá contribuir para a exacerbação de reações inflamatórias e conseqüentemente para um agravamento dos sintomas. Vírus, bactérias, agentes químicos e radiações UV (fator ambiental crucial no desenvolvimento do lúpus)[9], ao estimularem também a resposta inflamatória, originam a produção de Ac com aumento da probabilidade de ocorrerem reações autoimunes [1].

Intervenientes na fisiopatologia do LES

Apesar de se saber que a etiologia de LES é multifatorial, são os processos inflamatórios, as alterações genéticas e epigenéticas e as respostas do sistema imunitário adaptativo e inato que assumem a responsabilidade maior no desenvolvimento desta patologia [10].

Assim, referem-se os eventos celulares e moleculares que mais se destacam na génese do lúpus:

✓ CÉLULAS DENDRÍTICAS

São células apresentadoras de antígenos (APC) profissionais e como tal, responsáveis também por alterações funcionais e fenotípicas características do LES.

Na sua fase matura, estas células apresentam um papel fundamental na apresentação de antígenos, como microrganismos, ICs (imunocomplexos), células derivadas do sistema imune inato e adaptativo e células mortas ou detritos destas, às células imunitárias, por forma a ser ativada uma resposta imunológica eficaz contra esses antígenos. Após o reconhecimento, captação e processamento de antígenos, as DCs migram para os órgãos linfóides secundários, apresentando os Ags acoplados a moléculas do MHC (complexo *major* de histocompatibilidade) às células T aí residentes.

Quando as DCs reconhecem auto-antígenos, irão então ser as responsáveis pela apresentação destes aos linfócitos T, desencadeando-se uma resposta autoimune [6,12,15, 16].

✓ ANTICORPOS ANTINUCLEARES

Os anticorpos antinucleares (ANA), tal como o próprio nome indica, vão reconhecer antígenos do núcleo celular, como o DNA de dupla cadeia e ribonucleoproteínas. Os Ac anti-DNA fazem parte de um grupo específico de anticorpos que se podem ligar a DNA de cadeia simples ou dupla, ou ambas, e podem ser IgM, anticorpos naturais presentes em indivíduos sãos, ou IgG com maior afinidade para o DNA. Estes últimos, ao se ligarem ao DNA de dupla cadeia libertado sob a forma de nucleossomas pelas células em apoptose, formam complexos imunes circulantes – CICs - que lhes conferem a sua patogenia. Como resultado, para além da inflamação causada, os CICs tendem a depositar-se em tecidos após a exposição a antígenos nucleares provenientes da apoptose [9, 11].

✓ LINFÓCITOS T

Verificou-se que péptidos de determinadas histonas conseguem estimular linfócitos T_h para produzir citocinas, que por sua vez levam à proliferação de linfócitos B, bem como à produção de Ac específicos para estes epítomos provenientes dos nucleossomas. Assim, a interação das células B e T estimulada pela presença de auto-antígenos leva a reações autoimunes e, conseqüentemente, ao desenvolvimento do LES.

Além dos linfócitos T_h , também linfócitos T_{reg} (células T reguladoras), estão envolvidas neste processo. Estas células têm a capacidade de regular a atividade dos linfócitos T_h e B, conseguindo reduzir as respostas inflamatórias. Anomalias nestas células são também determinantes no desenvolvimento de reações autoimunes [9, 11].

✓ LINFÓCITOS B

O LES é uma doença dependente das células B, uma vez que são estas as responsáveis pela produção de anticorpos, nomeadamente Ac anti-dsDNA. À sua superfície, as células B possuem recetores $Fc\gamma RIIb$ inibitórios, que regulam a sua ativação e controlam a sua tolerância. A deficiência destes recetores leva à ativação destas células imunitárias que, para além de produzirem citocinas inflamatórias, vão processar e apresentar antígenos, inclusivamente os que contêm material nuclear circulante (Ag-IgG ICs), através de moléculas MHC-II às células T, desencadeando-se respostas autoimunes [12].

✓ TLR – RECETORES TOLL-LIKE

Estes recetores existem à superfície de APCs e permitem o reconhecimento de microrganismos. TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR7, TLR8 e TLR9 são recetores que também reconhecem elementos endógenos, como proteínas de grupo I de elevada mobilidade (HMGB1), proteínas de choque térmico (HSP60-70), proteína surfactante A, fibronectina, fibrinogénio, lactoferrina, soro amilóide A, fragmentos de ácido hialurónico, sulfato de heparano, mRNA, ssRNA, e ICs contendo cromatina. Tal como acontece com agentes patogénicos, o reconhecimento destes elementos endógenos por parte dos recetores TLR irá desencadear reações inflamatórias contra moléculas/estruturas do próprio organismo [12].

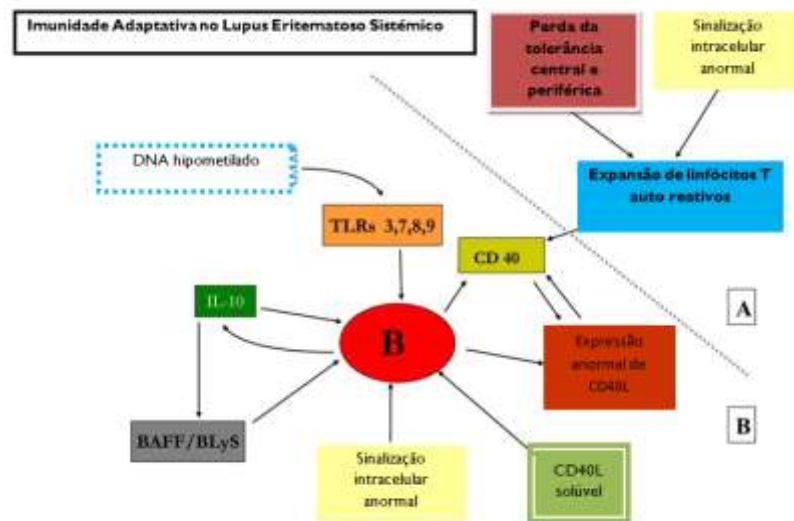


Ilustração 2^[1] – A: uma quebra nos mecanismos de controlo da tolerância central ou periférica podem levar à expansão e diferenciação de linfócitos T auto-reativos que por sua vez ativam linfócitos B auto-reativos; B: linfócitos B podem ser ativados, pelo mecanismo clássico, pelos linfócitos T ou alternativamente, através da ligações com imunocomplexos com auto-DNA/RNA e TLRs. Além disto, BAFF/BlyS estão envolvidas na patogénese do LES uma vez que afetam a sobrevivência dos linfócitos B de memória bem como a sua maturação e tipo de imunoglobulinas. BAFF/BlyS são estimuladas por IFN- γ , IL-10 e CD40 produzidos em condições inflamatórias (TLRs – recetores Toll-like, BAFF – fator de ativação celular, BlyS – estimulador de linfócitos B).

Apoptose

As células que terminam o seu ciclo de vida são uma fonte de antígenos nucleares e como tal, quando apresentados ao sistema imune num contexto patológico, levam a uma resposta inflamatória e autoimune.

Há dois processos pelos quais as células podem morrer:

- 1) **Necrose:** A morte celular deve-se ao facto da célula já se encontrar no seu término de vida ou a algum estímulo externo, como um agente patogénico, isquémia, radiações

ou citocinas, levando a um fenómeno violento, repentino, desorganizado e patológico. Ocorre desintegração celular e libertação de componentes intracelulares para o meio extracelular, como HMGB1, ácido hialurónico e ácido úrico. Consequentemente, há secreção de Ac com afinidade para ligar ao DNA nuclear.

- 2) **Apoptose:** a morte é programada pela própria célula sendo posteriormente removida por células fagocitárias. Além disto, são desencadeadas reações enzimáticas que levam à desorganização autolítica, como resultado da clivagem de proteínas, enzimas e DNA, não havendo libertação de componentes apoptóticos para o meio extracelular [9].

Alterações na apoptose e resposta autoimune

A apoptose é um mecanismo fundamental no equilíbrio dos órgãos, principalmente naqueles que possuem elevado *turnover* celular. Este processo consegue equilibrar a extensão da divisão celular com a sua morte e por isso contribui para a renovação celular do organismo humano. Contudo, também é suscetível a desregulação, com consequências graves ao nível do sistema imunitário.

Quando ocorre apoptose, as células sinalizam através de vários mediadores, como ATP, lisofosfatidilcolina, esfingosina-1-fosfato e fractalcina, responsáveis pelo recrutamento de macrófagos. Estes iniciam a fagocitose das células apoptóticas devido a alterações no glicocálix da membrana celular. Durante a fagocitose ocorre libertação de citocinas anti-inflamatórias e imunoreguladoras, nomeadamente o fator de transformação de crescimento beta (TGF- β) e interleucina 10 (IL-10). A ligação destas a recetores CD36 localizados nos monócitos, macrófagos, células dendríticas e células epiteliais microvasculares contribui para um efeito inibidor das reações inflamatórias.

○ Alteração na via da 12/50 lipoxigenase

Os macrófagos residentes conseguem estimular a expressão de 12/50 lipoxigenase, que ao recaptar células apoptóticas reduz a produção de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), IL-1 e IL-12. Esta enzima é também responsável por impedir que estas células sejam captadas por monócitos inflamatórios Ly6Chi, sendo que estes são precursores de macrófagos inflamatórios e células dendríticas mielóides (mDC). Conclui-se assim, que a perda da actividade desta enzima resulta num processo anormal de fagocitose que culminará com uma reacção autoimune.

○ Necrose Secundária

Muitas vezes podem ocorrer erros na fagocitose de células apoptóticas, levando a que estas progridam para um processo denominado necrose secundária, ocorrendo libertação de antígenos nucleares e citoplasmáticos para o meio extracelular, tal como acontece na necrose, sendo expostos auto-antígenos envolvidos na etiologia de reações autoimunes.

Contudo, não é apenas este o motivo pelo qual a necrose secundária desempenha um papel relevante no desenvolvimento de doenças autoimunes, nomeadamente:

- a) As células que entram em necrose secundária libertam DAMPs (*danger-associated molecular patterns*) que levam à estimulação de citocinas inflamatórias, e como tal a respostas inflamatórias;
- b) A eliminação de células que entram em necrose secundária, através da ativação de recetores Fc γ específicos para Ac e localizados à superfície de células, vai também ativar o processo inflamatório;
- c) Proteases de cisteína clivam auto-antígenos, originando epítomos críticos que induzirão respostas autoimunes;
- d) A persistência de auto-antígenos no ambiente celular leva a uma contínua apresentação destes, culminado em reações autoimunes.

○ Deficiência no complemento

O complemento tem um papel fundamental no controlo das reações inflamatórias, uma vez que ao opsonizar diretamente as células mortas, facilita o processo de remoção de componentes apoptóticos evitando a sua deposição e circulação. Qualquer anomalia ou defeito nas proteínas envolvidas no mecanismo clássico do complemento (C1q, C2 ou C4) contribui para que permaneçam no meio extracelular auto-antígenos e consecutivamente ocorram reações autoimunes.

○ Macrófagos com atividade deficiente

Para ocorrer a fagocitose propriamente dita pelos macrófagos é necessário que estas células sejam ativadas através de recetores tirosina. O bloqueio destes recetores está assim relacionado com uma deficiência na atividade fagocitária induzindo respostas autoimunes.

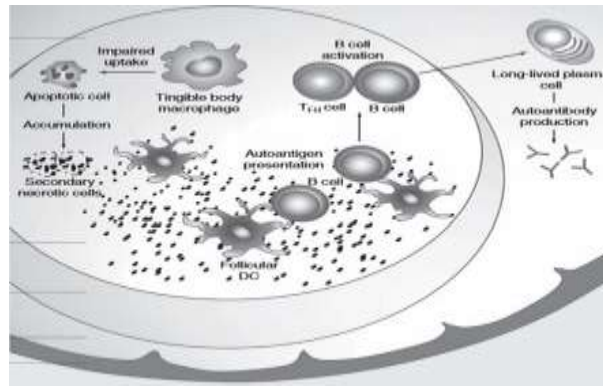


Ilustração 3^[6] – Centro germinativo de um gânglio linfático. Uma remoção ineficaz das células apoptóticas é um fator crítico na etiologia do LES. Quando os macrófagos são ineficientes na eliminação de células mortas no centro germinativo do gânglio linfático, os restos apoptóticos acumulam-se e são apresentados aos linfócitos B auto-reativos. Estes linfócitos B diferenciam-se em plasmócitos que permanecem no plasma e vão produzir anticorpos.

○ IgM natural insuficiente

Anticorpos IgM são produzidos normalmente após a exposição a um agente externo ou patogénico, apresentando especificidade para determinados Ags. As IgM naturais conseguem impedir a ligação de IgG-anti DNA de dupla cadeia aos auto-antígenos provenientes de células apoptóticas. Assim, níveis diminuídos de IgM aumentam bastante a probabilidade de desenvolvimento de doenças autoimunes, uma vez que as IgG se mostram disponíveis para ligarem auto-antígenos.

Também as IgM naturais anti-DNA de dupla cadeia podem prevenir a ligação de linfócitos B auto-reativos a auto-antígenos, evitando o desenvolvimento de respostas autoimunes.

Estudos realizados demonstraram que doentes com lúpus apresentam elevadas quantidades de IgG anti-DNA de dupla cadeia quando comparadas com IgM, concluindo que a redução dos níveis desta imunoglobulina contribui para o desenvolvimento de LES.

○ Deficiência em DNase I

Durante a apoptose, apesar da manutenção da integridade da membrana celular característica deste fenómeno, há desorganização a nível interno, marcada pela destruturação do material genético. Este evento é promovido por uma endonuclease – a DNase I – e posteriormente pela DNase II e proteínas auxiliares. Esta pré-digestão é suficiente para promover a captação de células em apoptose pelos macrófagos, processo fundamental no impedimento da livre circulação de restos apoptóticos.

Além da DNase I, também a proteína C1q do complemento assume um papel fulcral na degradação da cromatina das células em apoptose, na medida em que afasta as proteínas

ligadas ao DNA, facilitando o acesso da DNase I e evitando o bloqueio desta enzima pela actina existente no citoesqueleto da célula. Também é a C1q que irá promover a remoção da cromatina degradada pelas células com atividade fagocitária [6].

Foram testados soros de murganhos controlo contra soros de murganhos híbridos, cuja concentração em DNase era extremamente baixa comparativamente aos primeiros, verificando-se que nestes se desenvolveram anticorpos anti-DNA. Além disso, outro estudo demonstrou que fragmentos de DNA, nomeadamente no intervalo de pares de base 35-45, obtidos a partir de soro de doentes com LES são protegidos da ação da DNase I e permanecem assim ligados ao anticorpo, formando um IC anti-DNA-DNA-DNase-resistente [13].

○ NETosis

Os neutrófilos são a subpopulação de leucócitos mais abundante na circulação sanguínea, e em doentes com lúpus apresentam não só um fenótipo como uma função anormal, libertando quantidades elevadas de NET – *neutrophil extracellular traps*. Os NET são agregados de proteínas antimicrobianas e enzimas granulares conjugadas com DNA e as suas histonas. Estes complexos, para além de contribuírem para a formação de auto-antígenos, são também citotóxicos para as células endoteliais, levando a lesões vasculares. Estes auto-antígenos, conseguem ativar linfócitos B auto-reativos, contribuindo para o desenvolvimento de reações autoimunes[6,11]. De facto, a HMGB1 (proteína produzida durante o processo de ativação celular e apoptose, que estabiliza o nucleossoma e apresenta elevada atividade pró-inflamatória) apresenta a importante função de libertação de citocinas. Para além disto, estudos *in vitro* comprovaram que esta proteína aumenta a formação de NET, através da mediação dos receptores TLR4, contribuindo para processos inflamatórios e lesão tecidual [14].

Adicionalmente, ICs derivados de NET vão estimular pDCs a libertar IFN- α que ao atuar nos neutrófilos induz exposição externa de péptido antimicrobiano de catelicidina (LL37) e péptidos de neutrófilos humanos (HNP), promovendo a formação de novos NETs, num ciclo contínuo.

Assim, torna-se imprescindível a remoção destes NETs, função esta perfeitamente desempenhada pela DNase I, que mais uma vez se torna crucial no impedimento de respostas autoimunes.

Estudos realizados demonstraram que além das elevadas concentrações de ANA ocorre ainda acumulação de NETs nos rins e pele em doentes com LES [1,6,11].

Células Dendríticas

As DCs assumem um papel de excelência na manutenção da homeostasia da imunidade, tanto na ativação de reações imunitárias como na indução da tolerância das células T através de mecanismos de estimulação/repressão de receptores existentes à sua superfície [12,15]. As células dendríticas, especializadas na captura e apresentação de antígenos, dependendo do seu estado de maturação, são assim consideradas uma ponte entre a imunidade inata e a adaptativa [16].

Quando se dirigem até aos órgãos linfóides secundários para apresentar os antígenos às células T, as DCs sofrem um processo de maturação fenotípica e funcional que lhes confere imunogenicidade e que é acompanhado por diversos eventos celulares e moleculares:

1. Aumento da expressão de moléculas MHC;
2. Expressão à superfície de moléculas estimuladoras – CD80, CD86 e CD40 (que juntamente com as anteriores vão ativar as células T *naive*);
3. Libertação de citocinas inflamatórias – IL-6 e TNF- α ;
4. Expressão de inibidores de receptores PD-L1 (*programmed death ligand 1*), sendo que estes receptores são os responsáveis pela inibição da ativação das células T e desenvolvimento de T_{reg}.

Enquanto isto, as células dendríticas imaturas capturam antígenos provenientes de células em morte celular mas não ativam as células T, dizendo-se por isso imunotolerantes.

As DCs reconhecem padrões moleculares associados a agentes patogénicos (PAMPs) através de receptores membranares e citosólicos – receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), como receptores *NOD-like* e *Toll-like* (TLRs), que lhes permitem exercer o seu papel de apresentação de antígenos. Estes receptores, para além de reconhecerem antígenos externos ligam-se também a auto-antígenos, como DNA, proteínas de choque térmico, HMGB1 e componentes da matriz extracelular. Todas estas observações vêm fundamentar a importância do processo de maturação das DCs na reduzida tolerância das células T em indivíduos com LES [6,12,15,16].

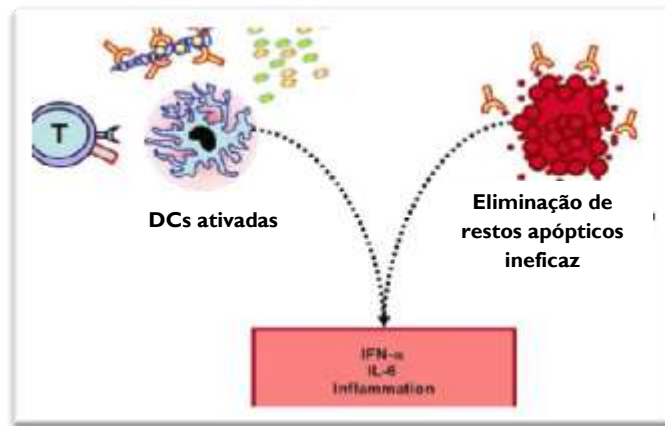


Ilustração 4 [27] – células dendríticas de doentes com LES são ativadas por estímulos, como o CD40, citocinas inflamatórias, e CIC com ácidos nucleicos. As DCs ativadas produzem quantidades elevadas de citocinas pró-inflamatórias (como IL-6 e TNF- α) que amplificam a resposta imunitária. O material apoptótico não é reconhecido como anti-inflamatório e contribui para a ativação das DCs

Tipos de DCs

As DCs podem diferenciar-se por duas vias distintas gerando diferentes tipos de DCs, com funções e características fenotípicas díspares. Assim, existem as células dendríticas mielóides, mDCs, geradas pela via mielóide como são exemplo as células de *Langerhans*; e as células dendríticas plasmocitóides, que predominam no sangue periférico e órgãos linfóides secundários [11,16].

As mDCs

As células dendríticas mielóides são as que apresentam maior capacidade APC e expressam preferencialmente recetores TLR2, 3, 4, 5, 6 e 8. A ativação destes leva à elevada expressão de TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12 e IL-10. Assim, facilmente reconhecem PAMPs, como peptidoglicanos (TLR2) e lipopolissacarídeos (TLR4) [16]. Verifica-se que para além da expressão aumentada de CD86 e CD40, ocorre ainda estimulação de recetores Fc γ , que são expressos em várias células APCs e células não imunitárias. Estes recetores vão reconhecer e ligar ICs, promovendo a maturação e ativação celular que confere imunogenicidade às DCs, com consequente ativação de células T específicas de antígeno. Este processo ocorre através da via ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activating motifs*). Esta via é ainda regulada negativamente por ativação do mecanismo ITIM (*immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif*), através da ligação aos recetores Fc γ RIIb, apenas expressos por APCs. Contudo, num estudo comparativo entre doentes com LES e indivíduos saudáveis, demonstrou-se que nos primeiros há maior expressão de recetores Fc γ e menor dos Fc γ RIIb, resultando num

desequilíbrio da imunidade que é garantida pelas DCs, com consequente ativação e expansão das células T auto-reativas [12,15].

As pDCs

Ao contrário das anteriores, as células dendríticas plasmocitóides apresentam reduzida capacidade APC, não tendo a função de ativar linfócitos T, uma vez que produzem uma quantidade pouco significativa de moléculas MHC-II e níveis quase indetetáveis de CD86.

Por outro lado, são especializadas na deteção de ácidos nucleicos, levando a respostas imunitárias contra este tipo de antigénios, pois possuem recetores citoplasmáticos capazes de reconhecer RNA (através de TLRs 7 e 8) e DNA (através de TLR9) [16]. Ao transportarem auto-DNA, reconhecido pelos recetores TLR-9, produzem IFN- α que induz a ativação das células B contra antigénios específicos, o que é observado pela elevada quantidade de IgGs circulantes em doentes com LES. Além disto, quando ativadas por CpG (sequência de citosina e guanina) reduzem a função dos linfócitos T_{reg} enquanto induzem a expansão de T_h17 pela secreção de IL-6, TGF- β e IFN- α , levando a uma produção exacerbada de citocinas pró-inflamatórias [12,15].

A elevada concentração de IFN- α em doentes com LES está não só relacionada com a doença propriamente dita como também com a sua severidade, verificando-se uma relação direta entre as reações verificadas nas articulações, na pele, a leucopenia e febre, características desta doença, com a concentração sanguínea de IFN- α . A capacidade de produção desta citocina em conjunto com a sua presença nos órgãos afetados, demonstra a importância das pDCs no desenvolvimento do lúpus[17].

As pDCs estão diretamente relacionadas com a perda de tolerância por parte das células imunitárias e consecutivamente com a resposta autoimune observada na doença de lúpus [15].

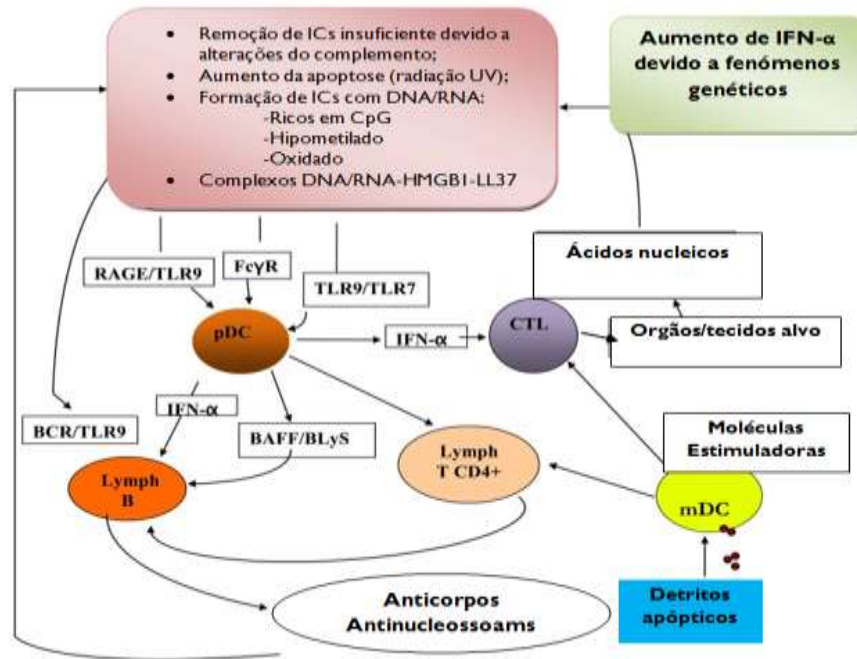


Ilustração 5^[1] - Perturbações na remoção de ICs devido a alterações do complemento e aumento da apoptose levam à formação de ICs com auto-DNA/RNA ricos em CpG, hipometilados e oxidados. Estes ICs podem ligar-se a outras moléculas como HMGB1 (libertada por células mortas) ou a péptidos antimicrobianos LL37, formando estruturas indutoras da ativação de pDCs por diversos mecanismos (FcγRIIA e/ou TLRs). Em indivíduos com LES, a atividade de IFN- α está aumentada devido a alterações genéticas, que podem ser detetadas através da técnica de *microarrays*.

Terapêutica Convencional

Como já descrito anteriormente, o diagnóstico do lúpus é complexo pela sua heterogeneidade, não só ao nível da sintomatologia, como também no seu decurso e severidade.

A estratégia mais utilizada para combater esta patologia recorre aos anti-inflamatórios não esteróides (AINEs), fármacos antimaláricos e glucocorticóides orais, acrescentando muitas vezes fármacos imunossupressores e citotóxicos. É importante referir que a ação das radiações UV assume um papel preponderante na exacerbação desta doença e uma vez que estes doentes apresentam elevada fotossensibilidade, o uso de protetor solar é imprescindível para a prevenção de lesões cutâneas [11,18].

Os glucocorticóides, como a prednisolona, são usados para reduzir a exacerbação da doença, uma vez que têm propriedades anti-inflamatórias. Contudo, é de salientar os diversos efeitos secundários que este grupo farmacológico apresenta [19].

A hidroxicloroquina, fármaco antimalárico, mostrou prevenir a exacerbação dos sintomas do lúpus bem como aumentar o tempo de vida dos doentes. Estes fármacos atuam por diversos mecanismos, contudo, é de destacar o facto de interferirem com a expressão de moléculas MHC-II e conseqüentemente com a apresentação de antígenos. Além disto, modulam a produção de citocinas pró-inflamatórias, a expressão de recetores TLR-9 e evitam a formação de ROS (espécies de oxigénio reativas) pelos leucócitos, ou seja, apresentam uma atividade antioxidante. Além disto, evitam a reabsorção de cartilagem mediada pela ação das citocinas [20].

A talidomida mostrou-se também muito eficaz, dadas as suas características imunomoduladoras. Contudo, é um fármaco que deve ser usado com muita precaução devido ao seu efeito teratogénico [21].

Imunossuppressores, como ciclofosfamida, aziotropina e metrotrexato interferem com a síntese dos ácidos nucleicos dos linfócitos B, pelo que são amplamente usados em reações mais severas da doença [22]. Contudo, é de ressaltar as potenciais infeções oportunistas que se podem verificar devido à imunossupressão provocada [11].

Um outro fármaco direcionado para esta doença e relativamente recente é o Belimumab - o Benlysta®, da GlaxoSmithKline, aprovado em 2013 pela *Food and Drug Administration* (FDA). Este é um anticorpo monoclonal com afinidade para o BAFF (fator de ativação de linfócitos B)[23], inativando-o sem afetar outras moléculas da família do TNF [11]. Além disto, bloqueia a ação de BlyS, uma proteína essencial para aumentar o tempo de sobrevivência dos linfócitos B. Assim, este fármaco constitui uma opção bastante eficaz na redução da resposta inflamatória e suas conseqüências [24].

Perspectivas Terapêuticas baseadas em Células Dendríticas

O facto do LES se manifestar de diferentes formas, em conjunto com a predisposição genética e epigenética, bem como o seu complexo mecanismo fisiopatológico, dificultam o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas [11]. Diversas terapias celulares têm sido descritas para o tratamento de LES, sendo dado enfoque específico às células dendríticas. Tal como referido anteriormente, estas células assumem um papel de excelência na regulação do sistema imunitário, e como tal constituem um alvo promissor no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o LES. As células dendríticas podem ser maduras/imunogénicas ou imaturas/tolerogénicas. Desta forma, as DCs imaturas irão promover tolerância específica para os antígenos, acarretando um benefício adicional na

terapêutica. Deste modo, o carregamento destas células com antígenos, como nucleossomas e histonas, mostrou induzir tolerância em células T CD4 e indiretamente em linfócitos B [15].

DCs provenientes de indivíduos com LES e diferenciados na presença de IL-4 e do fator de estimulação de colonização de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) demonstraram responder fracamente a moléculas como o TNF- α e lipopolissacarídeo (LPS), apresentando uma maturação celular comum à dos indivíduos saudáveis[15]. Posteriormente, foi avaliada a capacidade de indução de tolerância das DCs. Para o efeito, as DCs foram cultivadas na presença de IL-10 verificando-se que estas mantiveram a sua capacidade de induzir tolerância, o que foi comprovado pela reduzida taxa de proliferação de linfócitos T. No final deste estudo, pôde verificar-se que a capacidade de indução de tolerância de DCs de indivíduos com LES tratadas com IL-10 foi igual à de DCs obtidas a partir de indivíduos saudáveis, concluindo-se que a perda de tolerância verificada no lúpus deriva não de um defeito intrínseco das DCs destes indivíduos, mas sim do ambiente inflamatório característico da doença. Assim, é expectável que a manipulação destas células constitua uma potencial abordagem na terapêutica do LES [15,23].

Outro estudo enfatizou a importância das DCs na terapia do LES, administrando péptidos derivados de histonas nucleossômicas indutores de células dendríticas tolerogénicas (tolDCs). A administração destes péptidos a murinhos híbridos com um péptido indutor de lúpus (SNFI) desencadeou uma resposta benéfica, nomeadamente com melhoria da sintomatologia e com redução dos níveis de ANA. Este mecanismo parece estar relacionado com um aumento da produção TGF- β e com uma diminuição de IL-17 pelos linfócitos T. Concomitantemente, verificou-se também um aumento de células T_{reg}, que, como já referenciado, controlam a atividade dos linfócitos B e T_H [12].

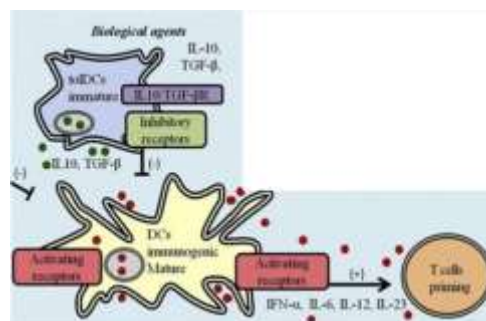


Ilustração 6 [12]– Agentes biológicos como IL-10 e TGF- β induzem tolDCs que produzem elevadas quantidades de citocinas anti-inflamatórias.

Conclusão

Enquanto profissional de saúde, o farmacêutico deverá conhecer em profundidade os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na etiologia do Lúpus Eritematoso Sistêmico, a diversidade de manifestações subjacentes a esta patologia e as estratégias terapêuticas disponíveis no mercado. Existem alguns fármacos de eleição na terapia do lúpus, tendo em conta as manifestações clínicas do doente. Contudo, não existem atualmente fármacos capazes de induzirem a remissão total da doença.

Os fármacos biológicos, como anticorpos, apresentam alguns resultados promissores. Por outro lado, a terapia celular baseada em células dendríticas, atualmente em estudo, tem demonstrado resultados experimentais positivos, nomeadamente na indução de melhorias sintomatológicas da doença bem como na potencial remissão desta.

Assim, torna-se crucial que a indústria farmacêutica continue a investir na investigação de novas estratégias terapêuticas que poderão contribuir para avanços no tratamento/cura do LES, uma doença com valores de incidência e prevalência cada vez mais relevantes.

Referências bibliográficas

- [1] SQUATRITO, D. ; EMMI, G.; SILVESTRI, E.; CIUCCIARELLI, L.; D'ELIOS, M. M.; PRISCO, D.; EMMI, L.; - Pathogenesis and potential therapeutic targets in systemic lupus erythematosus: from bench to bedside. **Auto- immunity highlights**. . ISSN 2038-0305. 5:2 (2014) 33–45. doi: 10.1007/s13317-014-0058-y.
- [2] **SIDA - A Defesa do Organismo sistema imunitário, sistema imunológico - site Roche SIDA VIH - www.roche.pt/sida** - [Em linha] [Consult. 10 ago. 2015]. Disponível em WWW:<URL:http://www.roche.pt/sida/sistema_imunitario/>.
- [3] **Componentes do sistema imunitário - Medipédia, Conteúdos de Saúde** - [Em linha] [Consult. 10 ago. 2015]. Disponível em WWW:<URL:http://www.medipedia.pt/home/home.php?module=artigoEnc&id=633>.
- [4] VARGAS, Karinna Soares; ROMANO, Marco Aurélio - Lúpus Eritematoso Sistémico: aspectos epidemiológicos e diagnóstico. **Revista Salus**. . ISSN 1980-2404. 3:1 (2011) 79–94.
- [5] **O que é o Lúpus (Lúpus Eritematoso Sistémico)? | Programa Harvard Medical School Portugal em WordPress.com** - [Em linha] [Consult. 17 jun. 2015]. Disponível em WWW:<URL:https://hmsportugal.wordpress.com/2011/02/28/o-que-e-o-lupus-lupus-eritematoso-sistemico/>.
- [6] BIERMANN, Mona H. C.; VEISSI, Susan; MAUERÖDER, Christian; CHAURIO, Ricardo; BERENS, Christian; HERRMANN, Martin; MUNOZ, Luis E.; - The role of dead cell clearance in the etiology and pathogenesis of systemic lupus erythematosus: dendritic cells as potential targets. **Expert review of clinical immunology**. . ISSN 1744-8409. 10:9 (2014) 1151–64. doi: 10.1586/1744666X.2014.944162.
- [7] **Lupus** - [Em linha] [Consult. 17 jun. 2015]. Disponível em WWW:<URL:http://www.lupus.pt/index.php/informacao/lupus>.
- [8] BORCHERS, Andrea T.; NAGUWA, Stanley M.; SHOENFELD, Yehuda; GERSHWIN, M. Eric; - The geoepidemiology of systemic lupus erythematosus. **Autoimmunity reviews**. . ISSN 1873-0183. 9:5 (2010) A277–87. doi: 10.1016/j.autrev.2009.12.008.
- [9] ENRÍQUEZ-MEJÍA, M. G. - Fisiopatología del lupus eritematoso sistémico. **Revista de Medicina e Investigación**. . ISSN 2214-3106. 01:01 (2013) 8–16.
- [10] FRANSEN, Justin H.; VAN DER VLAG, Johan; RUBEN, Jurjen; ADEMA, Gosse J.; BERDEN, Jo H.; HILBRANDS, Luuk B.; - The role of dendritic cells in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. **Arthritis research & therapy**. . ISSN 1478-6362. 12:2 (2010) 207. doi: 10.1186/ar2966.
- [11] DEMA, Barbara; CHARLES, Nicolas - Advances in Mechanisms of Systemic Lupus Erythematosus. **Discovery Medicine**. 17:95 (2014) 247–255.
- [12] MACKERN-OBERTI, Juan Pablo; LLANOS, Carolina; VEGA, Fabián; SALAZAR-ONFRAY, Flavio; RIEDEL, Claudia A.; BUENO, Susan M.; KALERGIS, Alexis M.; - Role of dendritic cells in the initiation, progress and modulation of systemic autoimmune diseases.

Autoimmunity reviews. . ISSN 1873-0183. 14:2 (2015) 127–39. doi: 10.1016/j.autrev.2014.10.010.

[13] MACANOVIC, M.; LACHMANN, P. J. - Measurement of deoxyribonuclease I (DNase) in the serum and urine of systemic lupus erythematosus (SLE)-prone NZB/NZW mice by a new radial enzyme diffusion assay. **Clinical and Experimental Immunology.** . ISSN 0009-9104. 108:2 (1997) 220–226. doi: 10.1046/j.1365-2249.1997.3571249.x.

[14] TADIE, Jean-Marc; BAE, Hong-Beom; JIANG, Shaoning; PARK, Dae Won; BELL, Celeste P.; YANG, Huan; PITTET, Jean-Francois; TRACEY, Kevin; THANNICKAL, Victor J.; ABRAHAM, Edward; ZMIJEWSKI, Jaroslaw W.; - HMGB1 promotes neutrophil extracellular trap formation through interactions with Toll-like receptor 4. **American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology.** . ISSN 1522-1504. 304:5 (2013) L342–9. doi: 10.1152/ajplung.00151.2012.

[15] LLANOS, Carolina; MACKERN-OBERTI, Juan Pablo; VEGA, Fabián; JACOBELLI, Sergio H.; KALERGIS, Alexis M.; - Tolerogenic dendritic cells as a therapy for treating lupus. **Clinical immunology (Orlando, Fla.).** . ISSN 1521-7035. 148:2 (2013) 237–45. doi: 10.1016/j.clim.2013.04.017.

[16] CRUVINEL, Wilson De Melo; MESQUITA JÚNIOR, Danilo; ARAÚJO, Júlio Antônio Pereira; CATELAN, Tânia Tiekko Takao; SOUZA, Alexandre Wagner Silva de; SILVA, Neusa Pereira da; ANDRADE, Luís Eduardo Coelho; - Immune system: Part I. Fundamentals of innate immunity with emphasis on molecular and cellular mechanisms of inflammatory response. **Revista Brasileira de Reumatologia.** . ISSN 0482-5004. 50:4 ([s.d.]) 434–447. doi: 10.1590/S0482-50042010000400008.

[17] WAHREN-HERLENIUS, Marie; DÖRNER, Thomas - Immunopathogenic mechanisms of systemic autoimmune disease. **Lancet.** . ISSN 1474-547X. 382:9894 (2013) 819–31. doi: 10.1016/S0140-6736(13)60954-X.

[18] **Moreira Jr Editora | RBM Revista Brasileira de Medicina** - [Em linha] [Consult. 12 ago. 2015]. Disponível em WWW:<URL:http://www.moreirajr.com.br/revistas.asp?fase=r003&id_materia=3506>.

[19] **Doping Prevention: Glucocorticosteróides** - [Em linha] [Consult. 13 ago. 2015]. Disponível em WWW:<URL:http://www.doping-prevention.sp.tum.de/pt/substances-and-methods/glucocorticosteroids/glucocorticosteroids.html>.

[20] RAINSFORD, K. D.; PARKE, Ann L.; CLIFFORD-RASHOTTE, Matthew; KEAN, W. F.; - Therapy and pharmacological properties of hydroxychloroquine and chloroquine in treatment of systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and related diseases. **Inflammopharmacology.** . ISSN 1568-5608. 2015). doi: 10.1007/s10787-015-0239-y.

[21] **European Medicines Agency - Find medicine - Thalidomide Celgene** - [Em linha] [Consult. 13 ago. 2015]. Disponível em WWW:<URL:http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000823/human_med_001090.jsp&mid=WVC0b01ac058001d124>.

- [22] SÁNCHEZ H, Yunchoy; CARVALLO V, Aurelio - Uso de metotrexato en pacientes con lupus eritematoso sistémico. **Revista médica de Chile**. . ISSN 0034-9887. 132:2 (2004) 195–201. doi: 10.4067/S0034-98872004000200009.
- [23] ABBAS, Abul K.; LICHTMAN, Andrew H. H.; PILLAI, Shiv - **Imunologia Celular e Molecular** [Em linha]. [S.l.] : Elsevier Health Sciences Brazil, 2012 [Consult. 12 ago. 2015]. Disponível em WWW:<URL:https://books.google.com/books?id=TqbISHVxAKAC&pgis=I>. ISBN 8535259724.
- [24] **European Medicines Agency - Find medicine - Benlysta** - [Em linha] [Consult. 12 ago. 2015]. Disponível em WWW:<URL:http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/002015/human_med_001466.jsp&mid=WVC0b01ac058001d124>.
- [25] CRISPÍN, José C.; VARGAS-ROJAS, Maria Ines; MONSIVÁIS-URENDA, Adriana; ALCOCER-VARELA, Jorge; - Phenotype and function of dendritic cells of patients with systemic lupus erythematosus. **Clinical immunology (Orlando, Fla.)**. . ISSN 1521-7035. 143:1 (2012) 45–50. doi: 10.1016/j.clim.2011.12.004
- [26] CHIEWCHENGCHOL, Direkrit; MURPHY, Ruth; EDWARDS, Steven W.; BERESFORD, Michael W.; - Mucocutaneous manifestations in juvenile-onset systemic lupus erythematosus: a review of literature. **Pediatric rheumatology online journal**. . ISSN 1546-0096. 13:2015) 1. doi: 10.1186/1546-0096-13-1.
- [27] CRISPÍN, José C.; LIOSSIS, Stamatis-Nick C.; KIS-TOTH, Katalin; LIEBERMAN, Linda A.; KYTTARIS, Vasileios C.; JUANG, Yuang-Taung; TSOKOS, George C.; - Pathogenesis of human systemic lupus erythematosus: recent advances. **Trends in molecular medicine**. . ISSN 1471-499X. 16:2 (2010) 47–57. doi: 10.1016/j.molmed.2009.12.005