

MÁRIO ABBUD FILHO

**MICROQUIMERISMO FETAL EM PACIENTES
COM LUPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO: UMA
CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO DA
FISIOPATOLOGIA DAS DOENÇAS AUTO-
IMUNES.**

São José do Rio Preto

2006

Mário Abbud Filho

**MICROQUIMERISMO FETAL EM PACIENTES
COM LUPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO: UMA
CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO DA
FISIOPATOLOGIA DAS DOENÇAS AUTO-
IMUNES**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto para obtenção do título de Doutor no Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Eixo Temático: Medicina Interna.

Orientadora: Profa. Dra. Eny Maria Goloni Bertollo

São José do Rio Preto

2006

Abbud-Filho, Mário

Microquimerismo fetal em pacientes com lupus Eritematoso Sistêmico: uma contribuição para o estudo da fisiopatologia das doenças auto-ímmunes / Mário Abbud Filho

São José do Rio Preto, 2006.

71 p.; 29,5cm

Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
Eixo Temático: Medicina Interna

Orientadora: Profa. Dra. Eny Maria Goloni Bertollo

1. Microquimerismo; 2. Lupus Eritematoso Sistêmico; 3. Doença Auto-Ímmune; 4. Nefrite lúpica; 5. Microquimerismo-fetal.

SUMÁRIO

Dedicatória.....	i
Agradecimentos.....	ii
Epígrafe.....	iii
Lista de Figuras.....	v
Lista de Tabelas.....	vi
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	vii
Resumo.....	x
Abstract.....	xii
1. Introdução.....	1
1.1. Considerações Gerais.....	2
1.2. Microquimerismo (MC): Conceito e Fisiopatologia.....	4
1.3. Doenças Auto-imunes (AI) e Microquimerismo fetal (MCF).....	6
1.4. Objetivos.....	8
2. Casuística e Método.....	10
2.1. Critérios de Inclusão e Exclusão das mulheres dos Grupos de Estudo e Controle.....	12
2.2. Análise Molecular.....	15
2.2.1. Extração de DNA a Partir de Sangue Total.....	15
2.2.2. Quantificação do DNA genômico.....	15
2.2.3. Reação em cadeia da polimerase em tempo real.....	16
2.3. Análise Estatística.....	22
3. Resultados.....	23
3.1. Avaliação do Equivalente Genômico masculino em LES.....	24
3.2. Equivalente genômico e tempo de doença.....	25
3.3. Equivalente genômico, idade materna ao nascimento do primeiro filho e número de gestações do sexo masculino.....	26
3.4. Equivalente genômico masculino e tempo de microquimerismo.....	29
3.5. Equivalente genômico, nefropatia lúpica e multiparidade.....	31
3.6. Equivalente genômico masculino, nefropatia lúpica e idade ao nascimento do primeiro.....	31

3.7. Influência das diferentes variáveis no número de cópias de DNA masculino.....	31
3.8. Sensibilidade e Especificidade da análise do número de cópias de DNA masculino.....	31
4. Discussão.....	35
5. Conclusão.....	48
6. Referências Bibliográficas.....	51
7. Anexos.....	66
8. Apêndices.....	69

Dedicatória

Para,

Mário e Espéria,

pais que além da vida me deram também a educação para vivê-la dignamente;

Patrícia,

esposa e mulher, parte indissolúvel do meu repertório existencial, há 26 anos me enriquecendo com lições de otimismo, serenidade e sabedoria de vida;

Ulisses e Vinicius,

filhos que cresceram tão depressa, assistindo me doutorar em erros; de quem espero netos para uma última oportunidade de reeditar meu afeto

Agradecimentos

Profa. Dra. Eny Maria Goloni Bertollo, orientadora que gentilmente aceitou acolher-me em seu laboratório, pela confiança na minha quase inacreditável promessa de concluir esta tese.

Profa. Dra. Érika Cristina Pavarino Bertelli e Dra. Maria Paula Sanches de Alvarenga, jovens e talentosas pesquisadoras, que trabalharam exaustivamente neste projeto.

Dra. Heloisa Cristina Caldas, entusiasta incansável e eficiente colaboradora dos projetos de pesquisa, cuja participação e trabalho foram fundamentais para o término deste trabalho.

Profa. Dra Maria Alice Sperto Ferreira Baptista e Dra. Ida Maria Maximina Fernades, colaboradoras competentes no trabalho diário do hospital, pelo incentivo e amizade.

Prof. Dr. Moacir Fernandes de Godoy, pelos conselhos, sugestões e revisão crítica do trabalho estatístico desta tese.

Celso Pereira Reis Filho cujo domínio da informática permitiu a elaboração do material gráfico e didático deste trabalho.

Prof. Dr. Roberto Acayaba de Toledo, chefe do Serviço de Reumatologia, pelo criterioso trabalho no recrutamento das pacientes para o estudo.

Aos meus amigos, que sempre acreditaram na minha capacidade para concluir esta tese.

Às mulheres que gentilmente acolheram a idéia de colaborarem para este estudo.

Epígrafe

“... A chama de uma idéia parece que cintila por um instante e logo se apaga, deixando o homem abalado, ao mesmo tempo feliz e apreensivo. Há muitos precedentes, é claro. Todo mundo conhece a história da maçã de Newton. Charles Darwin declarou que sua “Origem das Espécies” surgiu-lhe à mente, completa, em um segundo, tendo ele passado o resto da vida a procurar comprová-la. A teoria da relatividade ocorreu a Einstein no tempo que se leva para bater as mãos. É esse um dos maiores mistérios da mente humana, esse estranho salto indutivo. Subitamente, tudo se ajusta no lugar, as incongruências se relacionam, as dissonâncias se tornam harmônicas, os absurdos se revestem do mais amplo significado. Mas o salto elucidativo surge em meio ao solo fértil da confusão e quem o dá não está alheio à angústia...”

J. Steinbeck
“Doce Quinta-feira”

“Não sois obrigado a concluir a obra, mas tampouco estais livre para desistir dela.”

Aforismo judeu

“Há uma ignorância iletrada que precede o conhecimento, e uma ignorância doutoral que o sucede.”

Montaigne

Lista de Figuras

Figura 1.	Representação da polimerização das fitas do DNA e da atividade nucleolítica da enzima Taq polimerase durante uma etapa de extensão da reação em cadeia da polimerase (PCR).....	20
Figura 2.	Representação de amplificação e curva padrão para o gene SRY. (A) Cada curva de amplificação corresponde aos PCRs realizados com diferentes quantidades de DNA genômico conhecidas. O eixo X representa o número de ciclos de uma reação de PCR quantitativo e o Y representa o ΔRn , que é a intensidade de fluorescência sobre o <i>background</i> . (B) Representação do Ct (<i>threshold Cycle = número do ciclo inicial de amplificação</i>) inversamente proporcional ao logaritmo do número de cópias. O coeficiente de correlação (R^2) é 0,9969.....	21
Figura 3.	Correlação entre número de cópias de DNA masculino e tempo de doença lúpica.....	26
Figura 4.	Correlação entre número de cópias de DNA masculino e tempo de microquimerismo em mulheres saudáveis (A) e pacientes lúpicas (B)	30
Figura 5	Curva ROC para determinação do valor de corte ideal do número de células masculinas microquiméricas.....	34

Lista de Tabelas

Tabela 1.	Caracterização das 28 pacientes acometidas por LES quanto a idade cronológica na época do estudo, idade na época do diagnóstico de LES, idade ao nascimento do primeiro filho do sexo masculino e tempo desde o nascimento do 1º filho masculino.....	13
Tabela 2.	Caracterização das 18 voluntárias controle quanto à idade cronológica na época do estudo, idade ao nascimento do primeiro filho do sexo masculino e tempo desde o nascimento do 1º filho masculino.....	14
Tabela 3.	Dados demográficos das mulheres com LES e saudáveis (controle).....	25
Tabela 4.	Equivalente genômico (EqG) Masculino em mulheres com LES e saudáveis.....	28
Tabela 5.	Equivalente Genômico masculino em pacientes com nefropatia lúpica e número de filhos.....	33
Tabela 6.	Equivalente Genômico masculino, nefropatia lúpica e idade ao nascimento 1º filho.....	33

Lista de Abreviaturas e Símbolos

APC	- Célula apresentadora de antígeno
AA	- Auto-anticorpos
AI	- Doença auto-imune
AUC	- Área sob a curva
B7	- Estrutura de membrana B7, receptora da molécula CD28
CEP-FAMERP	- Comitê de ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
CD3	- Determinante celular 3
CD40	- Determinante celular 40 (molécula de co-estimulação)
CD40L	- “ligand” do determinante celular 40
CD20	- Determinante celular 20, molécula na membrana de linfócitos B
CD28	- Determinante celular 28 (molécula de co-estimulação)
CONEP	- Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
cGVHD	- Doença Crônica do Enxerto contra o Hospedeiro
Ct	- Threshold Cycle = número do ciclo inicial de amplificação
DNA	- Ácido desoxirribonucléico
EDTA	- Acetileno etilenodiaminotetracético
ES	- Esclerose Sistêmica
EqGm	- Equivalente genômico masculino
FAMERP	- Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
FMC	- Células fetais masculinas
FISH	- Hibridização in situ fluorescente
FUNFARME	- Fundação Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto

GVHD	- Doença do Enxerto contra o Hospedeiro
IL-2	- Interleucina-2
LES	- Lúpus Eritematoso Sistêmico
MC	- Microquimerismo
MCF	- Microquimerismo Fetal
MCM	- Microquimerismo maternal
MHC	- Complexo maior de histocompatibilidade
mL	- Mililitro
mM	- Milimol
N	- Número de indivíduos avaliados
NIAMS	- Instituto Nacional de Doenças de Pele, Músculo Esqueléticas e Artrite
NK	- Células Natural Killer
NS	Não significativa
Pb	- Pares de base
PCR	- Reação em cadeia da polimerase
PCR nested	- Reação em cadeia da polimerase do tipo “nested”
Pts	Pacientes
RNA	- Ácido ribonucléico
ROC	- <i>Receiver operating characteristics</i>
RT-PCR	- Reação em cadeia da polimerase em tempo real

TCR	- Receptor da célula T
Th1	- Linfócitos T auxiliares tipo 1
Th2	- Linfócitos T auxiliares tipo 2
TMC	- Tempo de microquimerismo
Treg	- Linfócito/célula T regulatória
Ts	- Linfócitos T supressor
TCR	- Receptor de linfócitos T
U/μL	- Unidades por microlitro
UPGEM	- Unidade de Pesquisa em Genética e Biologia Molecular
μL	- Microlitro
vs	- <i>Versus</i>

Resumo

Racional. Lupus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença auto-imune grave com fisiopatologia ainda desconhecida. Na gestação o trânsito bidirecional que ocorre entre as células da mãe e feto causa o aparecimento do microquimerismo fetal (MCF). Existem evidências que a persistência do MCF poderia causar ou exacerbar doença auto-imune. **Objetivo.** Determinar a frequência de ocorrência de MCF em pacientes (pts) acometidas pelo LES e avaliar o efeito da gestação e de características epidemiológicas do LES sobre o MCF. **Pacientes e Métodos.** Reação em cadeia da polimerase em tempo real para seqüências de DNA específicas do cromossomo Y foi a técnica usada para detectar células fetais masculinas (**fmc**) no sangue de 46 mulheres selecionadas conforme os critérios: 1- história com presença de pelo menos uma gravidez do sexo masculino; 2- ausência de abortos, transfusão sanguínea ou transplantes prévios. Foram ainda obtidas informações sobre tempo decorrido desde o nascimento do primeiro filho (tempo de microquimerismo), número de gestações do sexo masculino, idade ao nascimento do primeiro filho, tempo de diagnóstico de LES e evidências de nefrite lúpica. **Resultados.** Vinte oito pts e 18 mulheres saudáveis foram incluídas no estudo. O número de fmc/ml de sangue materno foi maior nas pts com LES do que no grupo controle (252 ± 654) vs ($2,13 \pm 3,7$) fmc/ml; ($p=0,029$). Regressão linear múltipla mostrou significante correlação positiva entre o número de fmc/ml e o tempo de doença lúpica ($p=0,027$). Enquanto nas pts com LES a quantidade de fmc/ml aumentou progressivamente com o tempo de microquimerismo (≤ 10 anos = 33 ± 65 fmc/ml; 11 – 15a = 140 ± 382 ; $>15a = 395 \pm 860$ fmc/ml; $p=0,003$) nas mulheres saudáveis ocorreu uma leve redução nos mesmos intervalos de tempo (respectivamente $2,55 \pm 4,34$; $2,66 \pm 3,79$; $1,64 \pm 3,81$ fmc/ml; $p= NS$). MCF não foi associado com o

número de gestações do sexo masculino nem com a idade ao nascimento do primeiro filho. Maior número de fmc/ml foi detectado nas pacientes sem nefrite lúpica quando comparado com as pts com doença renal (388 ± 827 vs $95,5 \pm 338$ fmc/ml; $p=0,019$).

Essa observação também foi notada entre pts sem nefrite que pariram o primeiro filho até 18 anos de idade (355 ± 623 vs $0,23 \pm 0,22$ fmc/ml respectivamente; $p=0,028$).

Conclusões. A quantidade de células fetais microquiméricas é maior entre as pts com LES e o número dessas células aumenta com decorrer do tempo de doença e do tempo de microquimerismo. Essas observações sugerem que as células fetais masculinas podem proliferar, aumentando nas pts com LES e diminuindo ou mesmo desaparecendo nas mulheres saudáveis. Ainda é possível que o FMC não tenha apenas um papel deletério no LES podendo produzir benefícios nos casos de nefrite lúpica.

Palavras-Chave: 1. Microquimerismo; 2. Lupus Eritematoso Sistêmico; 3. Doença auto-imune; 4. Nefropatia lúpica ; 5. Microquimerismo fetal.

Abstract

Background. Systemic lupus erythematosus (LES) is a serious systemic autoimmune disease of which the pathogenesis remains elusive. Bi-directional cell traffic during pregnancy gives rise to fetal microchimerism (FMC). There is accumulating evidence suggesting that FMC can cause or exacerbate autoimmunity. **Objective.** To determine the incidence of FMC in LES patients (pts) and to assess the effect of pregnancy and some epidemiological characteristics of LES on the FMC. **Patients and Methods.** Real time polymerase chain reaction for specific Y chromosome sequences was used to detect fetal male cells (**fmc**) in the peripheral blood of 46 women selected according to this criteria: 1- pregnancy of at least one male offspring; 2- absence of history of previous transfusions, miscarriages or transplants. Information was obtained on the age of the mother at first male birth, number of male offspring, time since birth of the first son (time of microchimerism), time since disease diagnosis and renal involvement of LES. **Results.** Twenty eight pts and 18 healthy women were included in the study. The number of fmc/ml of maternal blood was higher among LES pts than in control group (252 ± 654 vs $2,13 \pm 3,7$ fmc/ml; $p= 0,029$). Multiple linear regression did show a strong positive correlation between the number of fmc/ml and the length of the disease ($p= 0,027$). The number of male cells also increase with duration of microchimerism in LES pts (≤ 10 years = 33 ± 65 fmc/ml; 11 - 15y = 140 ± 382 ; >15 y = 395 ± 860 fmc/ml; $p= 0,003$) while slightly decreasing among healthy women during the same time periods ($2,55 \pm 4,34$; $2,66 \pm 3,79$; $1,64 \pm 3,81$ fmc/ml; $p= NS$). FMC was not associated with this number of male births and was also not associated with the mother's age at the birth of the first son. Higher numbers of fmc/ml were detected among pts without nephropathy when compared to those of pts with lupus nephritis (388 ± 827 vs $95,5 \pm 338$ fmc/ml;

p=0,019). This same observation was made in pts ≤ 18 years old at first male birth (355 ± 623 vs $0,23 \pm 0,22$ fmc/ml respectively; p= 0,028). **Conclusions.** Our data demonstrates that the number of fmc/ml is higher in LES pts than in healthy women and it does increase with length of disease and duration of microchimerism. These results strongly suggest that in LES pts fetal microchimeric cells do proliferate with time but decrease or tend to disappear in healthy women. It is possible that FMC may not be totally detrimental to the host because it may provide some benefits in lupus nephritis cases.

Key-Words: 1. Microchimerism; 2. Systemic lupus erythematosus; 3. autoimmune disease; 4. lupus nephropathy; 5. Fetal microchimerism.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Considerações Gerais.

Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é uma doença extremamente complexa cuja descrição inicial atribuída a Hipócrates foi feita entre 460-370AC e denominada “herpes esthiomenos”. Essa doença considerada “classicamente” como de etiologia auto-imune, possui nome latino enigmático – Lupus, cujo significado é lobo, e eritematoso como referência à cor vermelha das ulcerações encontradas na face dos pacientes. Segundo a tradição, consta que essas ulcerações assemelhavam-se à mordidas de lobos ou que o eritema facial desenvolvido conferia aos pacientes aparência desses animais ⁽¹⁾.

Durante séculos o LES foi empregado para descrever principalmente lesões cutâneas como aquelas feitas por Paracelso (1493-1541) e Moritz Kaposi (1872-1902). Entretanto, o acometimento sistêmico da doença foi reconhecido somente em 1851 quando Pierre Cazenave descreveu 3 diferentes formas do então batizado “Lupus Arythemateux”: 1- Lupus que destrói a superfície dos tecidos; 2- Lupus que destrói em profundidade; 3- Lupus sem ulcerações mas acompanhado de hipertrofia das partes acometidas ⁽¹⁾.

Kaposi foi o primeiro a alertar para a gravidade da doença lúpica e entre 1895 e 1903 Willian Osler publicou três trabalhos que expandiram o conceito do acometimento sistêmico e das graves complicações do LES ⁽¹⁾.

Desde então o conhecimento clínico patológico da doença evoluiu lentamente, principalmente em virtude da grande diversidade de formas clínicas pelas quais pode manifestar-se, afetando qualquer órgão do corpo dificultando com isso a realização de ensaios clínicos. Ainda, em consequência desse fato, a indústria farmacêutica parece relutar para realizar investimentos na pesquisa de novas drogas para o tratamento do

LES, pois a doença poderia simular efeitos adversos da nova droga e comprometer seu desenvolvimento comercial ⁽²⁾.

Entretanto, a partir do início do século 21, o avanço das técnicas de biologia molecular e do conhecimento dos mecanismos regulatórios do sistema imunológico, trouxeram esperança para possibilidade de identificação de novas pistas que pudessem ajudar a desvendar a complexa fisiopatogenia do LES. Várias organizações não-governamentais além do próprio Instituto Nacional de Doenças de Pele, Músculo Esqueléticas e Artrite (NIAMS) dos EUA, demonstrando interesse sobre a doença, destinaram em 2002 cerca de 110 milhões de dólares para pesquisas referentes ao LES ⁽²⁾.

A prevalência da doença não é bem conhecida, mas estima-se que seja de 40 para 100.000 habitantes norte-americanos ou habitantes do norte da Europa. Existe ainda variação da prevalência conforme diferentes grupos étnicos e regiões geográficas: 1/250 negros americanos, 1/100 chineses e 1/4300 mulheres neozelandesas. Cerca de 80% dos casos de LES ocorrem durante o período de vida fértil de mulheres jovens e a doença apresenta maior gravidade na raça negra. A prevalência em crianças e adultos idosos é de 1/100.000, com proporção de 3 mulheres para cada homem ⁽³⁾.

O LES é uma doença auto-imune que se caracteriza pelo acometimento de múltiplos órgãos, da pele às mucosas, produzindo lesões graves no sistema nervoso central e rins. Critérios para distinguir a doença lúpica de outras doenças do tecido conectivo foram estabelecidos pelo Colégio Americano de Reumatologia de modo a tornar possível diagnosticar a doença de forma confiável e não somente baseada em dados clínicos ⁽⁴⁾.

A presença de títulos elevados de anticorpos dirigidos contra componentes nucleares (fator anti-núcleo), quantidade elevada de complexos imunológicos circulantes e consumo de complemento são as principais características da doença ⁽⁵⁾. Fatores genéticos e ambientais também têm sido implicados na gênese do LES e foram revisados recentemente ^(6,7). Deficiência no processo de depuração de células mortas, alteração na produção de Interleucina-2 (IL-2) e mimetização molecular induzida por infecções são outras hipóteses formuladas que têm adquirido crescente importância na fisiopatogenia do LES ^(8,9,10).

Entretanto a doença ainda permanece como sendo de etiologia multifatorial e portanto, esses fatores não estão bem determinados.

1.2. Microquimerismo (MC): Conceito e Fisiopatologia.

O termo “microquimerismo” foi utilizado inicialmente por Liegeois e cols em publicação que descrevia a sobrevivência prolongada de pequena quantidade de células da medula óssea do doador, em relação às do receptor, em camundongos de laboratório ⁽¹¹⁾.

Após quatro anos, os mesmos autores demonstraram a presença de células fetais alogênicas em tecidos materno, durante e longo tempo após a gestação ⁽¹²⁾.

Desde então, MC tem sido descrito como sendo resultado de transfusões sanguíneas ⁽¹³⁾, transplante de órgãos ⁽¹⁴⁾, gemelaridade ⁽¹⁵⁾ e, sobretudo devido ao trânsito de células que ocorre entre mãe e feto durante a gestação. A gravidez não necessariamente precisa ser completada, pois MC foi documentado em 60% de mulheres com abortos espontâneos recorrentes ⁽¹⁶⁾.

A descoberta desse “tráfego” celular bidirecional, entre mãe e feto, suscitou questões relativas ao papel desempenhado por essas células “quiméricas” e à sua

persistência no hospedeiro, tanto em situações de doenças como em indivíduos saudáveis.

Atualmente, sabe-se que durante a gestação humana células fetais entram na circulação materna e podem persistir no sangue ou nos tecidos da mãe durante décadas^(17,18). Essas células são em pequena quantidade, com frequência estimada entre 2-6 células/mL de sangue materno⁽¹⁹⁾. Além disso, o número dessas células pode aumentar no término da gravidez ou em situações de anormalidades da mãe ou do feto^(20,21).

Seqüências de DNA do cromossomo Y podem ser detectadas no sangue materno a partir da 6ª semana de gestação de fetos masculinos e análise quantitativa desse trânsito celular demonstrou que a transferência de células e de DNA, embora pequena, ocorre significativamente em maior quantidade no sentido do feto para a mãe. A presença e a persistência dessa reduzida população de células, ou de pequenas quantidades de DNA fetal no corpo materno é chamada de “microquimerismo feto maternal ou fetal”^(22,23).

Vários tipos de células fetais têm sido identificadas no sangue materno: trofoblastos, células tronco mesenquimais, linfócitos T e B e células hematopoiéticas progenitoras tipo CD34+ e CD34+ CD38+⁽²⁴⁾. Bianchi e cols demonstraram em 1996 que células fetais, com características de células tronco hematopoiéticas (CD34+ e CD34+ CD 38-) obtidas do sangue materno, podiam persistir na circulação de mães saudáveis, sem terem recebido transfusões sanguíneas, durante períodos de até 27 anos após o parto⁽¹⁸⁾. Ciaranfi e cols, estudando 62 mulheres após o parto de neonatos do sexo masculino, demonstraram que mais de 50% delas apresentavam linfócitos masculinos circulantes dois anos após o parto, e em alguns casos o cromossomo Y foi ainda detectado cinco anos após nascimento de crianças do sexo masculino⁽²⁵⁾. A

persistência de células fetais com características CD34+ foi também confirmada por Guetta e cols em 10 mulheres que haviam parido um ou mais meninos há 4-21 anos ⁽²⁶⁾.

A presença de DNA fetal masculino no sangue de mães de crianças masculinas foi também investigada por Adams e cols que relataram a presença de DNA masculino em 34% da população estudada, sendo que nas frações de sangue enriquecidas com células CD34+ a positividade para presença do DNA aumentou para 48% ⁽²⁷⁾.

Esses relatos reforçaram a idéia que a gestação pode transformar a mulher em uma quimera, a figura mitológica de um animal dotado de um corpo com duas cabeças, de leão e de cabra e cuja cauda era uma serpente. Essa figura, considerada como do sexo feminino embora possuindo a juba da cabeça leonina, significa a co-existência de três espécies diferentes de animais em um só corpo e tem várias conotações, uma delas muito conhecida em transplante de órgãos, a da “tolerância imunológica”. Portanto, o termo microquimerismo é proveniente dessa conotação mitológica que simboliza um indivíduo que hospeda pequenas quantidades de células, geneticamente distintas e com origens diferentes em sua circulação ⁽¹¹⁾.

1.3. Doenças Auto-ímmunes (AI) e Microquimerismo Fetal (MCF)

As doenças auto-ímmunes constituem um grupo heterogêneo de alterações patológicas onde a principal característica dessas doenças é a predileção para acometimento de pacientes do sexo feminino e cuja maior incidência ocorre nos anos imediatos após a gestação ⁽²⁸⁾. Além disso, algumas doenças auto-ímmunes como a Esclerose Sistêmica (ES) apresentam similaridade com o quadro clínico que ocorre após transplante de medula óssea, denominado Doença Crônica do Enxerto contra o Hospedeiro (cGVHD) ⁽²⁹⁾.

Essas observações, associadas ao conhecimento do tráfego celular bidirecional de células que persistem no hospedeiro até décadas após a gestação, sugeriram o possível envolvimento do MCF na patogênese das doenças AI ⁽²⁴⁾.

Em 1989 foi proposto pela primeira vez que o MCF poderia estar envolvido na gênese da ES sendo postulado que “esclerodermia era um tipo de GVHD crônica resultante da transferência transplacentária de células entre mãe e feto”, e ainda que “essa condição poderia levar a um estado de microquimerismo e ativação dessas células causando a doença do tipo GVHD crônica” ^(30,31).

Em 1996 Nelson e cols realizaram o primeiro estudo prospectivo para avaliar a presença de MCF em pacientes com doença AI. Nesse estudo os autores detectaram níveis de DNA masculino significativamente mais elevados no sangue de mulheres com Esclerose Sistêmica (ES), quando comparados aos níveis de DNA obtidos de mulheres saudáveis que também haviam parido pelo menos uma criança do sexo masculino ⁽³²⁾.

Posteriormente outros estudos corroboraram a correlação positiva entre MCF em pacientes com ES ^(33,34). Desde então, a presença de MCF tem sido associada ao desenvolvimento de várias doenças auto-imunes, além da ES: Doença de Graves, Tireoidite de Hashimoto, Síndrome de Sjogren e Cirrose Biliar Primária ⁽³⁵⁻³⁸⁾.

O papel relevante das células quiméricas e do tráfego bidirecional no processo de auto-agressão foi reforçado por evidências de outros estudos que demonstraram a presença de outros tipos de quimerismo, o “microquimerismo materno”, nos tecidos de adultos jovens acometidos por miopatia inflamatória juvenil idiopática, ES, e LES ^(39,40,41).

Embora o LES seja uma clássica doença auto-imune, estudos relacionando o MCF ao LES humano são raros e restritos à poucos relatos de casos isolados ^(42,43).

Meta-análise recente de microquimerismo identificou 42 trabalhos publicados, sendo 23 referentes a transplantes de órgãos sólidos e 19 a doenças auto-imunes⁽⁴⁴⁾. O estudo avaliou a literatura médica no período de janeiro 1966 e dezembro de 2003, utilizando os unitêrmos: microquimerismo no sangue periférico, quimerismo (micro ou misto), gestação, tecido, doença auto-imune, transplante e quimera. Apenas dois trabalhos sobre LES são citados pela meta-análise, um deles referente à dados preliminares publicados pelo nosso grupo^(45,46).

Recentemente, Mosca e cols, avaliando 22 pacientes com LES e 24 mulheres saudáveis, não encontraram diferença significativa do número de células masculinas microquiméricas entre os dois grupos. Entretanto, pacientes lúpicas com doença renal ativa apresentaram números significativamente maiores de células microquiméricas⁽⁴⁷⁾.

1.4. Objetivos

Considerando que: a) as doenças auto-imunes afetam cerca de 5% da população dos países ocidentais; b) é um grupo de doenças graves com patogênese multifatorial e pouco conhecida; c) o microquimerismo fetal decorrente da gravidez é um fenômeno atualmente comprovado e cuja detecção foi tornada possível em virtude do avanço das técnicas de biologia molecular; d) evidências na literatura médica sugerem associação do MCF com doenças auto-imunes; e) o número de publicações envolvendo LES e MCF é muito pequeno e com resultados controversos; o presente trabalho teve como objetivo avaliar a presença do MCF em pacientes acometidas pelo LES, investigar os efeitos de variáveis epidemiológicas do LES sobre as células microquiméricas e tentar

estabelecer associações entre variáveis próprias da gestação, gravidade da doença lúpica (nefropatia) e o MCF.

2. CASUÍSTICA E MÉTODO

2. CASUÍSTICA E MÉTODO

De acordo com as Normas Reguladoras de Pesquisa em Seres Humanos, Resolução 196/96 do Ministério da Saúde, o presente projeto foi encaminhado ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, São Paulo (CEP-FAMERP) e para a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) de Brasília (DF). As pacientes foram incluídas no estudo após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice 1), aprovado pelo CEP (protocolo sob nº 0418/2000, parecer nº 0007/2000) (Anexo 1) e CONEP (protocolo sob nº 25000.016530-00 e registro sob nº 1529) (Anexo 2).

Foram inicialmente avaliadas um total de 60 mulheres, sendo 33 pacientes acometidas de LES (grupo LES) e 27 saudáveis (controle).

Trinta e três pacientes foram recrutadas nos ambulatórios de Reumatologia e de Nefrologia do Hospital de Base da Fundação Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, enquanto que para constituição do grupo controle foram recrutadas 27 mulheres voluntárias saudáveis, no campus da Faculdade, no mesmo período de tempo, sem história prévia de doença reumatológica ou osteomuscular. Do grupo inicial com LES foram excluídas cinco pacientes por história provável de aborto (n=2), ou de transfusão anterior (n=2) e um caso em consequência do material colhido ser classificado como inadequado para análise de DNA. Do grupo controle foram excluídas nove mulheres em virtude de queixas clínicas de doença reumatológica/osteomuscular (n=4), material para análise de DNA inadequado (n=3), história de aborto (n=1) e transfusão sanguínea anterior (n=1).

Todas aceitaram participar voluntariamente do estudo após solicitação esclarecimento médico e leitura do termo de consentimento.

A caracterização demográfica das mulheres estudadas no que se refere aos dados como, idade cronológica na época do estudo, idade na época do diagnóstico de LES, idade ao nascimento do primeiro filho do sexo masculino e o tempo desde o nascimento do primeiro filho está apresentada nas tabelas 1 e 2.

2.1. Critérios de Inclusão e Exclusão das mulheres dos Grupos de Estudo e Controle.

Os critérios comuns usados para a inclusão em ambos os grupos foram: a) ter parido pelo menos uma criança do sexo masculino; b) possuir história confirmada de ausência de abortos prévios (espontâneos ou provocados); c) ter história confirmada de ausência de transfusão sanguínea anteriormente.

As pacientes com diagnóstico de LES foram incluídas com base nos critérios revisados do Colégio Americano de Reumatologia de 1997 ⁽⁴⁾. Nefropatia lúpica foi caracterizada através de alterações do sedimento urinário semi-quantitativo (proteinúria > 1+, hemácias > 5000/mL e/ou creatinina sérica \geq 1,5mg/dL, e/ou depuração da creatinina sérica \leq 80mL/min/1,73m², e/ou proteinúria 24h > 200mg, observados em pelo menos duas avaliações ambulatoriais consecutivas.

Os dados das pacientes foram obtidos de seus prontuários médicos e todas as mulheres foram entrevistadas por profissionais treinados para dirigir o questionário visando obter os dados epidemiológicos necessários para cumprimento dos critérios de exclusão/inclusão no estudo (Apêndice 2).

Tabela 1. Caracterização das 28 pacientes acometidas por LES quanto à idade cronológica na época do estudo, idade na época do diagnóstico de LES, idade ao nascimento do primeiro filho do sexo masculino e tempo desde o nascimento do 1º filho masculino.

PACIENTES (código do Lab) n=28	IDADE (anos)	IDADE (anos) NO DIAGNÓSTICO DE LES	IDADE (anos) AO NASCIMENTO DO 1º FILHO MASCULINO	TEMPO (anos) DESDE O NASCIMENTO DO 1.º FILHO MASCULINO
1	52	46	36	15
2	45	38	27	18
4	50	47	36	14
6	43	39	18	25
7	32	25	24	8
10	40	30	25	15
11	42	34	21	21
12	44	35	19	25
13	39	32	18	20
14	37	21	18	19
15	63	62	21	42
16	33	24	17	15
17	53	52	27	26
18	45	38	29	17
19	35	27	20	15
20	43	42	20	23
21	31	28	17	13
22	33	24	22	11
23	42	39	27	15
24	32	26	20	12
26	36	36	28	8
27	31	29	28	3
28	38	30	27	11
29	38	31	18	19
30	66	53	36	30
31	59	36	24	34
32	23	22	18	4
33	38	38	17	21
<u>Média</u>	41,5	35,1	23,5	17,8
Desvio Padrão	10,0	10,0	5,9	8,6

Tabela 2. Caracterização das 18 voluntárias saudáveis quanto à idade cronológica na época do estudo, idade ao nascimento do primeiro filho do sexo masculino e tempo desde o nascimento do 1º filho masculino.

VOLUNTÁRIAS SAUDÁVEIS (código do Lab) n=18	IDADE (anos)	IDADE (anos) AO NASCIMENTO DO 1.º FILHO	TEMPO (anos) DESDE O NASCIMENTO DO 1.º FILHO
1	44	32	12
4	36	33	2
5	40	27	12
8	36	32	4
9	39	24	14
10	41	24	17
12	36	19	16
13	44	32	11
14	40	32	7
16	45	24	21
17	36	24	12
21	46	25	20
22	58	33	25
23	41	24	16
25	40	25	15
26	51	24	27
27	51	22	29
28	59	24	34
Média	42,6	26,2	15,8
Desvio Padrão	6,3	4,2	8,4

2.2. Análise Molecular.

A análise molecular no sangue periférico e das biópsias renais das pacientes com lúpus e do grupo controle procedeu-se como se segue:

2.2.1. Extração de DNA a Partir de Sangue Total.

O DNA genômico foi extraído a partir de sangue periférico segundo a técnica de Abdel-Rahman et al.⁽⁴⁸⁾. A amostra de sangue periférico foi colhida em tubos já contendo anticoagulante (EDTA) e os linfócitos foram isolados com auxílio de Ficoll-Paque Plus (Amersham Biosciences) (gradiente de densidade). Aos linfócitos isolados, foram adicionados: 3 mL de *Tampão de Lise* (TrisHCl 10 mM, NaCl 400 mM, Na₂EDTA 2 mM); 0,2 mL de SDS (Sodium dodecyl sulfate) 10 %; 0,5 µL de proteinase K (20 mg/mL); 40 µL de RNase A (20mg/mL). Em seguida, o tubo foi incubado *overnight* a 37°C, para a digestão protéica. Após incubação, foi acrescentado 1 mL de NaCl 6 M (em solução saturada) e o tubo agitado no *vórtex* até a solução espumar. O material permaneceu em gelo por 15 minutos, foi novamente agitado e, então, centrifugado por 15 minutos a 2.000 rpm. Após centrifugação, o tubo recebeu 10 mL de etanol 100% gelado e foi invertido cuidadosamente até a precipitação do DNA. O DNA precipitado foi lavado com etanol 70 % e mantido em temperatura ambiente para secar. Posteriormente, foi ressuspenso em água *Mili-Q* autoclavada e armazenado a -20°C para posterior amplificação.

2.2.2 Quantificação do DNA genômico.

A quantificação do DNA genômico foi primeiramente realizada por espectrofotometria, que consiste na determinação da concentração do DNA pela

absorbância do comprimento de onda de 260nm. Para tanto, o DNA foi previamente diluído em água (4 μ L da amostra de DNA para 396 μ L de água ultrapura autoclavada) e o espectrofotômetro calibrado para 260nm. No espectrofotômetro, o valor da concentração é dado em ng/ μ L. O grau de pureza foi determinado através do cálculo de densidade óptica (OD) a 260 e 280nm, onde a amostra é considerada pura quando a relação OD260/OD280 é igual a 1,8.

Posteriormente, a concentração do DNA genômico foi confirmada em gel de agarose com o auxílio do software Kodak 1D, versão 3.5. Nesse caso, o DNA (1 μ L), diluído em 8 μ L de água ultrapura autoclavada e 1 μ L de corante, foi aplicado em gel de agarose 1% e submetido a 100 Volts em tampão TEB 1X por 50 minutos. Após esse período o gel foi corado com brometo de etídeo (concentração final 0,5 μ g/mL) por 10 minutos e observado em luz ultravioleta. Para a determinação da concentração, o gel foi analisado no software Kodak que consiste em comparar a intensidade da banda do DNA genômico com aquelas das de um marcador de peso molecular previamente estabelecido.

Após a leitura no espectro e a análise do gel, a concentração das amostras de DNA genômico foi ajustada para 50ng/ μ L.

2.2.3 Reação em cadeia da polimerase em tempo real

O DNA fetal foi quantificado pela reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real utilizando um aparelho de detecção imediata (SDS-7700 Perkin-Elmer). O método de PCR quantitativo em tempo real mede o acúmulo de produtos de PCR por meio de uma sonda fluorogênica duplamente marcada. Utilizando a mesma

concentração de DNA genômico para cada amostra, é possível medir a quantidade de cópias de um determinado gene em cada uma delas, com *primers* e sonda específicos⁽⁴⁹⁾.

A reação de PCR quantitativo baseia-se na atividade nucleolítica 5' da Taq polimerase. Esta enzima cliva a sonda durante o processo de amplificação, levando a um aumento da fluorescência do corante presente na posição 5' (*Reporter*) que estava inicialmente suprimida por transferência de energia pelo corante da posição 3' (*quencher*). Após a clivagem, que só ocorre quando a sonda é hibridizada com a seqüência alvo, a polimerização da cadeia é concluída (Figura 1). Esse processo ocorre a cada ciclo e não interfere com o acúmulo exponencial do produto⁽⁵⁰⁾.

Para quantificar o DNA fetal masculino presente em cada amostra de DNA genômico materno utilizou-se sondas para o gene *SRY*, localizado no cromossomo Y. Todas as amostras foram analisadas em duplicata. Os resultados obtidos foram convertidos em número de cópias gênicas por meio de uma curva padrão produzida com diluições seriadas de DNA genômico de um homem saudável, utilizando-se um fator de conversão de 6.6 pg de DNA por célula⁽⁵¹⁾ (Figura 2). O fator de conversão de 6.6 pg de DNA por célula foi usado para expressar os resultados como equivalente genômico de células masculinas por mililitro de plasma materno ou por milhão (10^6) de células maternas⁽⁵¹⁾. No presente trabalho serão utilizados como sinônimos de equivalente genômico de células masculinas os termos: número de cópias de DNA masculino, número de células fetais masculinas, número de células microquiméricas.

A quantificação é baseada nos valores de Ct (*threshold Cycle* = número do ciclo onde a amostra iniciou sua amplificação), que é inversamente proporcional ao logarítmico do número de cópias e, determinada com base na equação da reta obtida na

curva padrão (Figuras 2 e 3), que é gerada em escala logarítmica. O número de cópias é então convertido em número real (ou seja, sem escala logarítmica).

A reação de PCR para o gene *SRY* foi realizada em um volume de 25 μ L contendo 1 μ L de DNA materno (50ng), 1x universal mastermix (PE Biosystems Warrington, Cheshire, UK), 1pmol/ μ L de cada *primer* e 0.5 pmol/ μ L de sonda. Em cada placa de amplificação foram realizadas três reações controles para excluir a possibilidade de contaminação das soluções com DNA, na qual foram adicionados todos os reagentes exceto o DNA molde. Foi também realizada a amplificação de DNA de seis mulheres saudáveis sem história gestacional ou com história gestacional feminina para controle negativo de amplificação.

Para o gene da β -actina, a reação de PCR foi também realizada em um volume de 25 μ L contendo 1 μ L de DNA materno (50ng), 1x universal mastermix (PE Biosystems Warrington, Cheshire, UK), 0.3 μ M de cada *primer* e 0.2 μ M de sonda.

Ambos os genes (*SRY* e β -actina) foram submetidos a um programa de amplificação que compreendeu uma primeira etapa de 2 minutos a 50°C para a atividade da *AmpErase*, seguida de uma etapa de 10 minutos a 95°C e de 40 ciclos de 15 segundos a 95°C para desnaturação do DNA e 60 segundos para anelamento dos *primers* e extensão das cadeias em temperatura de 60°C.

A seqüência dos *primers* e a sondas foram desenhados com o auxílio do software Primer Express (Perkin Elmer) e seguem abaixo:

Seqüências dos primers (<i>SRY</i>)		Fragmento amplificado
<i>SRY</i> -sense	5' CGCATTTCATCGTGTGGTCTC 3'	73 pares de base (pb)
<i>SRY</i> -anti	5' CTCTGAGTTTCGCATTCTGGG 3'	

Seqüência da sonda (SRY)

VIC -5' CGATCAGAGGCGCAAGATGGCTCTAG 3' - TAMRA

Seqüências dos primers (β -actina)		Fragmento amplificado
<i>SRY</i> -sense	5' TCACCCACACTGTGCCCATCTACGA 3'	295 pb
<i>SRY</i> -anti	5' CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATGG 3'	

Seqüência da sonda (β -actina)

FAM -5' ATGCCC- X (TAMRA) – CCCCATGCCATCCTTGCGT 3'

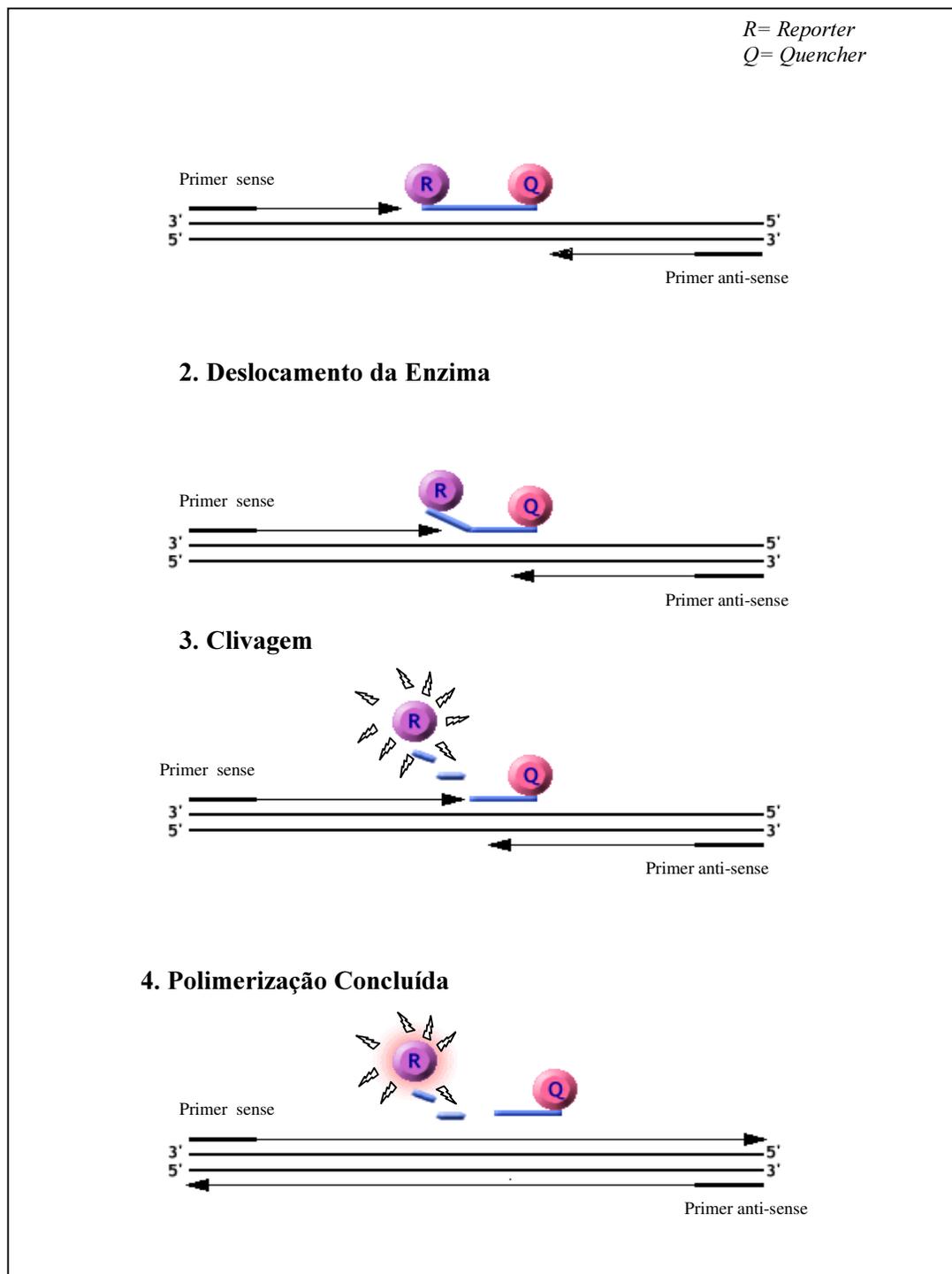


Figura 1. Representação da polimerização das fitas do DNA e da atividade nucleolítica da enzima Taq polimerase durante uma etapa de extensão da reação em cadeia da polimerase (PCR).

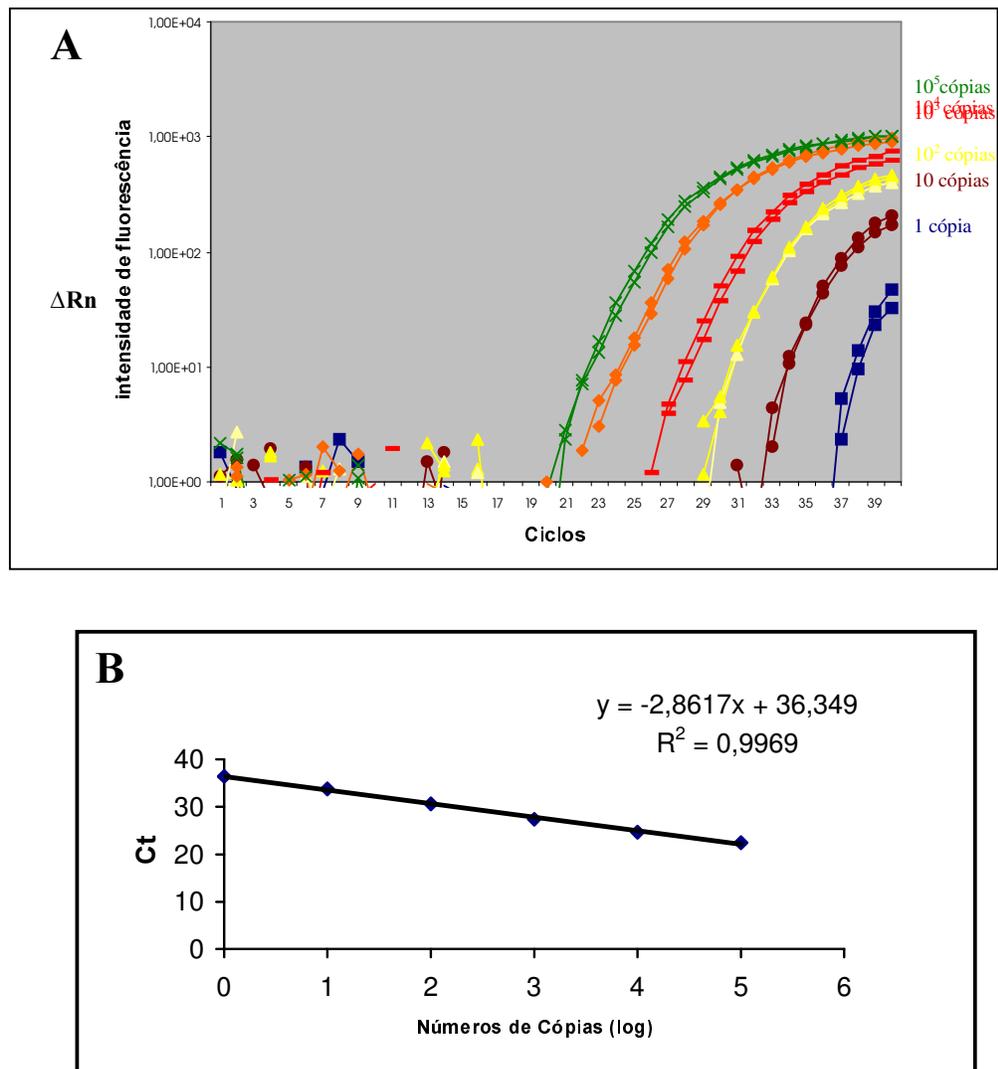


Figura 2. Gráfico de amplificação e curva padrão para o gene *SRY*. (A) Cada curva de amplificação corresponde aos PCRs realizados com diferentes quantidades de DNA genômico conhecidas. O eixo X representa o número de ciclos de uma reação de PCR quantitativo e o Y representa o ΔRn , que é a intensidade de fluorescência sobre o *background*. (B) Curva do Ct (*threshold Cycle* = número do ciclo inicial de amplificação) inversamente proporcional ao logaritmo do número de cópias. O coeficiente de correlação (R^2) é 0,9969.

2.3. Análise Estatística.

Foram empregados cálculos de estatística descritiva bem como Teste exato de Fisher, Teste *t* de *student* e teste de *Mann-Whitney* para comparação de freqüências, de médias e de postos, respectivamente. Para comparações entre médias de mais de dois grupos foram utilizados o teste de análise de variância ANOVA e *Kruskal-Wallis*.

Análise de regressão linear múltipla foi usada para avaliar possível dependência do número de cópias do DNA masculino com as variáveis contínuas.

O teste de Correlação de *Spearman* foi utilizado para identificar tendências entre as diferentes variáveis e o número de cópias de DNA masculino.

Com objetivo de tentar definir um valor de corte (*cut off*) que permitisse a obtenção de um balanço apropriado entre possíveis valores do número de cópias do cromossomo Y falsos positivos e falsos negativos foi empregada a análise feita pelas curvas ROC (*Receiver Operating Characteristic*) com auxílio do programa *StatsDirect*® versão 2.35*. A Capacidade diagnóstica ou acurácia de um teste biológico pode ser avaliada pela análise da curva ROC. Esse tipo de curva tem como objetivo obter a sensibilidade e especificidade de cada valor de corte individual na amostra (com e sem diagnóstico de LES). A curva é obtida pela distribuição em gráfico dos valores verdadeiramente positivos (sensibilidade) contra os falso-positivos (1 - especificidade) dos indivíduos analisados.

Valores de “p” menores que 0,05 (bicaudal) foram considerados significativos estatisticamente. A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa *Graph Pad Instat*, da indústria Graph Pad Software (San Diego, Ca, EUA).

3. RESULTADOS

3. RESULTADOS

Comparações entre os grupos LES e controle não mostraram diferenças significantes entre faixas etárias, idade das mulheres quando do nascimento do primeiro filho e do tempo decorrido desde a primeira gestação do sexo masculino (tempo de microquimerismo). As pacientes com LES tinham em média 35 ± 10 anos na época do diagnóstico e tempo médio de doença lúpica de 6 ± 5 anos. Treze das 28 pacientes apresentavam critério para diagnóstico de nefrite lúpica. Não houve diferença também entre o número de gestações do sexo masculino entre os dois grupos (Tabela 3).

3.1. Avaliação do Equivalente Genômico masculino em LES

Análise do número de cópias de seqüências de DNA do cromossomo Y foi significativamente maior no grupo das pacientes com LES (252 ± 654 vs $2,13 \pm 3,7$; $p = 0,029$) demonstrando um possível papel do microquimerismo nessa doença auto-imune. A mediana e a variação da amostra dos grupos LES e controle foram respectivamente 0,8 (0,052-2912) e 0,09 (0052-11,7) (Tabela 4).

Tabela 3. Dados demográficos das mulheres com LES e saudáveis (controle).

Dados demográficos	LES (n=28)	Controle (n=18)
Idade (anos)	41 ± 10	43,5 ± 7
Tempo de doença (anos)	6 ± 5	-
Idade ao nascimento do 1º filho (anos)	23,5 ± 6	27 ± 4
Idade quando diagnóstico de LES (anos)	35 ± 10	-
Nº gestações sexo masculino	1	17
	>1	11
Tempo desde nascimento 1º filho (anos)	18 ± 7	16 ± 8,5

3.2. Equivalente genômico e tempo de doença

Estratificação do tempo da doença em períodos (≤ 5 anos, entre 6 e 10 anos e >10 anos) não demonstrou haver diferença significativa entre os valores médios do número de cópias masculinas, respectivamente $113,5 \pm 350$ vs 115 ± 354 vs $1,401 \pm 1459$ ($p=$ NS; Tabela 4). Entretanto, observa-se que no grupo com mais de 10 anos de doença mais células microquiméricas foram detectadas, embora sem significância estatística. Utilizando análise de Regressão Linear Univariada foi possível observar significativa correlação positiva ($p= 0,003$) entre o tempo de doença lúpica e o número de células microquiméricas masculinas, sugerindo a possibilidade de proliferação dessas células com decorrer do tempo (Figura 3).

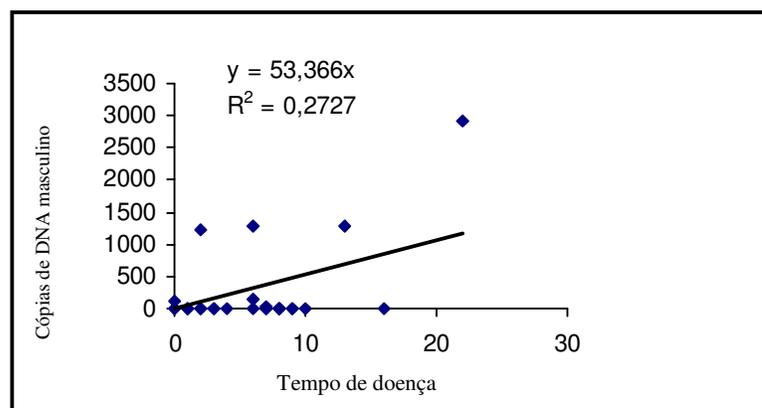


Figura 3. Correlação entre número de cópias de DNA masculino e tempo de doença lúpica.

3.3. Equivalente genômico, idade materna ao nascimento do primeiro filho e número de gestações do sexo masculino.

Embora nenhuma mulher do grupo controle apresentasse gestações do sexo masculino até 18 anos de idade a análise estatística intragrupos não demonstrou diferenças entre o número de células microquiméricas quando essa gestação ocorreu após 18 anos de idade, tanto entre as pacientes lúpicas como entre as mulheres saudáveis. Comparação entre os grupos mostrou maior número de cópias masculinas nas pacientes com LES, atingindo significado estatístico quando a gestação ocorreu na faixa etária entre 19 e 25 anos idade ($p = 0,012$; Tabela 4).

O número de gestações do sexo masculino não foi associado com diferença do número de células masculinas entre as pacientes primíparas ou multíparas (Tabela 4). Entre as mulheres saudáveis houve uma significativa redução no número de células

masculinas das mulheres com mais do que uma gestação do sexo masculino, quando comparadas àquelas com apenas um filho ($0,073 \pm 0,045$ vs $2,93 \pm 4,09$; $p = 0,027$).

A multiparidade pareceu afetar diferentemente a quantidade de células microquiméricas nos dois grupos, aumentando (embora não significativamente) no grupo LES e diminuindo no grupo controle. Entretanto, a comparação do número de células masculinas entre os grupos mostrou diferença significativa entre as pacientes múltíparas e com LES, quando comparadas às sem doença (Tabela 4) (382 ± 924 vs $0,073 \pm 0,045$; $p = 0,019$).

Tabela 4. Equivalente genômico (EqG) Masculino em mulheres com LES e saudáveis. Os dados são expressos como Média \pm Desvio-padrão.

EqG masculino/mL	LES (n=28)	Controle (n=18)
	252 \pm 654*	2,13 \pm 3,7*
EqG e tempo de doença^a	LES n=28^a	Controle
\leq 5anos	113,5 \pm 350 (n=12)	-
6-10anos	115 \pm 354 (n=13)	-
>10anos	1401 \pm 1459 (n=3)	-
EqG e idade materna ao nascimento 1º filho (anos)^b	LES (n=28)^b	Controle (n=18)^c
\leq 18anos	178 \pm 451 (n=8)	-
19-25anos	294 \pm 920 (n=10)	0,36 \pm 0,53 (n=11)
>25anos	270 \pm 522 (n=10)	4,9 \pm 4,8 (n=7)
EqG e nº. de gestações masculinas	LES (n=28)	Controle (n=18)
1	168 \pm 412 (n=17)	2,93 \pm 4,09 ^f (n=13)
>1	382 \pm 924 ^d (n=11)	0,073 \pm 0,045 ^e (n=5)
EqG e tempo de microquimerismo^g	LES (n=28)^h	Controle (n=18)ⁱ
\leq 10anos	33 \pm 65 (n=4)	2,55 \pm 4,34 (n=3)
11-15anos	140 \pm 382 (n=10)	2,66 \pm 3,79 (n=6)
>15anos	395 \pm 860 (n=14)	1,64 \pm 3,81 (n=9)

*P= 0,029; a:(p= 0,003); b: (p=0,012); b vs c: (p=NS); d vs e: (p=0,019); e vs f: (p=0,027); g vs h: (p=0,003); g vs i: (p=NS).

3.4. Equivalente genômico masculino e tempo de microquimerismo.

A Tabela 4 mostra que o aumento do tempo de microquimerismo correlacionou-se positivamente com o aumento do número de cópias de DNA masculino ($p=0,0032$), pois as pacientes lúpicas que pariram o primeiro filho há mais de 15 anos possuíam cerca de 10 vezes mais células microquiméricas que aquelas cujo parto tenha ocorrido a 10 anos ou menos (395 ± 860 vs 33 ± 65), e quase o triplo de células masculinas quando o nascimento do primeiro filho ocorreu entre 11 e 15 anos (395 ± 869 vs 140 ± 382); (Figura 4A).

Análise de regressão linear múltipla detectou que o período influenciando significativamente essa correlação foi aquele cujo nascimento do primeiro filho ocorreu entre 11-15 anos ($p= 0,002$). Esses resultados sugerem uma possível capacidade de proliferação dessas células microquiméricas.

Análise do grupo controle mostrou pequeno número de células masculinas, e curiosamente a correlação entre número de cópias de DNA e tempo de microquimerismo foi inversa àquela observada no grupo LES (Figura 4B).

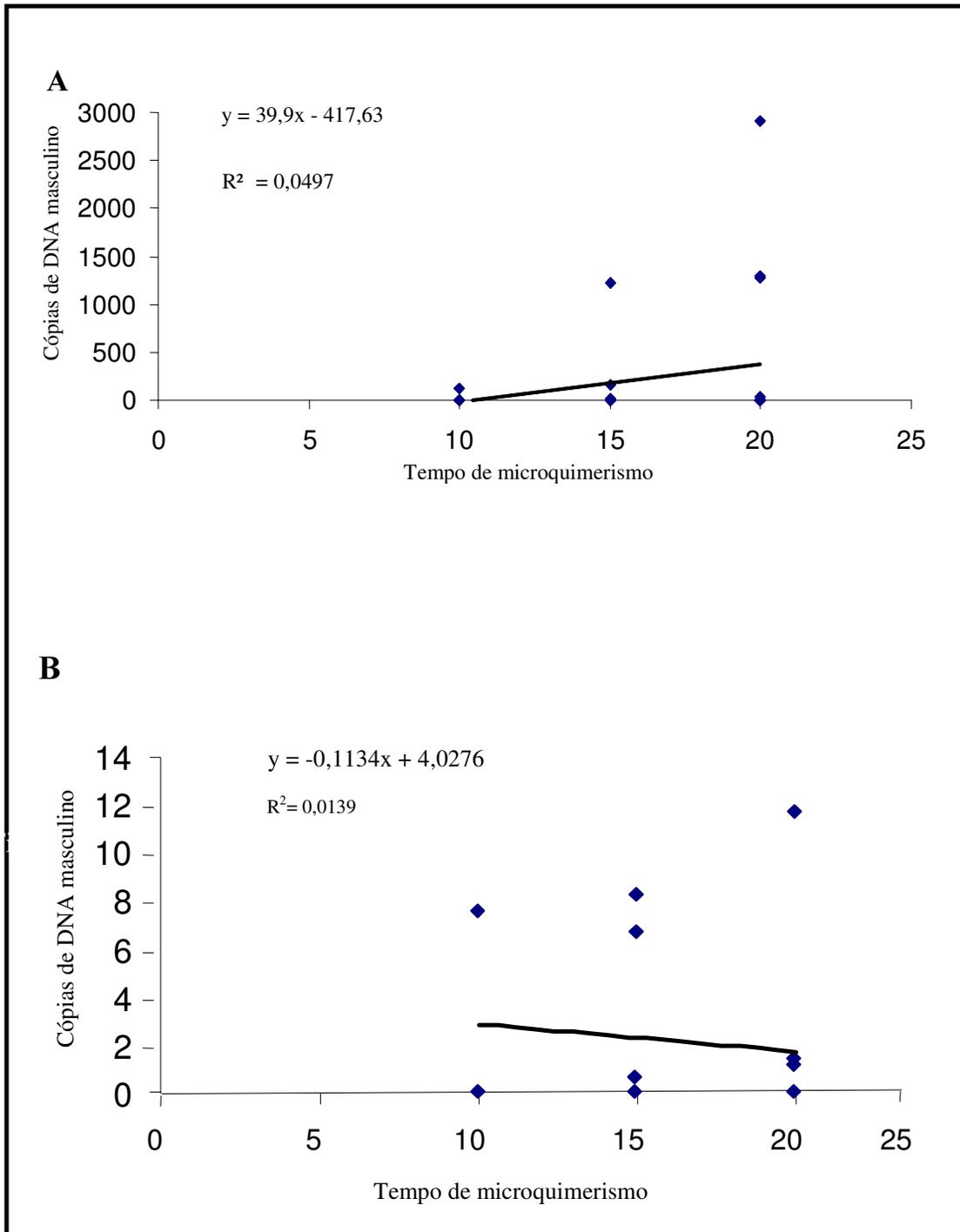


Figura 4. Correlação entre número de cópias de DNA masculino e tempo de microquimerismo pacientes lúpicas (A) e mulheres saudáveis (B).

3.5. Equivalente genômico, nefropatia lúpica e multiparidade.

Em nossa casuística 13 pacientes apresentaram critérios para diagnóstico de nefrite lúpica. Assumindo que o acometimento renal denota maior gravidade da doença, tentamos estabelecer correlação com o número de cópias masculinas. A Tabela 5 mostra que os pacientes sem nefrite lúpica mostraram número de cópias de DNA masculino significativamente maior que as pacientes com nefrite (388 ± 827 vs $95,5 \pm 338$; $p=0,019$).

Análise estatística não detectou associação entre multiparidade e o desenvolvimento de nefropatia lúpica (OR=1,067; IC 95%: 0,23 – 4,88) (Tabela 5). É interessante ressaltar que embora sem significado estatístico, observou-se maior número de cópias no grupo de pacientes multíparas e sem nefropatia.

3.6. Equivalente genômico masculino, nefropatia lúpica e idade ao nascimento do primeiro filho.

Pacientes com gestação e parto ocorridos até 18 anos de idade e que apresentaram nefrite tiveram um número de células microquiméricas significativamente menor que aquelas sem nefropatia ($0,23 \pm 0,22$ vs 355 ± 623 ; $p=0,028$). A análise estatística não detectou associação entre a presença de nefropatia lúpica e a idade das pacientes quando do nascimento do primeiro filho (OR=0,81; IC 95%: 0,15 – 4,22), (Tabela 6).

3.7. Influência das diferentes variáveis no número de cópias de DNA masculino.

Análise de regressão linear múltipla mostrou significativa correlação entre o número de células masculinas com as variáveis, tempo de microquimerismo, idade da

paciente quando do nascimento do primeiro filho, multiparidade e tempo de doença ($R^2= 0,36$; $F=3,31$; $p=0,027$). A variável tempo de doença foi aquela que apresentou significativa contribuição para essa correlação ($p=0,011$). As demais variáveis, isoladamente não foram preditivas do microquimerismo.

3.8. Sensibilidade e Especificidade da análise do número de cópias de DNA masculino.

Análise dos valores do número de cópias de DNA masculino feita pela curva ROC determinou o valor de corte ideal de 17,5 células microquiméricas. Utilizando esse valor para discriminar mulheres com LES e microquimerismo daquelas sem LES a área sob curva obtida foi de $AUC= 0,692$ ($0,52 - 0,86$; $IC95\%$) (Figura 5).

Estabelecendo que mulheres apresentando número de cópias masculinas ≥ 17 , que pariram com até 18 anos de idade e com tempo de microquimerismo acima de 10 anos foi possível detectar um número significativamente maior de mulheres com LES quando comparadas com mulheres sem essas características (Teste Fisher $p= 0,032$).

Nessas condições os valores preditivo positivo e negativo foram 100% e 25% respectivamente com especificidade e sensibilidade do teste de 100% e 46% respectivamente.

Tabela 5. Equivalente Genômico masculino em pacientes com nefropatia lúpica e número de filhos. Os dados são expressos como Média \pm Desvio Padrão.

	Com nefrite (n=13)	Sem nefrite (n=15)
EqG masculino/mL	95,5 \pm 338*	388 \pm 827*
1 filho	155 \pm 430 (n=8)	179 \pm 420 (n=9)
>1 filho	0,126 \pm 0,105 (n=5)	700 \pm 1,199 (n=6)

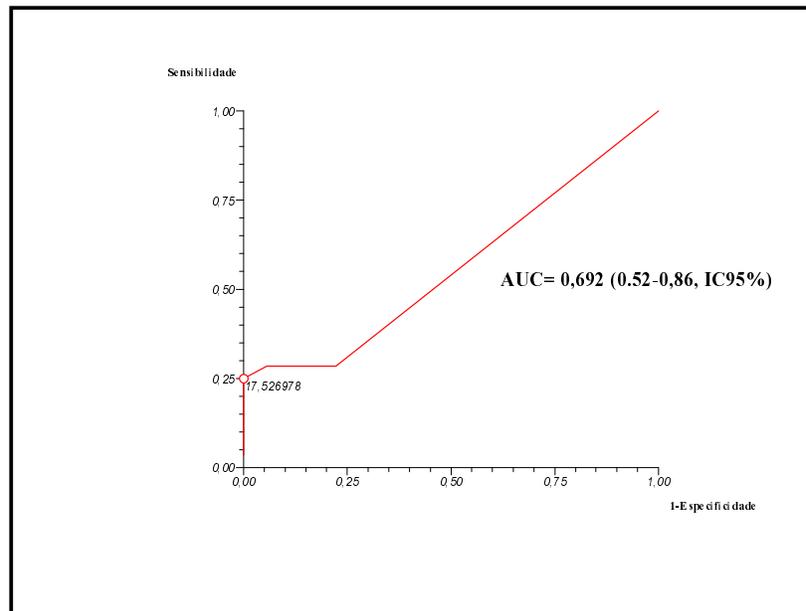
(OR=1,067; IC 95%: 0,23 – 4,88), *P= 0,019

Tabela 6. Equivalente Genômico masculino, nefropatia lupica e idade ao nascimento 1º filho.

	Com nefrite (n=13)	Sem nefrite (n=15)
	EqG masculino/mL	EqG masculino/mL
\leq 18 anos	0,23 \pm 0,22* (n=4)	355 \pm 623* (n=4)
>18 anos	138 \pm 406 (n=9)	400 \pm 917 (n=11)

(OR=0,81; IC 95%: 0,15 – 4,22), *P= 0,028

Figura 5. Curva ROC para determinação do valor de corte ideal do número de células masculinas microquiméricas.



4. DISCUSSÃO

4. DISCUSSÃO

Embora raras, as doenças AI conjuntamente afetam cerca de 5% da população dos países ocidentais ⁽⁵²⁾. Esse grupo de doenças tem fisiopatologia pouco conhecida e tem como característica a ativação dos linfócitos T e B, isolada ou simultaneamente, na ausência de infecção ou outra causa inflamatória identificável ⁽⁵³⁾.

Clinicamente as doenças AI podem se manifestar com acometimento sistêmico (como no LES) ou de um órgão específico (como no Diabete Melito tipo 1). Entretanto, essa classificação clínica não permite fazer distinção entre os possíveis mecanismos fisiológicos envolvidos, por exemplo, quando ocorrem alterações no processo de seleção clonal, regulação ou morte dos linfócitos T e B, ou ainda quando uma reação imunológica anormal ocorre em resposta a um antígeno específico, próprio ou estranho ao hospedeiro, causando doença AI ⁽⁵³⁾.

O LES pode acometer desde a pele até o sistema nervoso central e por isso é considerado a mais heterogênea das doenças AI. Classicamente pode ser caracterizado pela progressão através de quatro estágios: 1) a presença de auto-anticorpos (AA) dirigidos contra grande diversidade de auto-antígenos; 2) deposição de AA e complexos imunes nos tecidos; 3) desenvolvimento de inflamação; 4) evolução para lesão tecidual e fibrose ^(3,54).

Embora a taxa de sobrevivência das pacientes com LES tenha aumentado nos últimos 40 anos, muitos deles ainda passam por períodos de exacerbação da doença e enfrentam complicações infecciosas graves, aterosclerose prematura e disfunção cognitiva ^(55,56). Essa observação reforça a necessidade de se aprimorar o entendimento da patogênese do LES.

Assim como outras doenças AI o LES possui traços genéticos complexos pois genes do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) e de outros locais diferentes do MHC parecem contribuir para o aparecimento da doença. Vários locus de cromossomos ligados aos traços genéticos do LES foram mapeados, mas como cada locus abrange numerosos genes, cujas respectivas contribuições para o risco de desenvolvimento da doença são parciais, a identificação dos genes predisponentes ao LES tem sido um processo difícil ^(57,58).

Manipulações genéticas que causam doença semelhante ao lupus em camundongos identificaram diferentes vias que podem estar envolvidas na patogênese da doença: inibição da apoptose linfocitária, depuração anormal de células apoptóticas, defeitos no processo de ativação dos linfócitos T e B e anormalidades na produção de citocinas ⁽⁵⁹⁾.

Alterações na função dos linfócitos T auxiliares (Th), supressores (Ts), regulatórios (Treg) e células “natural killer” (NK) têm sido relatadas no LES, tanto em animais de experimentação como em humanos ^(60,85). Estimulação do complexo formado pelo receptor dos linfócitos T (TCR) e sua estrutura associada CD3, em pacientes com lupus, mostram influxo aberrante de cálcio e redução na produção de IL-2, com conseqüente diminuição do limiar de ativação da célula T ^(61,84).

Estudos em animais de laboratório também têm mostrado que a excessiva co-estimulação entre linfócitos T e B e células apresentadoras de antígenos (APC), feita através das estruturas de membrana CD40 e seu receptor CD40L, ou CD28-B7, pode desencadear o aparecimento do LES. Esses estudos despertaram a possibilidade para o tratamento da doença com os novos agentes bloqueadores da co-estimulação ^(62,63).

Anormalidades na função dos linfócitos B foram descritos no LES e revisados recentemente por Shlomchik e Madaio ⁽⁶⁴⁾. Nesse contexto, também foi relatado que o uso do Rituximab, anticorpo monoclonal dirigido contra a estrutura CD20 dos linfócitos B, reduz a atividade da doença lúpica ⁽⁶⁵⁾.

O fato de pacientes com lupus desenvolverem auto-anticorpos (AA) dirigidos contra diferentes tipos de auto-antígenos e de ser possível a detecção desses AA antes do início clínico da doença, também pode sugerir uma correlação patogênica importante ⁽⁶⁶⁾. Outra evidência significativa do papel dos AA em humanos é o desenvolvimento transitório de LES em recém nascidos de mães acometidas pela Síndrome de Sjögren ⁽⁶⁷⁾.

Paradoxalmente, observações com camundongos MRL-lpr geneticamente modificados e incapazes de secretar IgG, ainda desenvolveram nefrite lúpica ⁽⁶⁸⁾.

Essas observações sugerem que, embora exista forte evidência de que os AA tenham importante papel patogênico no LES, não são conhecidos os mecanismos pelos quais os mesmos estejam envolvidos na diversidade das lesões observadas na doença. Conseqüentemente, embora a autoimunidade mediada por AA possa contribuir para a produção das lesões teciduais observadas no LES, quando analisada isoladamente, parece não ser a única responsável pelo processo.

Duas publicações feitas em 1996 foram cruciais para a formulação da hipótese de que o microquimerismo fetal (MCF) e maternal (MCM) poderiam representar uma nova etiopatologia para as doenças AI. A primeira, na qual Bianchi e cols demonstraram que mulheres grávidas gradativamente tornavam-se quiméricas em conseqüência do tráfego bidirecional de células entre mãe e feto e a segunda, onde Nelson estabeleceu a conexão entre MCF e autoimunidade ^(18,69). No mesmo ano, outro importante estudo confirmou o

trânsito celular materno-fetal e a transferência de até 500.000 células fetais para mulheres que haviam interrompido a gestação no 3º trimestre ⁽⁷⁰⁾.

A esclerodermia (ES) foi à doença inicialmente escolhida para testar a correlação entre doença AI e MCF em virtude de ter quadro clínico semelhante ao da doença do enxerto contra o hospedeiro (GVHD) observado em transplante de medula óssea, afetar principalmente mulheres e possuir maior incidência após a gestação ⁽³²⁾. Nesse estudo, os autores avaliaram a presença de MCF em mulheres com ES que haviam parido pelo menos uma criança do sexo masculino e observaram quantidade significativamente maior de DNA masculino no sangue das mulheres acometidas pela doença ⁽³²⁾.

Realmente, relatos avaliando pacientes com ES são mais encontrados na literatura e os resultados parecem comprovar a maior prevalência do MCF nessas pacientes quando comparadas às mulheres saudáveis ⁽²⁴⁾.

Outras doenças AI como doença de Graves, Tiroidite de Hashimoto, Síndrome de Sjögren e Cirrose Biliar Primária têm sido também correlacionadas com o trânsito bidirecional de células entre mãe e feto durante a gravidez e conseqüentemente, com o MCF (revisado por Sarkar e cols) ⁽²⁴⁾.

Entretanto, no caso específico do LES, estudos elaborados para investigar a correlação entre a existência de MCF e a doença lúpica são raros.

No presente trabalho, utilizando a técnica de PCR em tempo real (PCR-RT) observamos número significativamente maior de células microquiméricas masculinas nas pacientes acometidas pelo lupus, quando comparadas ao grupo controle de mulheres saudáveis com características demográficas semelhantes.

Contrariamente, Miyashita e cols, utilizando a técnica de “nested” PCR, não conseguiram demonstrar seqüências de DNA específicas do cromossomo Y em nenhuma das 21 pacientes com diagnóstico de lupus ⁽⁴²⁾.

Em seguida, Johnson e cols relataram o caso de uma paciente falecida de complicações associadas à doença lúpica na qual foi detectada a presença de MCF. Empregando a técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH), os autores encontraram células masculinas nos órgãos e tecidos acometidos pela doença, e sugeriram que essas células microquiméricas poderiam estar associadas ao processo patológico envolvido naquele caso ⁽⁴³⁾. Ainda, baseados no achado de agrupamento dessas células, os autores especularam seu potencial de proliferação e recrutamento para as áreas com lesão tissular ⁽⁴³⁾.

Essa hipótese parece ser comprovada, pela primeira vez, com os resultados deste estudo que fortemente sugerem a existência de uma correlação positiva entre a capacidade de proliferação das células quiméricas e o desenvolvimento do LES. A análise de regressão linear múltipla demonstrou uma significativa correlação entre o número de cópias de células microquiméricas e o aumento progressivo do tempo de doença. Também o tempo de microquimerismo reforça essa possibilidade, pois os resultados mostram que o número de cópias de DNA masculino aumentou significativamente, quadruplicando nas pacientes que haviam parido o 1º filho há 10 a 15 anos e aumentando mais de 10 vezes quando o nascimento desse filho ocorreu há mais de 15 anos. Esse fato não foi observado no grupo de mulheres saudáveis onde ao contrário, foi observada tendência para redução no número dessas células com decorrer do tempo. Esse padrão de proliferação apresentado pelas células microquiméricas não

foi relatado em nenhum outro trabalho e merece ser melhor investigado em futuros projetos.

Também utilizando a técnica de “nested” PCR, Mosca e *cols* quantificaram o DNA genômico masculino de 22 pacientes lúpicas e não encontraram diferença significativa no número de células microquiméricas desse grupo quando comparado ao grupo controle ⁽⁴⁷⁾. Entretanto, apenas no grupo de pacientes com nefropatia lúpica uma quantidade significativamente maior de células masculinas fetais foi detectada ⁽⁴⁷⁾.

Nossos resultados contrariam esses achados em dois aspectos: 1) em nossa casuística as mulheres com LES tinham mais células microquiméricas que as saudáveis; 2) as pacientes com nefropatia curiosamente apresentavam número significativamente menor de cópias de DNA masculino do que as pacientes sem lesão renal.

Nossos achados, embora paradoxais, não são excludentes entre si. O MCF parece ser significativamente mais prevalente em pacientes com doenças AI do que em indivíduos saudáveis de acordo com recente meta-análise ⁽⁴⁴⁾. Além disso, existem evidências que células microquiméricas podem estar envolvidas no processo inflamatório crônico, como na Síndrome do Lupus Neonatal e em algumas doenças da tireóide ^(71,72). Estudo experimental de Christrer e *cols* demonstraram que camundongos tratados com um agente químico desencadeador de esclerodermia apresentaram alterações nos níveis de microquimerismo, e desenvolveram esplenomegalia e lesões cutâneas ⁽⁷³⁾.

Por outro lado é possível que o MCF desempenhe algum papel na reparação tecidual ou que, sem participar ativamente da reação inflamatória, seja apenas um expectador do processo. Os achados experimentais de Wang e *cols* parecem sugerir que em situações onde ocorrem processos inflamatórios crônicos o MCF se estabelece mais

frequentemente, e as células microquiméricas podem estar envolvidas na reparação tecidual⁽⁷⁴⁾.

É possível que a gestação “per si” tenha algum papel no desenvolvimento e gravidade da doença AI. Admitindo a presença da nefropatia lúpica como forma mais grave do LES, nossos resultados sugerem que o maior número de células microquiméricas observado no grupo de pacientes sem nefrite poderia sugerir papel reparador ou “protetor” para essas células, em consequência de sua plasticidade⁽⁷⁴⁾.

O número de gestações também poderia ser um fator determinante na gravidade da doença, segundo Launay e cols⁽⁷⁵⁾. Esses autores observaram que a esclerodermia, em sua forma limitada, acometia principalmente mulheres multíparas e aquelas com menores intervalos de tempo entre o nascimento do primeiro filho e o início da doença⁽⁷⁶⁾.

Analisando na tabela 4 o efeito gestacional sobre o MCF observado neste estudo, não foi possível correlacionar o número de células microquiméricas com o número de gestações do sexo masculino. Porém, enquanto que no grupo de mulheres saudáveis ocorreu significativa redução das células microquiméricas, no grupo das pacientes multíparas e com LES observou-se tendência para duplicar a quantidade dessas células. Houve também diferença significativa do número de células masculinas, quando comparado aos das mulheres multíparas com e sem LES.

Ainda analisando o efeito da gestação e o risco de desenvolver esclerodermia, Pisa e cols observaram que esse risco era menor entre as mulheres mais jovens quando da primeira gravidez⁽⁷⁶⁾. Nossos resultados mostraram a ausência de correlação entre número de células microquiméricas e a idade das pacientes quando da primeira gestação

e que entre as mulheres saudáveis ocorreu um aumento significativo de células com aumento da idade materna na época do primeiro filho.

Esses resultados sugerem que gestações do sexo masculino afetaram diferentemente os dois grupos de mulheres e realmente podem modular o desenvolvimento e/ou evolução da doença.

Em virtude de diferentes variáveis poderem influenciar o desenvolvimento do MCF, nosso estudo tentou estabelecer correlações entre essas variáveis e o número de cópias de DNA masculino. Não foi possível demonstrar correlação entre essas variáveis e o número de gestações, desenvolvimento de nefropatia (gravidade do LES) e microquimerismo. Curiosamente, pacientes que pariram o primeiro filho até 18 anos de idade e desenvolveram nefropatia apresentaram número de células microquiméricas significativamente menores do que as pacientes sem nefropatia na mesma faixa etária. Embora a associação entre idade ao nascimento do primeiro filho, nefropatia e MCF não tenha alcançado valores de significância estatística é possível especular que o não desenvolvimento de MCF, caracterizado pelo reduzido número de células microquiméricas, durante a primeira gestação do sexo masculino de mulheres jovens, poderia estar associado a uma forma mais grave da doença, com desenvolvimento de nefrite lúpica.

Recentemente, Khosrotrhrami e cols estudaram a relação entre MCF e LES, pela análise das lesões cutâneas de 7 mulheres afetadas pela doença. A técnica de FISH usada pelos autores não detectou células masculinas em nenhuma das amostras teciduais obtidas das pacientes⁽⁷⁷⁾. Os autores especularam que a ausência de MCF poderia ser conseqüência da forma clínica de apresentação do LES na causística estudada (cutânea em um caso e moderada sistêmica em seis casos)⁽⁷⁸⁾.

A capacidade de detecção do MCF parece depender da sensibilidade e especificidade da técnica de biologia molecular usada no processo.

A extração do DNA não é seletiva e, portanto a amostra de DNA colhida no sangue periférico reflete a proporção entre o conteúdo genômico da paciente e o das células microquiméricas masculinas no sistema circulatório ⁽⁷⁹⁾. Conseqüentemente, as condições para uso da técnica do PCR necessitam ser otimizada para permitir a amplificação da amostra em estudo contida em uma solução com elevada concentração de DNA do hospedeiro.

Por essa razão e diferentemente de todos os estudos até o momento referidos na literatura, optamos pela técnica da PCR-RT, uma ferramenta extremamente poderosa para análise quantitativa dos ácidos nucléicos ⁽⁸⁰⁾. Nessa técnica, as seqüências específicas de DNA a serem analisadas são amplificadas e detectadas simultaneamente, com acurácia e sensibilidade suficientes para detectar uma única molécula ⁽⁸¹⁾.

Quando comparada às técnicas cuja quantificação de DNA são obtidas no final do processo de amplificação, a PCR-RT proporciona maior reprodutibilidade e precisão, além de mais simplicidade ⁽⁷⁹⁾.

É possível que a ausência ou mesmo a não detecção de pequenas quantidades de cópias de DNA masculino, envolvendo pacientes com LES, relatado nos estudos citados, quando comparados ao nosso estudo, possa ser conseqüência da diferente sensibilidade entre os métodos de PCR utilizados.

Análise pela curva ROC para discriminar pacientes com LES daquelas sem a doença forneceu uma AUC de 0,7 (0,52 a 0,86, IC 95%) com valor de corte ideal de 17 cópias de DNA masculino.

Estabelecendo um modelo que inclui além de 17 células microquiméricas, pacientes com tempo de microquimerismo maior que 10 anos e que engravidaram após 18 anos de idade, obtivemos 100% de especificidade e 46% de sensibilidade para esse teste com valor preditivo positivo de 100%. Embora não tenha sido objetivo primário deste estudo propor a pesquisa de células microquiméricas como teste biológico para identificação do LES, esses resultados abrem perspectivas para futuros projetos nessa área específica.

Os mecanismos fisiopatológicos pelos quais o MCF pode causar doença AI são complexos e controversos e sua discussão começa pelo estudo da relação materno-fetal.

O feto pode ser visto como um órgão transplantado geneticamente diferente da mãe e que de acordo com as leis do transplante, deveria provocar a resposta imunológica materna, visando sua “rejeição” logo após a implantação do blastocisto na parede uterina ^(77,78).

Para explicar o paradoxo da tolerância materna ao feto Medawar apresentou três hipóteses: a) separação física entre mãe e feto; b) imaturidade antigênica do feto; c) “inércia” imunológica da mãe ⁽⁸¹⁾. Esse paradoxo ainda permanece sem resposta definitiva mas pode fornecer idéias para a compreensão do MCF.

Atualmente várias evidências sugerem que as células fetais que penetram na circulação podem afetar o sistema imunológico, “tolerizando” as células T maternas, mantendo esse estado de tolerância após o parto ^(82,83). Esse potencial das células microquiméricas tem sido postulado como um dos fatores responsáveis pelo prolongamento da sobrevivência de órgãos transplantados ⁽¹⁴⁾.

A quebra dos mecanismos fisiológicos que mantêm a tolerância para com os antígenos próprios tem sido aventada para explicar a produção deficiente de IL-2, observada no LES ^(57,84). É possível que as células microquiméricas participem desse processo alterando o equilíbrio entre as citocinas inflamatórias e inibitórias, a interação entre linfócitos Th1, Th2, Ts e Treg, interferindo com células APC, ou mesmo assumindo o papel de célula apresentadora de antígeno, e dessa forma modificando o sistema imunológico do hospedeiro ^(24,28,60,85).

Outra possibilidade é que devido às suas características fenotípicas de célula primitiva, semelhante às das células tronco, as células microquiméricas podem ter capacidade de transformação, remodelação e reparação tecidual ⁽⁸⁶⁾.

Em resumo, conclusões tiradas de estudos sobre MC ainda são passíveis de várias especulações em consequência das inúmeras variáveis associadas com o tráfego celular materno-fetal. Entretanto, alguns fatos parecem robustecer a conexão entre o MCF e as doenças AI: acometimento maior das mulheres, mais freqüente em idade fértil, e a gestação servindo como agente modulador da doença ^(20,28,31,35,69).

Ainda, duas recentes metanálises, que incluíram trabalhos contendo informações detalhadas sobre a história gestacional das pacientes, associaram significativamente o MCF com doença AI ^(44,87).

Com relação ao caso específico do LES, alguns relatos de caso, utilizando diferentes métodos para detecção de MCF e raros trabalhos com casuísticas reduzidas e falhas na aquisição de informações sobre as variáveis envolvidas com a história gestacional, produziram resultados controvertidos.

Utilizando técnica de biologia molecular mais sensível e específica o presente estudo investigou a presença de seqüências específicas do cromossomo Y no sangue de mulheres acometidas pelo LES e saudáveis.

Nossos resultados estabelecem claramente a presença de MCF nas pacientes lúpicas e sugerem que as células microquiméricas proliferam com o decorrer do tempo de doença e desde o nascimento do primeiro filho.

A observação de que mais células microquiméricas foram detectadas nas pacientes que não apresentavam nefropatia, e que esse fato foi também notado entre as mulheres que haviam parido o primeiro filho até 18 anos de idade, sugerem um papel “protetor” para o MCF em relação à ocorrência da doença renal lúpica.

Os fatores que determinam a atuação dessas células como pró-inflamação ou anti-inflamatórias permanecem desconhecidos e permitem diferentes tipos de hipóteses que certamente poderão ser utilizadas para elaboração de futuras linhas de investigação envolvendo MCF e LES.

5. CONCLUSÃO

5. CONCLUSÃO

Utilizando a técnica de PCR-RT, inédita para esse tipo de estudo em nosso conhecimento, o presente trabalho demonstra claramente que a quantidade de células microquiméricas masculinas é maior nas pacientes acometidas pelo LES.

A correlação positiva entre o número dessas células e o tempo de doença, também observada com o decorrer do tempo de microquimerismo, sugere fortemente pela primeira vez, a capacidade proliferativa das células quiméricas masculinas fetais. Curiosamente a correlação com o tempo de microquimerismo foi negativa entre as mulheres saudáveis denotando tendência diferente das células microquiméricas nessa população.

Não foi possível detectar associação entre paridade e MCF no grupo de pacientes com LES, mas a gestação afetou as mulheres saudáveis pois as múltíparas desse grupo apresentaram significativamente menor quantidade de células masculinas fetais do que as primíparas. Comparação entre os grupos mostrou que as pacientes lupicas múltíparas apresentaram maior número de células microquiméricas do que as suas correspondentes saudáveis.

Pacientes com nefropatia lúpica apresentaram menos células microquiméricas do que aquelas sem doença renal e esse fato não foi associado com o número de gestações do sexo masculino. É possível que a faixa etária seja um fator modulador do LES pois a quantidade de células masculinas fetais foi maior nas pacientes sem nefropatia quando a primeira gestação do sexo masculino ocorreu até 18 anos de idade.

A detecção do MCF em mulheres pode abrir perspectivas para desenvolvimento de testes biológicos, pois os resultados da curva ROC permitiram obter um valor preditivo positivo de 100% para o teste utilizado.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. What can happen when the immune system tries to self destruct? Friendly Fire; Explaining autoimmune disease Eds: Isenberg DA & Morrow J, 1995, Oxford University Press, Oxford, p.76-106.
2. Marshall E. Lupus: Mysterious Disease Holds Its Secrets Tight. *Science* 2002; 296: 689 – 691.
3. Mills JA. Systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 1994;330 (26):1871–9.
4. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997;40:1725.
5. Pickering MC, Botto M, Taylor PR, Lachmann PJ, Walport MJ. Systemic lupus erythematosus, complement deficiency, and apoptosis. *Adv Immunol* 2001;76:227-324.
6. Herrmann M, Voll RE, Kalden JR. Etiopathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Immunol Today* 2000;21(9):424-6.
7. Kuenkele S, Beyer TD, Voll RE, Kalden JR, Herrmann M. Impaired clearance of apoptotic cells in systemic lupus erythematosus: challenge of T and B cell tolerance. *Curr Rheumatol Rep* 2003 5(3):175-7.

8. Munoz LE, Gaipl US, Franz S, Sheriff A, Voll RE, Kalden JR, Herrmann M. SLE—a disease of clearance deficiency? *Rheumatology* 2005;44(9):1101-7.
9. Riemekasten G and Hahn BH. Key autoantigens in SLE :*Rheumatology* 2005 ;44(8):975-82.
10. Kammer G M. Altered regulation of IL-2 production in systemic lupus erythematosus: an evolving paradigm *J. Clin. Invest* 2005; 115:836-840.
11. Liégeois A, Escourrou J, Ouvre E and Charreire J Microchimerism: a stable state of low-ratio proliferation of allogeneic bone marrow. *Transplant Proc* 1977; 9, 273–276.
12. Liégeois A, Gaillard MC, Ourve E and Lewin D Microchimerism in pregnant mice. *Trans Proc* 1981; 13, 1250–1252.
13. Lee TH, Paglieroni T, Ohto H, Holland PV, Busch MP. Survival of donor leukocyte subpopulations in immunocompetent transfusion recipients: frequent long-term microchimerism in severe trauma patients. *Blood* 1999; 93:3127-39.
14. Starzl TE, Demetris AJ, Trucco M, Murase N, Ricordi C, Ildstad S, Ramos H, Todo S, Tzakis A, Fung JJ, et al. Cell migration, chimerism, and graft acceptance. *Lancet* 1992; 339:1579-1582.

15. De Moor G, De Bock G, Noens L, De Bic S. A new case of human chimerism detected after pregnancy: 46,XY karyotype in the lymphocytes of a woman. *Acta Clin Bel* 1998, 43:231-5.
16. Cadavid A, Rugeles MT, Pena B, Sanchez F, Garcia H, Garcia G, Botero J, A. Castaneda and J. Ossa. Cell microchimerism in patients with recurrent spontaneous abortion: preliminary results. *Early Pregnancy: Biology and Medicine*, 1997;3:199-203.
17. Ariga H, Ohto H, Busch MP, et al: Kinetics of fetal cellular and cell-free DNA in the maternal circulation during and after pregnancy: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Transfusion* 2001;41:1524-30.
18. Bianchi DW, Zickwolf GK, Weil GJ, Sylvester S, DeMaria MA 1996 Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum. *Proc Natl Acad Sci* 93:705–708
19. Krabchi K, Gros-Louis F, Yan J, Bronsard M, Masse J, Forest JC, Drouin R. Quantification of all fetal nucleated cells in maternal blood between the 18th and 22nd weeks of pregnancy using molecular cytogenetic techniques. *Clin Genet* 2001; 60: 145–150.
20. Bianchi DW, Farina A, Weber W, Delli-Bovi LC, Deriso M, Williams JM and Klinger KW Significant fetal–maternal hemorrhage after termination of

- pregnancy: implications for development of fetal cell microchimerism. *Am J Obstet Gynecol* 2001; 184, 703–706.
21. Holzgreve W, Gheezi E, DiNaro E, Ganshirt D, Maymon E and Hahn S. Fetomaternal cell traffic is disturbed in preeclampsia. *Obstet Gynecol* 1998; 91, 669–672.
22. Lo YM, Patel P, Sampietro M, Gillmer MD, Fleming KA, Wainscoat JS. Detection of single-copy fetal DNA sequence from maternal blood. *Lancet* 1990; 335:1463-4.
23. Lo YMD, Lau TK, Chan LY, Leung TN, Chang AM. Quantitative analysis of the bidirectional fetomaternal transfer of nucleated cells and plasma DNA. *Clin Chem* 2000; 46: 1301–1309.
24. Sarkar K, Miller FW. Possible roles and determinants of microchimerism in autoimmune and other disorders. *Autoimmun Rev.* 2004; 3(6):454-63.
25. Ciaranfi A, Curchod A, Odartchenko N. Survie de lymphocytes foetaux dans le sang maternel post-partum. *Schweiz Med Wochenschr* 1977; 107:134-43.
26. Guetta E, Gordon D, Simchen MJ, Goldman B, Barkai G. Hematopoietic progenitor cells as targets for non-invasive prenatal diagnosis: detection of fetal CD34+ cells and assessment of post-delivery persistence in the maternal circulation. *Blood Cells Molecules Disease* 2003; 30(1):13-21.

27. Adams KM, Lambert NC, Heimfeld S, Tylee TS, Pang JM, Erickson TD, Nelson JL. Male DNA in female donor apheresis and CD34-enriched products. *Blood* 2003;102(10):3845-47.
28. Ando T, Davies TF. Self-recognition and the role of fetal microchimerism. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2004;18(2):197-211.
29. Brubaker DB. Immunopathogenic mechanisms of posttransfusion graft-vs-host disease. *Proc Soc Exp. Biol Med* 1993; 202:122-147.
30. Black CM, Stevens WM. Scleroderma. *Rheum Dis Clin North Am* 1989;15:193-212.
31. Silman AJ, Black C. Increased incidence of spontaneous abortion and infertility in women with scleroderma before disease onset: A controlled study. *Ann Rheum Dis.* 1988;47:441-444.
32. Nelson JL, Furst DE, Maloney S, Gooley T, Evans PC, Smith A, Bean MA, Ober C and Bianchi DW. Microchimerism and HLA-compatible relationships of pregnancy in scleroderma. *Lancet* 1998; 351, 559–562.
33. Arlett CM, Artlett CM, Smith JB, Jimenez SA Identification of fetal DNA and cells in skin lesions from women with systemic sclerosis. *N Engl J Med.* 1998; 338(17):1186-91.

34. Ohtsuka T, Miyamoto Y, Yamakage A and Yamazaki S Quantitative analysis of microchimerism in systemic sclerosis skin tissue. *Arch Dermatol Res* 2001; 293, 387–391.
35. Ando T, Imaizumi M, Graves PN, Unger P, Davies TF. Intrathyroidal fetal microchimerism in Graves' disease. *J clin Endocrinol Metab* 2002; 87:3315-20.
36. Klintschar M, Schwaiger P, Mannweiler S, Regauer S and Kleiber M Evidence of fetal microchimerism in Hashimoto's thyroiditis. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86, 2494–2498.
37. Endo Y, Negishi I, Ishikawa O. Possible contribution of microchimerism to the pathogenesis of Sjögren's syndrome. *Rheumatology* 2002; 41:490–5.
38. Fanning PA, Johnsson JR, Clouston AD, Edwards–Smith C, Balderson GA, Macdonald GA, Crawford DHG, Kerlin P, Powell LW, Powell EE Detection of male DNA in the liver of female patients with primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 2000; 33:690-695.
39. Artlett CM, Ramos R, Jiminez SA, Patterson K, Miller FW, Rider LG. Chimeric cells of maternal origin in juvenile idiopathic inflammatory myopathies. Childhood Myositis Heterogeneity Collaborative Group. *Lancet*. 2000; 23-30;356(9248):2155-6.

40. Lambert NC, Erickson TD, Zhen Y, Pang J, Guthrie KA, Furst DE, Nelson JL. Quantification of maternal microchimerism by HLA specific real-time PCR. Studies of healthy women and women with scleroderma. *Arthritis Rheum* 2004; 50:906-914.
41. Stevens AM, Tsao BP, Hahn BH, Guthrie K, Lambert NC, Porter AJ, Tylee TS, Nelson JL. Maternal HLA class II compatibility in men with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2005; 52:2768-2773.
42. Miyashita, N., Niki, Y., Nakajima, M., Fukano, H., Matsushima T. Y chromosome microchimerism in rheumatic autoimmune disease. *Ann Rheum Dis* 2000; 64:605-612.
43. Johnson KL, McAlindon TE, Mulcahy E, Bianchi DW. Microchimerism in a female patient with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2001; 44:2107-11.
44. Van Poelgeest EP, van Houwelingen HC, Heer E, Lagaaij EL, Bruijn JA, Bajema IM. Micro- and Tissue Chimerism in Physiologic, Autoimmune, and Transplantation Settings: A Meta-analysis. *Transplantation* 2004; 18(3): 153-161.
45. Abbud Filho M; Pavarino-Bertelli EC; Alvarenga MP; Fernandes IM; Toledo RA; Tajara EH; Savoldi-Barbosa M; Goldmann GH; Goloni-Bertollo . Systemic lupus erythematosus and microchimerism in autoimmunity. *Transplant Proc.* 2002; 34(7):2951-2.

46. Gannage, M.; Amoura, Z.; Lantz, O.; Piette, J.-C.; Caillat-Zucman, S. Feto-maternal microchimerism in connective tissue diseases. *Eur J Immunol* 2003; 32:3405-13.
47. Mosca M, Curcio M, Lapi S, Valentini G, D'Angelo S, Rizzo G, Bombardieri S. Correlations of Y chromosome microchimerism with disease activity in patients with SLE: analysis of preliminary data. *Ann Rheum Dis* 2003; 62:651-4.
48. Abdel-Rahman SZ, Nouraldeen AM, Ahmed AE. Molecular interaction of [2,3-¹⁴C] acrylonitrile with DNA in gastric tissue of rat. *J Biochem Toxicol.* 1994 Aug; 9(4):191-8.
49. Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J., Williams, P.M. Real Time Quantitative Pcr. *Genome Res*, V.6, P. 986-994, 1996.
50. Lie, Y.D., Petropoulos, J. Advances In Quantitative Pcr Technology: 5' Nuclease Assays. *Curr Opin Biotechnol*, V.9, P.43-48, 1998.
51. Saiki, R.K., Gelfand, D.H, Stroffel, S., Scharf, S.F, Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA With A Thermostable DNA Polymerase. *Science*, V.239, P. 487-491, 1998.
52. Jacobson DL, Gange SJ, Rose NR, Graham NM. Epidemiology and estimated population burden of selected autoimmune diseases in the United States. *Clin Immunol Immunopathol.* 1997 Sep;84(3):223-43.

53. Davidson A, Diamond B. Autoimmune diseases. *N Engl J Med.* 2001 2;345(5):340-50.
54. Pickering MC, Botto M, Taylor PR, Lachmann PJ, Walport MJ. Systemic lupus erythematosus complement deficiency, and apoptosis. *Adv Immunol.* 2000;76:227-324.
55. Borchers AT, Keen CL, Shoenfeld Y, Gershwin ME. Surviving the butterfly and the wolf: mortality trends in systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev.* 2004 Aug;3(6):423-53.
56. Uramoto KM, Michet CJ Jr, Thumboo J, Sunku J, O'Fallon WM, Gabriel SE. Trends in the incidence and mortality of systemic lupus erythematosus, 1950-1992. *Arthritis Rheum.* 1999 Jan;42(1):46-50.
57. Wakeland EK, Liu K, Graham RR, Behrens TW. Delineating the genetic basis of systemic lupus erythematosus. *Immunity.* 2001 Sep;15(3):397-408.
58. Vyse TJ, Kotzin BL. Genetic susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Annu Rev Immunol.* 1998;16:261-92.
59. Jorgensen TN, Gubbels MR, Kotzin BL. New insights into disease pathogenesis from mouse lupus genetics. *Curr Opin Immunol.* 2004 Dec;16 (6):787-93.

60. Singh RR. SLE: translating lessons from model systems to human disease, *Trends Immunol.* 2005 Nov; 26(11):572-9.
61. Tsokos GC. Immune cell signaling and gene transcription in human lupus: the time has come. *Int Rev Immunol.* 2004 May-Aug; 23(3-4):221-4.
62. Hoffman RW. T cells in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol.* 2004 Oct;113(1):4-13.
63. Finck BK, Linsley PS, Wofsy D. Treatment of murine lupus with CTLA4Ig. *Science.* 1994 Aug 26;265(5176):1225-7.
64. Shlomchik MJ, Madaio MP. The role of antibodies and B cells in the pathogenesis of lupus nephritis. *Springer Semin Immunopathol.* 2003 May;24(4):363-75. Review.
65. Looney RJ, Anolik JH, Campbell D, Felgar RE, Young F, Arend LJ, Sloand JA, Rosenblatt J, Sanz I. B cell depletion as a novel treatment for systemic lupus erythematosus: a phase I/II dose-escalation trial of rituximab. *Arthritis Rheum.* 2004 Aug;50(8):2580-9.
66. Arbuckle MR, McClain MT, Rubertone MV, Scofield RH, Dennis GJ, James JA, Harley JB. Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med.* 2003 Oct 16;349(16):1526-33.

67. Lee LA. Transient autoimmunity related to maternal autoantibodies: neonatal lupus. *Autoimmun Rev.* 2005 Apr;4(4):207-13. Epub 2004 Dec 8. Review.
68. Chan OT, Hannum LG, Haberman AM, Madaio MP, Shlomchik MJ. A novel mouse with B cells but lacking serum antibody reveals an antibody-independent role for B cells in murine lupus. *J Exp Med.* 1999 May 17;189(10):1639-48.
69. Nelson JL. Maternal-fetal immunology and autoimmune disease: is some autoimmune disease auto-alloimmune or allo-autoimmune? *Arthritis Rheum.* 1996 Feb;39(2):191-4.
70. Bianchi DW. Fetal cells in the mother: from genetic diagnosis to diseases associated with fetal cell microchimerism. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2000;92(1):103-8. Review.
71. Stevens AM, Hermes HM, Rutledge JC, Buyon JP, Nelson JL. Myocardial-tissue-specific phenotype of maternal microchimerism in neonatal lupus congenital heart block. *Lancet.* 2003; 15;362:1617-23.
72. Srivatsa B, Srivatsa S, Johnson KL, Samura O, Lee SL, Bianchi DW. Microchimerism of presumed fetal origin in thyroid specimens from women: a case-control study. *Lancet.* 2001 Dec 15;358(9298):2034-8.

73. Christner PJ, Artlett CM, Conway RF, Jimenez SA. Increased numbers of microchimeric cells of fetal origin are associated with dermal fibrosis in mice following injection of vinyl chloride. *Arthritis Rheum.* 2000 Nov;43(11):2598-605.
74. Wang Y, Iwatani H, Ito T, Horimoto N, Yamato M, Matsui I, Imai E, Hori M. Fetal cells in mother rats contribute to the remodeling of liver and kidney after injury. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 Dec 17;325(3):961-7.
75. Launay D, Hebbar M, Hatron PY, Michon-Pasturel U, Queyrel V, Hachulla E, Devulder B. Relationship between parity and clinical and biological features in patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol.* 2001 Mar;28(3):509-13.
76. Pisa FE, Bovenzi M, Romeo L, Tonello A, Biasi D, Bambara LM, Betta A, Barbone F. Reproductive factors and the risk of scleroderma: an Italian case-control study. *Arthritis Rheum.* 2002 Feb;46(2):451-6.
77. Khosrotehrani K, Mery L, Aractingi S, Bianchi DW, Johnson KL. Absence of fetal cell microchimerism in cutaneous lesions of lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis.* 2005 Jan;64(1):159-60.
78. Willer CJ, Sadovnick AD, Ebers GC. Microchimerism in autoimmunity and transplantation: potential relevance to multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2002 May;126(1-2):126-33. Review.

79. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)*. 1992 Apr;10(4):413-7.
80. Bustin, SA. Real-time PCR. pp 1117-1125. In: *Encyclopedia of Diagnostic Genomics and Proteomics*. (J Fuchs and M Podda, Eds) Marcel Dekker Inc New York, 2005.
81. Medawar PB. Some immunological and endocrinological problems raised by evolution of viviparity in vertebrates. *Symp Soc Exp Biol* 1953, 7:320.
82. Mellor AL, Munn DH. Immunology at the maternal-fetal interface: lessons for T cell tolerance and suppression. *Annu Rev Immunol*. 2000;18:367-91. Review.
83. Jiang SP, Vacchio MS. Multiple mechanisms of peripheral T cell tolerance to the fetal "allograft". *J Immunol*. 1998 Apr 1;160(7):3086-90.
84. Kammer GM. Altered regulation of IL-2 production in systemic lupus erythematosus: an evolving paradigm. *J Clin Invest*. 2005 Apr;115(4):836-40.
85. Marrack P, Kappler J, Kotzin BL. Autoimmune disease: why and where it occurs. *Nat Med*. 2001 Aug;7(8):899-905. Review.
86. Anderson DJ, Gage FH, Weissman IL. Can stem cells cross lineage boundaries? *Nat Med*. 2001 Apr;7(4):393-5.

87. Khosrotehrani K, Johnson KL, Lau J, Dupuy A, Cha DH, Bianchi DW. The influence of fetal loss on the presence of fetal cell microchimerism: a systematic review. *Arthritis Rheum.* 2003 Nov;48(11):3237-41. Review.

7. ANEXOS

Anexo 1. Aprovação do Comitê de Ética.



FACULDADE DE MEDICINA DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO
AUTARQUIA ESTADUAL – LEI N.º 8899, de 27/09/94
(Reconhecida pelo Decreto Federal n.º 74.179, de 14/06/74)

Parecer n° 0007/2000

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O Protocolo n° 0418/2000 sob a responsabilidade de Eny Maria Goloni Bertollo, intitulado "Investigação de DNA Fetal no sangue periférico e em tecido renal de pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico" está de acordo com os Princípios Éticos da Resolução 196/96 do Ministério da Saúde e foi aprovado pelo CEP-FAMERP.

São José do Rio Preto, 14 de fevereiro de 2000.


PROF. DR. JOSÉ PAULO CIPULLO
PRESIDENTE DO CEP

Av: Brigadeiro Faria Lima, 5416 – Cep 15.090-000 – Fone: (017) 227-5733
Fax: 227-1277 – São José do Rio Preto – São Paulo – Brasil

Anexo 2. Aprovação do CONEP.



MINISTERIO DA SAUDE
Conselho Nacional de Saude
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

PARECER Nº 682/2000

Processo nº 25000.016530/00-00 Registro CONEP = 1529 (Protocolo CEP 0418/2000)
Projeto de Pesquisa: "Investigação de DNA fetal no sangue periférico e em tecido renal de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico"
Pesquisador Responsável: Dra. Fny Maria Goloni Bertollo
Instituição: Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto / UBR
Data de entrada na CONEP: 19/07/2000
Área Temática Especial: Genética Humana

Ao se proceder a análise do protocolo em questão, cabem as seguintes considerações:

a) as informações enviadas atendem aos aspectos fundamentais da Resolução CNS 196/96, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos;

b) o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa - CEP da instituição supracitada.

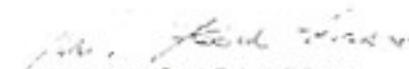
Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto, com as seguintes recomendações a serem acompanhadas pelo CEP:

1- descrever nos Termos de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE, os riscos relacionados à coleta de material biológico, conforme itens VI e XVI do resumo do protocolo

2- informar no campo 49 da folha de rosto, datas previstas para apresentação de relatórios da pesquisa, dando ciência ao pesquisador

Situação: Projeto aprovado com recomendações

Brasília, 21 de agosto de 2000.


WILLIAM SAAD HOSSNF
Coordenador da CONEP-MS

8. APÊNDICES

Apêndice 1. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.



Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
Autarquia Estadual – lei n.º 8899, de 27/09/94
(RECONHECIDA PELO DECRETO FEDERAL N.º 74.179, DE 14/06/74)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Conselho Nacional de Saúde, resolução 196/96)

Eu, _____,
RG _____, nascido(a) em ____/____/____ e domiciliado(a) à _____, município de _____ usuário (a) (ou responsável legal pelo usuário) _____, declaro que consinto em participar como voluntário (a) do projeto de pesquisa “Investigação de DNA Fetal no Sangue Periférico e em Tecido Renal de Pacientes com Lupus Eritematoso Sistêmico” sob responsabilidade da pesquisadora Dra. Eny Maria Goloni Bertollo (CRB 06661-01). Declaro que fui satisfatoriamente esclarecido que: A) o estudo será feito utilizando-se sangue, que será colhido com seringa descartável e realizado por profissionais habilitados nos pacientes portadores de Lúpus Eritematoso Sistêmico; B) não haverá nenhum risco adicional para minha saúde; C) que posso consultar a pesquisadora responsável em qualquer época, pessoalmente ou pelo telefone 17 - 227 5733, ramal 114/141, para esclarecimento de qualquer dúvida; D) que estou livre para, a qualquer momento, deixar de participar da pesquisa e que não preciso apresentar justificativas para isso; E) que todas as informações por mim fornecidas e os resultados serão mantidos em sigilo e que, estes últimos só serão utilizados para divulgação em reuniões e revistas científicas; F) que serei informado de todos os resultados, independentemente, do fato destes poderem mudar meu consentimento em participar da pesquisa; G) que esse estudo é importante porque pode colaborar no esclarecimento dos mecanismos que resultam nessa doença.

Assim, consinto em participar do projeto de pesquisa em questão.

São José do Rio Preto, ____ de _____, 2004.

Usuário / Responsável legal

Pesquisador Responsável

**Apêndice 2. Ficha utilizada para levantamento de dados do Protocolo do Projeto
“Investigação de DNA Fetal no Sangue Periférico de Pacientes com
Lúpus Eritematoso Sistêmico”.**

FORMULÁRIO DA PACIENTE COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO

Nome:.....

RG do Prontuário da Paciente (HB): Data de Nascimento:/...../.....

Endereço:

Cidade: CEP: Telefone:

Profissão: Raça: oriental caucasiana negróide

Fez transfusão sanguínea: Não Sim – há quanto tempo?

Fez transplante renal: Não Sim – há quanto tempo?

Número de filhos: ♂: ♀: Saudáveis?

Data de nascimento do(s) filho(s): ♂:
♀:

Aborto: Não Sim – nº

Qual a idade quando diagnosticada a doença?

Diabético: Não Sim

Consome aspartame (adoçante): Muito Mais ou menos Pouco Nunca

Apresentou alguma infecção viral próximo ao diagnóstico: Não Sim – Qual?.....

.....

Toma algum tipo de medicamento como anticoncepcional, anti-hipertensivo, ou qualquer outro. Há quanto tempo?

.....

Já fez tratamento hormonal: Não Sim - Desde quando e por quanto tempo?.....

Ciclo menstrual: Atualmente: Normal Irregular

Em algum momento: Sempre normal Já foi irregular - Quando?.....

.....

Diagnóstico de sífilis: Não Sim – quando?.....

Parentes que apresentam Lúpus Eritomatoso Sistêmico (nome, endereço e telefone):

.....

.....

.....

