



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Faculdade de Ciências Médicas

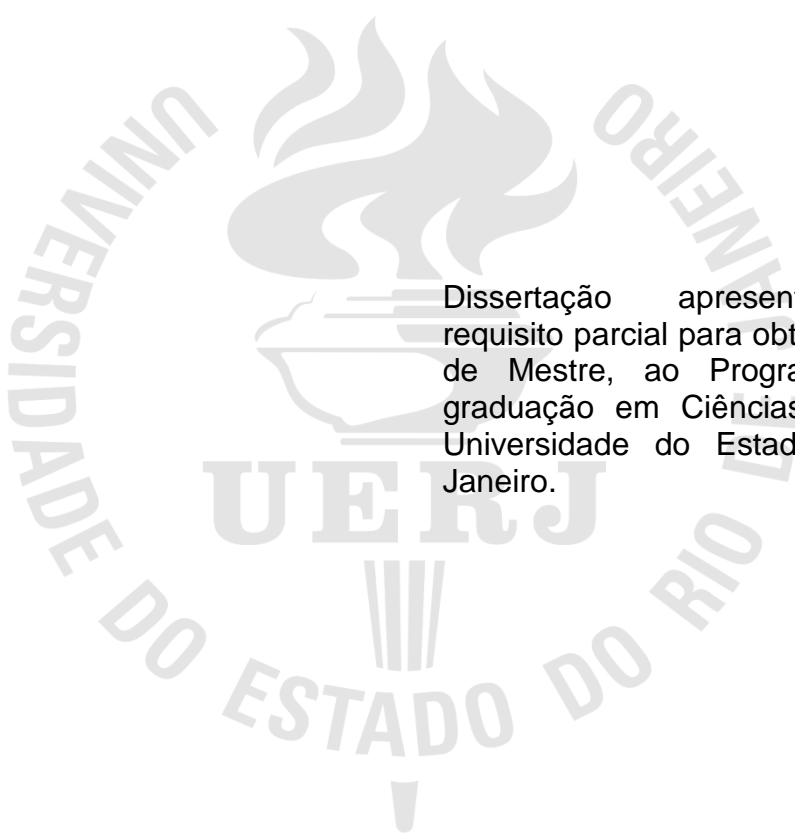
Guilherme Ribeiro Ramires de Jesús

**Avaliação de fatores angiogênicos e antiangiogênicos em
pacientes com lúpus eritematoso sistêmico**

Rio de Janeiro
2014

Guilherme Ribeiro Ramires de Jesús

**Avaliação de fatores angiogênicos e antiangiogênicos em
pacientes com lúpus eritematoso sistêmico**



Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Evandro Mendes Klumb

Rio de Janeiro

2014

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

D278 De Jesús, Guilherme Ribeiro Ramires de.

Avaliação de fatores angiogênicos e antiangiogênicos em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico / Guilherme Ribeiro Ramires de Jesús. - 2014.

84 f.

Orientador: Evandro Mendes Klumb.

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Ciências Médicas.

1. Lúpus Eritematoso Sistêmico - Teses. 2. Nefrite Lúpica - Fisiopatologia. 3. Fatores de Crescimento do Endotélio Vascular. 4. Receptores Proteína Tirosina Quinases. I. Klumb, Evandro Mendes. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

CDU 616.5-002.5

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Guilherme Ribeiro Ramires de Jesús

**Avaliação de fatores angiogênicos e antiangiogênicos em
pacientes com lúpus eritematoso sistêmico**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 26 de junho de 2014.

Orientador: Prof. Evandro Mendes Klumb
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Denizar Vianna Araújo
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Prof. Dr. Roger Abramino Levy
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Prof.^a Dra. Blanca Elena Rios Gomes Bica
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Geraldo da Rocha Castelar Pinheiro
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Rio de Janeiro

2014

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese à minha família e à Universidade do Estado do Rio de Janeiro, como forma de retribuição pela minha formação.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer minha família, pois sem ela jamais chegaria neste momento. À minha mãe Eni que, apesar de não saber medicina, é especialista em uma área muito mais delicada e muito mais difícil, que é ser mãe. A presença constante e incondicional é única, compartilhando os momentos felizes e a permitindo a resolução das dificuldades encontradas. Ao meu pai Nilson, a quem coube a dupla missão de participar do ambiente familiar e profissional. Foi o responsável por me levar para o estudo de uma área que, teoricamente, não tem relação com a minha formação mas sem dúvidas é fascinante. Agradeço os bons momentos em família, os conhecimentos médicos transmitidos e os ensinamentos sobre cuidar do próximo. À minha esposa Fernanda, pelo carinho diário, compreensão inabalável nos momentos de ausência e alegria nos momentos juntos. Sempre foi e sempre será uma grande incentivadora dos meus sonhos, por mais singulares que eles sejam.

Agradeço ao meu orientador Professor Evandro Klumb, pela parceria que já se aproxima de uma década e pela grande influência em minha formação. O entusiasmo pelo conhecimento e a vontade de ajudar ao próximo são contagiantes e exemplos para as pessoas que iniciam tanto a vida profissional quanto acadêmica.

Aos meus amigos da Reumatologia, agradeço por me sentir em casa e não como um intruso de outra área. Ao professor Roger Levy, pela troca de conhecimento constante e por investir nas pessoas sem exigir nada em troca. À Dra Camila Souto Oliveira, que nos períodos de ausência manteve o projeto em funcionamento mesmo com suas obrigações assistenciais. À aluna de graduação Haizza Monteiro, pela ajuda na obtenção dos dados. Agradeço aos Professores Geraldo da Rocha Castelar Pinheiro, Elisa Martins das Neves de Albuquerque e Francinne Machado Ribeiro por permitirem o desenvolvimento do projeto em seu Departamento.

Agradeço ao Professor Luis Cristóvão Porto e à equipe do Laboratório Cápsula, da Policlínica Piquet Carneiro, principalmente a Adriana Nascimento e Luciano Carius, pela realização dos testes ELISA. A falta de conhecimento técnico sobre os procedimentos laboratoriais foi facilmente contornada com esta cooperação, o que permitiu maior liberdade para o desenvolvimento do projeto.

Também agradeço aos meus amigos da Obstetrícia que, apesar de a maioria não participar diretamente deste estudo, estão presentes no dia-a-dia e tornando o trabalho mais fácil e prazeroso. Ao Dr. Gustavo Rodrigues, pelas várias centrifugações e congelamentos de soro sem nunca pedir nada em troca. À Dra. Flávia Cunha, pelo otimismo constante e as inúmeras horas compartilhadas na assistência. Aos residentes da Obstetrícia, que permitem o funcionamento de um serviço imensamente especializado e diferenciado.

Aos funcionários do HUPE, em especial à secretária do pré-natal Cristiana, por permitirem acesso aos prontuários das pacientes principalmente quando o tempo já não era aliado.

Agradeço às pacientes do HUPE, por permitirem a realização do estudo e por estarem sempre dispostas a colaborar na ampliação do conhecimento. Espero poder retribuir à altura e ajuda-las da melhor maneira possível.

He therefore who doubts and yet seeks not is at once
thoroughly unhappy and thoroughly unfair.

Blaise Pascal

RESUMO

DE JESÚS, Guilherme Ribeiro Ramires. *Avaliação de fatores angiogênicos e antiangiogênicos em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico*. 2014. 84 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença autoimune cuja fisiopatologia envolve mecanismos imunológicos, incluindo distúrbios nos processos de morte celular e nos mecanismos de eliminação de autoantígenos e de tolerância, acompanhados da formação de autoanticorpos patogênicos. Ele acomete principalmente mulheres jovens e a gestação nestas pacientes apresenta significativa morbimortalidade. Os achados clínicos e laboratoriais na nefrite lúpica são semelhantes àqueles encontrados em pacientes com pré-eclâmpsia (PE), especificamente hipertensão arterial, proteinúria e edema. Foi proposto o uso de fatores angiogênicos, como o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e o fator de crescimento placentário (PIGF), e antiangiogênicos, como o receptor Fms-like tirosina quinase 1 solúvel (sFlt-1), para o diagnóstico diferencial entre estas duas condições, no entanto os dados disponíveis na literatura sobre estas citocinas em pacientes não gestantes com LES são inconsistentes. Este estudo foi desenhado para avaliar se existe diferença entre os níveis séricos de VEGF, PIGF e sFlt-1 em pacientes com LES com e sem atividade sistêmica da doença e se existe diferença nesses fatores quando comparamos pacientes com LES e mulheres saudáveis. Foram incluídas 54 mulheres com diagnóstico de LES em acompanhamento no ambulatório de Reumatologia do HUPE-UERJ, sem outra doença autoimune diagnosticada, e divididas de acordo com a atividade da doença. 30 pacientes tinham doença inativa (SLEDAI médio: 0,7) e 24 tinham doença ativa (SLEDAI médio: 11,6). 23 mulheres deste último grupo possuíam nefrite ativa, enquanto 20 das pacientes com doença em remissão já haviam apresentado nefrite ao longo da evolução do LES. O grupo controle foi formado por 34 mulheres hígdas atendidas no ambulatório de ginecologia da Policlínica Piquet Carneiro-UERJ. Considerando as três citocinas estudadas, as pacientes com LES apresentaram valores séricos médios superiores às mulheres do grupo controle (VEGF: $319,0 \pm 226,0$ x $206,2 \pm 119,4$, $p=0,02$; PIGF: $42,2 \pm 54,1$ x $13,6 \pm 21,6$, $p=0,02$; sFlt-1: $107,9 \pm 49,2$ x $70,2 \pm 95,0$, $p=0,01$). O grupo de pacientes com doença ativa também apresentou média superior ao controle nos três fatores (VEGF: $331,0 \pm 216,8$ x $206,2 \pm 119,4$, $p=0,02$; PIGF: $41,2 \pm 47,3$ x $13,6 \pm 21,6$, $p=0,02$; sFlt-1: $120,5 \pm 42,4$ x $70,2 \pm 95,0$, $p=0,02$), enquanto não foi encontrada diferença estatística entre o grupo de LES inativo e o controle. A média do sFlt-1 sérico foi maior nas pacientes com LES ativo do que a média das pacientes com a doença em remissão ($120,5 \pm 54,9$ x $97,8 \pm 42,4$, $p=0,02$), mas não houve diferença significativa da média do VEGF e PIGF séricos entre os dois grupos. O melhor entendimento dos fatores angiogênicos e antiangiogênicos em pacientes com LES proporcionado por este estudo nos permite a análise dessas citocinas em gestantes com LES e, possivelmente, sua posterior aplicação como método diferencial entre nefrite lúpica e PE.

Palavras-chave: Lúpus Eritematoso Sistêmico. Nefrite Lúpica. Fator de Crescimento do Endotélio Vascular. VEGF. PIGF. sFlt-1.

ABSTRACT

DE JESÚS, Guilherme Ribeiro Ramires. *Evaluation of angiogenic and antiangiogenic factors in patients with systemic lupus erythematosus*. 2014. 84 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

Systemic lupus erythematosus (SLE) is an autoimmune disease which pathophysiology involves immunological mechanisms including disturbances in the processes of cell death and mechanisms of elimination of autoantigens and tolerance, accompanied by formation of pathogenic autoantibodies. It mainly affects young women and pregnancy in these patients have significant morbidity and mortality. Clinical and laboratory findings in lupus nephritis are similar to those found in patients with preeclampsia (PE), specifically hypertension, proteinuria and edema. It has been proposed the use of angiogenic factors, such as vascular endothelial growth factor (VEGF) and placental growth factor (PlGF), and antiangiogenic factors, as soluble Fms-like tyrosine kinase-1 (sFlt-1), for the differential diagnosis between these two conditions, however available data in the literature about these cytokines in non-pregnant SLE patients are inconsistent. This study was designed to evaluate whether there are differences between serum levels of VEGF, PlGF and sFlt-1 in SLE patients with and without systemic disease activity and whether there are differences in these factors when comparing SLE patients with healthy women. 54 women with SLE followed at outpatient clinic of Rheumatology HUPE - UERJ were included. They had no other autoimmune disease diagnosed and were divided according to disease activity. 30 patients had inactive disease (mean SLEDAI: 0.7), and 24 had active disease (mean SLEDAI: 11.6). 23 women in this latter group had active nephritis, while 20 patients with inactive disease had history of lupus nephritis. The control group consisted of 34 healthy women who attended the Gynecology outpatient clinic at Policlínica Piquet Carneiro - UERJ. Considering the three studied cytokines, the SLE patients had higher mean serum levels than the control group (VEGF: 319.0 ± 226.0 x 206.2 ± 119.4 , $p=0.02$; PlGF: 42.2 ± 54.1 x 13.6 ± 21.6 , $p=0.02$; sFlt-1: 107.9 ± 49.2 x 70.2 ± 95.0 , $p=0.01$). The group of patients with active disease also had higher mean levels of all three factors than controls (VEGF: 331.0 ± 216.8 x 206.2 ± 119.4 , $p=0.02$; PlGF: 41.2 ± 47.3 x 13.6 ± 21.6 , $p=0.02$; sFlt-1: 120.5 ± 42.4 x 70.2 ± 95.0 , $p=0.02$), whereas no statistical difference was found between the group with inactive SLE and the control group. The mean sFlt-1 levels were higher in patients with active SLE than the mean levels of patients with inactive disease (120.5 ± 54.9 x 97.8 ± 42.4 , $p=0.02$), but there was no significant difference in mean serum of VEGF and PlGF levels between these two groups. A better understanding of angiogenic and antiangiogenic factors in patients with SLE provided by this study allows the analysis of these cytokines in pregnant woman with SLE and possibly their subsequent application as differential method between PE and lupus nephritis.

Keywords: Systemic Lupus Erythematosus. Lupus Nephritis. Vascular Endothelial Growth Factor. VEGF. PlGF. sFlt-1.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Principais manifestações clínicas das pacientes com LES incluídas no estudo.....	35
Gráfico 1 –	Gráfico de dispersão sobre os valores séricos de VEGF encontrados em pacientes com LES e em mulheres do grupo controle.....	41
Gráfico 2 –	Gráfico de dispersão sobre os valores séricos de PIGF encontrados em pacientes com LES e em mulheres do grupo controle.....	42
Gráfico 3 –	Gráfico de dispersão sobre os valores séricos de sFlt-1 encontrados em pacientes com LES e em mulheres do grupo controle.....	42
Gráfico 4 –	Gráfico de dispersão sobre os valores séricos de VEGF encontrados em pacientes com LES de acordo com a atividade da doença.....	45
Gráfico 5 –	Gráfico de dispersão sobre os valores séricos de PIGF encontrados em pacientes com LES de acordo com a atividade da doença.....	45
Gráfico 6 –	Gráfico de dispersão sobre os valores séricos de sFlt-1 encontrados em pacientes com LES de acordo com a atividade da doença.....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Características demográficas e relacionadas ao diagnóstico e duração do LES de acordo com a atividade da doença.....	34
Tabela 2 –	Dados clínicos relacionados ao LES, avaliação laboratorial da função renal e análise histopatológica da biópsia renal das pacientes com LES de acordo com a atividade da doença.....	37
Tabela 3 –	Medicações em uso pelas pacientes com LES de acordo com a atividade da doença.....	39
Tabela 4 –	Características demográficas do grupo controle comparadas com as das pacientes com LES.....	40
Tabela 5 –	Valores de VEGF, PIGF e sFlt-1 séricos encontrados nas pacientes com LES incluídas no estudo e valores encontrados em mulheres do grupo controle.....	41
Tabela 6 –	Valores de VEGF, PIGF e sFlt-1 séricos encontrados em pacientes com LES de acordo com a atividade da doença e valores encontrados em mulheres do grupo controle.....	44
Tabela 7 –	Valores de VEGF, PIGF e sFlt-1 séricos encontrados em pacientes com LES inativo com história de nefrite e valores encontrados em mulheres do grupo controle.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAS	Ácido acetilsalicílico
ADMA	Dimetilarginina assimétrica, do inglês <i>asymmetric dimethylarginine</i>
ARA II	Antagonistas do receptor da angiotensina II
BAFF	Fator ativador da célula B, do inglês <i>B-cell activating factor</i>
BLyS	Estimulador do linfócito B, do inglês <i>B lymphocyte stimulator</i>
CAC	Células angiogênicas circulantes
CSF-1	Fator estimulador de colônias-1, do inglês <i>colony-stimulating factor-1</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
EPC	Células progenitoras endoteliais, do inglês <i>endothelial progenitor cells</i>
FCM	Faculdade de Ciências Médicas
FIt-1	Receptor transmembrana <i>Fms-like</i> tirosina quinase 1, do inglês <i>Fms-like tyrosine kinase-1</i>
H0	Hipótese nula
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HDL	Lipoproteína de alta densidade, do inglês <i>high density lipoprotein</i>
HUPE	Hospital Universitário Pedro Ernesto
IC	Intervalo de confiança
IECA	Inibidor da enzima conversora da angiotensina
IFN	Interferon
IL	Interleucina
ISN/RPS	Sociedade Internacional de Nefrologia / Sociedade de Patologia Renal, do inglês <i>International Society of Nephrology / Renal Pathology Society</i>
LDL	Lipoproteína de baixa densidade, do inglês <i>low density lipoprotein</i>
mRNA	RNA mensageiro, do inglês <i>messenger RNA</i>
NF-κB	Fator nuclear kappa de cadeia leve das células B ativadas, do inglês <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NK	<i>Natural Killer</i>
LES	Lúpus eritematoso sistêmico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação em cadeia de polimerase, do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>

PE	Pré-eclâmpsia
PIGF	Fator de crescimento placentário, do inglês <i>placental growth factor</i>
RNAm	RNA mensageiro
SAF	Síndrome antifosfolípideo
sFlt-1	Receptor <i>Fms-like</i> tirosina quinase 1 solúvel, do inglês <i>soluble Fms-like tyrosine kinase-1</i>
sVEGFR-1	Receptor do fator de crescimento vascular endotelial 1 solúvel, do inglês <i>soluble vascular endothelial growth factor receptor 1</i>
SLEDAI	Índice de atividade do LES, do inglês <i>Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index</i>
SLICC	<i>Systemic Lupus International Collaborative Clinics DI</i>
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TGF	Fator de transformação do crescimento, do inglês <i>transforming growth factor</i>
TNF	Fator de necrose tumoral, do inglês <i>tumor necrosis factor</i>
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro
VCAM-1	Moléculas de adesão celular vascular 1, do inglês <i>vascular cell adhesion molecule 1</i>
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular, do inglês <i>vascular endothelial growth factor</i>
VLDL	Lipoproteína de densidade muito baixa, do inglês <i>very low density lipoprotein</i>

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	15
1	ASPECTOS CLÍNICOS RELACIONADOS AO LÚPUS	16
1.1	Aspectos fisiopatológicos do acometimento renal do LES	16
1.2	Gestação em pacientes com LES	18
2	PRÉ-ECLÂMPسيا	19
2.1	Aspectos fisiopatológicos da pré-eclâmpسيا	19
2.2	Fatores angiogênicos e antiangiogênicos na pré-eclâmpسيا	20
3	FATORES ANGIOGÊNICOS E ANTIANGIOGÊNICOS EM PACIENTES COM LES	23
4	OBJETIVOS	25
4.1	Objetivo primário	25
4.2	Objetivo secundário	25
5	JUSTIFICATIVA	26
6	MATERIAL E MÉTODOS	27
6.1	Grupos de análise	28
6.1.1	<u>Pacientes não gestantes com lúpus eritematoso sistêmico em atividade</u>	28
6.1.2	<u>Pacientes não gestantes com lúpus eritematoso sistêmico inativo</u>	28
6.1.3	<u>Pacientes não gestantes sem doença autoimune e sem uso de medicação imunossupressora</u>	28
6.2	Tamanho amostral	29
6.3	Procedimentos	29
6.3.1	<u>Quantificação das citocinas através do método ELISA</u>	31
6.4	Análise estatística	32
7	RESULTADOS	33
7.1	Características demográficas e aspectos clínicos das pacientes com LES	33
7.2	Características demográficas do grupo controle	39
7.3	Análise comparativa dos valores do VEGF, PlGF e sFlt-1 encontrados nas pacientes com LES e no grupo controle	40

7.4	Análise comparativa dos valores do VEGF, PIGF e sFlt-1 encontrados nas pacientes com LES de acordo com a atividade da doença e no grupo controle.....	43
7.5	Análise comparativa dos valores do VEGF, PIGF e sFlt-1 encontrados nas pacientes com LES inativo com história de nefrite e no grupo controle.....	46
8	DISCUSSÃO.....	48
	CONCLUSÕES.....	58
	REFERÊNCIAS.....	59
	APÊNDICE A – Termo de consentimento livre e esclarecido.....	66
	APÊNDICE B – Ficha clínica para pacientes com LES.....	67
	APÊNDICE C – Medida da Atividade da Doença Lúpus Eritematoso Sistêmico (SLEDAI).....	69
	APÊNDICE D – Índice de dano cumulativo (SLICC).....	70
	APÊNDICE E – Termo de consentimento para o grupo controle.....	72
	APÊNDICE F – Ficha clínica das mulheres do grupo controle, com exposição dos dados pertinentes ao presente estudo.....	73
	APÊNDICE G – The use of angiogenic and antiangiogenic factors in the differential diagnosis of pre-eclampsia, antiphospholipid syndrome nephropathy and lupus nephritis (Artigo científico em revisão para publicação)	76
	APÊNDICE H –. Citocinas angiogênicas na pré-eclâmpsia e na nefrite lúpica (Artigo científico).....	80

INTRODUÇÃO

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença autoimune cuja fisiopatologia envolve mecanismos imunológicos, incluindo distúrbios nos processos de morte celular e nos mecanismos de eliminação de autoantígenos e de tolerância (central e periférica), acompanhados da formação de autoanticorpos patogênicos. Apesar de permanecer obscura a razão pela qual muitos desses mecanismos se desenvolvem, existe evidência robusta na literatura que demonstram serem eles secundários à interação entre fatores genéticos, hormonais e ambientais. A maioria das pacientes com LES está em idade reprodutiva (entre 26 e 40 anos) e as manifestações clínicas podem ser leves ou graves com acometimento de múltiplos órgãos, incluindo rins (nefrite), pulmões (pneumonite), fígado (hepatite) e cérebro (1). É característica a evolução com períodos de atividade (inflamatória) e outros de remissão dos sintomas e, apesar de a maioria dos pacientes com LES terem um curso evolutivo relativamente benigno, com mínima ou nenhuma redução na sobrevida, os que têm acometimento renal têm caracteristicamente maior morbimortalidade (2).

1 ASPECTOS CLÍNICOS RELACIONADOS AO LÚPUS

1.1 Aspectos fisiopatológicos do acometimento renal do LES

A glomerulonefrite, que é a forma mais típica de acometimento renal no LES, tem fisiopatologia complexa e envolve principalmente a deposição de imunocomplexos na membrana basal glomerular. Sequencialmente, ocorre a ativação do sistema de complemento, proliferação de células residentes e migração de leucócitos, em associação à produção de matriz extracelular, de quimiocinas e de citocinas pró-inflamatórias. Algumas dessas moléculas têm sido associadas à fisiopatologia da autoimunidade como o estimulador de linfócito B (BLyS)/fator ativador da célula B (BAFF), interleucina (IL)-17, IL-23, IL-6, IL-10, fator de necrose tumoral (TNF) alfa e interferon (IFN) alfa. Outras estão mais diretamente relacionadas às alterações teciduais como o fator de transformação do crescimento (TGF) beta, o fator estimulador de colônias-1 (CSF-1), o IFN tipo I produzido pelas células renais residentes (2) e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF, do inglês *vascular endothelial growth factor*). O resultado deste processo inflamatório são as alterações histopatológicas observadas à biópsia renal que incluem aumento da matriz extracelular e da celularidade no mesângio, proliferação de células endocapilares, infiltração de polimorfonucleares, linfócitos, monócitos e formação de crescentes celulares associados a depósitos de imunocomplexos. Também são frequentes as alterações vasculares ainda que estas não sejam empregadas para definir a classe histológica (3). As alterações mais frequentes incluem as lesões necrosantes na parede vascular, com depósito imune e redução da luz, e necrose fibrinoide em vasos de pequeno e médio calibre com infiltração inflamatória mural (4).

Dentre as citocinas relacionadas mais intensamente às alterações vasculares, o VEGF tem sido o fator mais estudado. A maioria dos autores relatou que não há aumento deste fator no LES com doença inativa em comparação ao grupo controle (5-9). Em relação à doença ativa, a maior parte dos autores encontrou aumento de VEGF (5, 6, 8, 9), sendo que Navarro relatou aumento maior nas pacientes com insuficiência renal comparativamente com as pacientes com função renal normal (10). Já Hrycek encontrou resultados semelhantes ao controle mesmo no LES ativo (7).

Estudo realizado por Avihingsanon e colaboradores investigou a expressão do RNA mensageiro (mRNA) do VEGF renal em material obtido através de biópsia para caracterização de nefrite em 35 pacientes com lúpus. Vinte e sete pacientes tiveram o diagnóstico histopatológico de nefrite lúpica classe IV e oito pacientes foram diagnosticadas como portadoras de nefrite classe III segundo a classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS) e da Sociedade Internacional de Nefrologia / Sociedade de Patologia Renal (ISN/RPS, do inglês *International Society of Nephrology / Renal Pathology Society*) (3). Os níveis de mRNA VEGF foram menores nas pacientes com nefrite lúpica quando comparados com o controle, apresentando correlação negativa com formação de crescentes, com altos valores do índice de atividade medido através de achados patológicos descritos por Austin e colaboradores (11) e com proliferação difusa endocapilar. No entanto, amostras com mais de 25% de infiltração neutrofílica glomerular não mostraram diferença no VEGF. Os autores encontraram, através da análise de uma curva ROC, nível de mRNA capaz de predizer 53% dos casos de perda de função renal (dobrando a creatinina sérica ou doença renal em estágio terminal) em 12 meses (12).

Formulou-se a hipótese que a redução intrarrenal de VEGF seria causada pela perda de células podócitárias na urina, já que o mesmo autor demonstrou em estudo anterior aumento de VEGF urinário em pacientes com nefrite lúpica comprovadas por biópsia (13). Os autores analisaram as amostras urinárias de 21 pacientes no dia da realização da biópsia utilizada para medir o VEGF mRNA intrarrenal e encontraram aumento de WT-1, um marcador podocitário, e de VEGF quando comparadas com o controle (12).

A comparação desse resultado apresentado por Avihingsanon e colaboradores com os outros autores que estudaram o VEGF sérico não pode ser feita, pois os métodos de quantificação (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction* x ELISA, do inglês *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) e os materiais obtidos (tecido x soro) eram distintos. Os efeitos locais do VEGF podem ser diferentes da resposta sistêmica e as medicações imunossupressoras utilizadas pelos pacientes podem servir como fator de confusão. O autor ainda comenta que a detecção do VEGF é de diferentes fontes celulares nestes dois modelos de estudo, sendo o VEGF sérico originado das células endoteliais e o VEGF renal originado das células epiteliais tubulares e podócitos (12).

1.2 Gestação em pacientes com LES

Devido à maior prevalência do LES em mulheres em idade fértil, a gestação nessas pacientes não é uma condição incomum e ao mesmo tempo é interessante notar que diversos achados clínicos e laboratoriais na nefrite lúpica são semelhantes àqueles encontrados em pacientes com pré-eclâmpsia (PE) grave, especificamente hipertensão arterial sistêmica (HAS), proteinúria e edema (14). As reativações do LES durante a gestação são na maioria das vezes leves (15), no entanto a reativação grave da doença pode ocorrer em 25-30% das gestantes com lúpus (16), podendo a doença surgir durante a gravidez ou no período pós-parto (15).

Em revisão sistemática recente de 2751 gestações em 1842 pacientes com LES, foi encontrada reativação da doença em 25,6% dos casos, HAS em 16,3%, nefrite em 16,1%, PE em 7,6%, eclâmpsia em 0,8% e prematuridade em 39,4% dos partos. Houve associação positiva entre parto prematuro e nefrite ativa, assim como entre HAS e nefrite ativa ou história de nefrite (17).

A revisão de 76 gestações em 63 pacientes com lúpus acompanhadas no Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE) encontrou resultados semelhantes, com 15% das pacientes tendo desenvolvido PE e 30% HAS. Neste mesmo estudo, 14 pacientes precisaram aumentar as doses de corticosteroides durante a gestação e 27% dos fetos apresentaram sofrimento fetal crônico. Os partos ocorreram numa idade gestacional média de 35 semanas e foi notada maior incidência de óbito fetal em pacientes com nefrite comparadas às pacientes sem nefrite (37% x 12,2%) (18).

Além dos resultados adversos maternos e perinatais associados à PE e ao LES, o diagnóstico diferencial entre as duas condições é complexo, pois ambas podem apresentar aumento de proteinúria, HAS, trombocitopenia e deterioração da função renal. A queda dos níveis das proteínas do complemento sérico, que pode ocorrer principalmente na reativação das glomerulonefrites proliferativas no lúpus e auxiliariam no diagnóstico diferencial com a PE, pode não ser observada em decorrência do aumento fisiológico das proteínas do sistema complemento durante a gestação (15).

2 PRÉ-ECLÂMPسيا

2.1 Aspectos fisiopatológicos da pré-eclâmpسيا

A PE é uma desordem multifuncional de causa desconhecida que é exclusiva da gestação humana. É caracterizada pela resposta vascular anormal à placentação, levando ao aumento da resistência vascular periférica, da agregação plaquetária, ativação do sistema de coagulação e disfunção endotelial. Os achados clínicos de PE podem se manifestar como uma síndrome materna, com HAS e proteinúria com ou sem outras anormalidades multissistêmicas, e/ou uma síndrome fetal, apresentando restrição do crescimento intrauterino, oligodramnia e oxigenação deficiente (19).

A pré-eclâmpسيا é a uma das principais causas de morbimortalidade materna, morte perinatal, parto pré-termo e restrição de crescimento intrauterino. Apesar de um bom desfecho para a maioria das gestantes, o atraso no seu diagnóstico pode favorecer a evolução para sua forma mais grave, a eclampsia, caracterizada por uma ou mais convulsões sobrepostas aos achados de pré-eclâmpسيا. Enquanto nos países desenvolvidos a frequência de eclampsia é de uma para duas mil gestações, nos países em desenvolvimento pode chegar até a uma em cada cem gestações. (20).

Apesar do grande número de pesquisas, a etiologia da pré-eclâmpسيا continua desconhecida. Existem duas correntes de pensamento atuais, que são discordantes: o modelo isquêmico, no qual a isquemia e a reperfusão resultam em estresse oxidativo e doença vascular; e o modelo imunológico, que considera uma má adaptação imune maternopaternal, isto é, uma reação aloimune materna disparada pela rejeição do aloenxerto fetal (19).

A disfunção endotelial generalizada pode ser responsável por todos os aspectos clínicos encontrados na pré-eclâmpسيا e a identificação de fatores circulantes que servem como mediadores desta disfunção tornou-se assunto de grande interesse nas últimas décadas. Diversos grupos publicaram alterações em citocinas, fatores de crescimento e químicos, como TNF- α , IL-6, IL-1 α , IL-1 β , ligante de Fas, produtos lipídicos oxidados, neuroquinina-B e dimetilarginina assimétrica (ADMA), que são liberados pela placenta e/ou outras fontes maternas na pré-eclâmpسيا (21).

2.2 Fatores angiogênicos e antiangiogênicos na pré-eclâmpsia

Independentemente do modelo proposto como causa da pré-eclâmpsia, sabe-se que na gestação normal existe uma interação do trofoblasto endovascular e dos leucócitos decíduais, especialmente células natural-killer (NK), resultando na liberação de mitógenos responsáveis pela angiogênese necessária para o desenvolvimento placentário, principalmente o VEGF e o fator de crescimento placentário (PIGF, do inglês *placental growth factor*). Concentrações elevadas de VEGF livre também são importantes para manter em repouso o endotélio, apesar do estresse inflamatório típico que envolve uma gestação normal (19). Outras funções do VEGF incluem induzir a produção de óxido nítrico e prostaciclina vasodilatadora pelas células endoteliais, reduzindo o tônus vascular e a pressão arterial; promover a recuperação glomerular em modelo animal de glomerulonefrite e microangiopatia trombótica; e aumentar a permeabilidade vascular (22). Estudos sobre fatores antiangiogênicos demonstraram que o bloqueio de seus sinalizadores resultou em HAS e proteinúria (22). Considerando estes dados, o VEGF apresenta um papel importante não apenas na regulação da pressão sanguínea mas também em manter a integridade da barreira de filtração glomerular durante a gestação (22, 23).

Maynard e colaboradores pesquisaram em tecido placentário de mulheres com e sem pré-eclâmpsia, o mRNA do receptor *Fms-like* tirosina quinase-1 solúvel (sFlt-1, do inglês *soluble Fms-like tyrosine kinase-1*) e encontraram aumento de sua expressão apenas nas mulheres com pré-eclâmpsia. O sFlt-1, também chamado de sVEGFR-1, é um dos dois receptores solúveis para o VEGF (6) e possui alta afinidade pelo VEGF, à semelhança do que ocorre com o receptor de membrana VEGFR-1. O sFlt-1 é uma variante solúvel do receptor de VEGF Flt-1 que não possui domínios transmembrana e citoplasmáticos, agindo como potente antagonista de VEGF e PIGF, apresentando, portanto, um perfil inibidor da ação dessas duas citocinas, o que poderia ser considerado uma atividade antiangiogênica. O mesmo grupo formulou a hipótese que o sFlt-1 circulante em excesso secretado pela placenta na pré-eclâmpsia levaria a disfunção endotelial, HAS e proteinúria ao antagonizar o VEGF e PIGF circulantes (22).

Continuando seu estudo, Maynard demonstrou que os níveis de sFlt-1 sérico medidos pelo método ELISA em pacientes com pré-eclâmpsia eram maiores que os

de gestantes com pressão arterial normal, chegando o aumento a cinco vezes no caso de pré-eclâmpsia grave. Este achado foi confirmado por outros autores (24). Foi demonstrado neste grupo de pacientes que os valores séricos das frações livres de VEGF e PIGF estavam reduzidos proporcionalmente ao aumento de sFlt-1, sugerindo que o sFlt-1 atuaria como antagonista ao se ligar a essas citocinas e impedir a ligação do VEGF e PIGF aos seus receptores de superfície celular. Por fim, utilizando um modelo animal no qual foi administrado um adenovírus recombinante produtor de sFlt-1, houve desenvolvimento de hipertensão e proteinúria em ratas gestantes e não gestantes, inclusive com análise histopatológica renal evidenciando endoteliose glomerular, lesão característica da pré-eclâmpsia (22).

Posteriormente a este estudo, Levine utilizou o banco de soros de um estudo prévio e comparou os valores de sFlt-1, PIGF e VEGF das pacientes com pré-eclâmpsia pareadas com pacientes normotensas de mesma idade gestacional na primeira coleta sérica (120 casos e 120 controles), utilizando o mesmo procedimento de Maynard (método ELISA). O autor comprovou que as pacientes analisadas após o diagnóstico de pré-eclâmpsia possuíam níveis séricos maiores de sFlt-1 e menores de PIGF e VEGF que o grupo controle. Essas alterações foram mais pronunciadas quando as pacientes apresentaram pré-eclâmpsia precoce (<34 semanas) ou restrição do crescimento intrauterino. Depois, em análise longitudinal, ele observou que, durante a gestação normal, a concentração de sFlt-1 manteve-se constante até 33 a 36 semanas, apresentando posterior elevação semanal até o parto; a de PIGF manteve-se constante nos dois primeiros trimestres, apresentou pico entre 29 a 32 semanas e posterior queda contínua; o VEGF manteve-se baixo durante toda gestação (25).

O autor sugere que, fisiologicamente, o estado pró-angiogênico do segundo trimestre (aumento de PIGF com sFlt-1 baixo) seria convertido para um estado anti-angiogênico (aumento do sFlt-1 e queda do PIGF e VEGF) e que nas pacientes com pré-eclâmpsia esta conversão seria mais precoce e abrupta, como um exagero do processo normal de controle do crescimento e funcionamento placentário (25).

Diversos autores continuaram esta linha de pesquisa, estudando fatores angiogênicos e antiangiogênicos urinários (26, 27), a associação dos fatores séricos com achados ultrassonográficos (28-30) e principalmente a possibilidade de utilizar estes marcadores como preditores da pré-eclâmpsia (31-33). Entre estas novas

aplicações, sem dúvidas a predição da pré-eclâmpsia no primeiro trimestre da gestação, especialmente a sua forma grave e precoce, é a mais promissora e já está sendo utilizada na prática clínica em alguns países (34), inclusive no Brasil.

Além da dificuldade de predição e de entendimento da fisiopatologia, a pré-eclâmpsia apresenta semelhança clínica e laboratorial com várias doenças que acometem o ciclo gravídico-puerperal, tanto clínicas quanto cirúrgicas, como por exemplo o fígado gorduroso agudo da gravidez, a púrpura trombocitopênia trombótica, a síndrome hemolítica urêmica, a sepse e a reativação do LES. O tratamento difere entre estas enfermidades e o diagnóstico incorreto pode levar a uma elevada morbimortalidade materna e fetal (35).

Há, portanto, necessidade de melhorar a acurácia do diagnóstico diferencial entre pré-eclâmpsia e LES com nefrite e a medida dos marcadores angiogênicos e antiangiogênicos como sFlt-1 e PlGF poderia contribuir para discriminar as duas condições, mas estudos prospectivos que incluam pacientes com LES durante a gestação ainda são aguardados (36).

3 FATORES ANGIOGÊNICOS E ANTIANGIOGÊNICOS EM PACIENTES COM LES

Até o momento, apenas um estudo caso-controle contendo pacientes gestantes com LES estudou os níveis de sFlt-1 em pacientes com diagnóstico de pré-eclâmpsia, tendo encontrado concentrações elevadas em comparação às das pacientes com LES sem pré-eclâmpsia. No entanto, o estudo incluiu um pequeno número de pacientes (18 casos e 34 controles), não incluiu pacientes com nefrite e não avaliou os títulos dos fatores angiogênicos VEGF e PlGF (37).

Um relato de caso publicado sugere o potencial uso da dosagem de PlGF e sFlt-1 como auxiliar para o diagnóstico diferencial entre reativação do LES e pré-eclâmpsia. Uma gestante com diagnóstico prévio de LES e nefrite foi internada com quadro de HAS progressiva, trombocitopenia e piora na proteinúria. Tendo em vista o diagnóstico inicial de reativação da doença de base, a paciente foi tratada com corticosteroides mas não ocorreu melhora clínica e houve evolução para o óbito fetal. Após o parto, a rápida melhora clínica sugeriu a hipótese de pré-eclâmpsia e a mensuração dos níveis séricos de PlGF e sFlt-1 coletados no momento da internação foi sugestiva deste diagnóstico, revelando o sFlt-1 acima do percentil 95 para a idade gestacional com o PlGF abaixo do nível de detecção para o exame (38).

Rhee e colaboradores também mencionam que estudos clínicos prospectivos são necessários para a melhor caracterização dos fatores angiogênicos e antiangiogênicos em situações clínicas reais em gestantes com comorbidades que dificultem o diagnóstico diferencial com a PE (38). Em relação ao LES, cuja fisiopatologia envolve dano vascular, e em particular, nos casos com glomerulonefrite, cuja inflamação envolve caracteristicamente as alças capilares do glomérulo, é preciso melhor conhecimento quanto a variação dos níveis séricos dessas citocinas em diferentes condições, incluindo os períodos de atividade e inatividade da doença fora do período gestacional e durante a gravidez. Poucos estudos avaliaram as citocinas angiogênicas e antiangiogênicas em pacientes com LES e, de uma forma geral, incluíram poucos pacientes e os resultados encontrados foram discordantes (6-9, 39-44).

Robak e colaboradores e, mais recentemente, Zhou e colaboradores, foram os únicos grupos que avaliaram a medida de PIGF nas pacientes com LES não gestantes. Os dois encontraram valores aumentados dessa citocina tanto na doença ativa quanto na doença inativa em relação ao controle (9, 40).

Em relação ao sFlt-1, somente Hrycek e colaboradores (7) e Robak e colaboradores (6) o estudaram em pacientes adultos com LES não gestantes e relataram não haver diferença da medida nas pacientes com doença inativa em relação ao controle. Por outro lado, o primeiro grupo descreveu valores menores em pacientes com a doença ativa enquanto o segundo grupo relatou valores maiores no mesmo cenário, ambos com diferença estatisticamente significativa.

A inconsistência de dados na literatura sobre estas citocinas de acordo com a atividade do LES limita o seu potencial uso em gestantes para o diagnóstico diferencial com PE. Este estudo foi desenhado para melhor caracterizar os níveis séricos de VEGF, PIGF e sFlt-1 em pacientes com LES não gestantes com doença ativa e inativa, comparando-os com os encontrados em mulheres sem doenças autoimunes.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo primário

Avaliar se existe diferença entre os níveis séricos de VEGF, PIGF e sFlt-1 em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico com e sem atividade sistêmica da doença.

4.2 Objetivo secundário

Avaliar se existe diferença entre os valores séricos de VEGF, PIGF e sFlt-1 em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico em comparação com os níveis séricos dessas citocinas em um grupo de mulheres sem doenças autoimunes.

5 JUSTIFICATIVA

A maioria das pacientes com LES é acometida pela doença na fase reprodutiva da vida e uma gestação neste grupo de pacientes não é infrequente na prática clínica. Por outro lado, essas pacientes apresentam risco aumentado de PE, hipertensão gestacional, prematuridade e ativação da doença, incluindo da nefrite lúpica.

A pré-eclâmpsia e a nefrite lúpica apresentam importante morbimortalidade para o binômio materno-fetal, que pode ser ainda maior se o tratamento não for o adequado. No entanto, as duas doenças apresentam manifestações clínicas bastante semelhantes – HAS, edema e proteinúria – e os achados laboratoriais que poderiam sugerir acometimento renal do LES podem ser mascarados pelas alterações fisiológicas da gestação, criando em muitos casos uma grande dificuldade para o diagnóstico diferencial entre elas. Importante ressaltar que o tratamento é completamente diferente para os dois casos: interrupção da gestação na pré-eclâmpsia e uso de drogas imunossupressoras no LES.

Ainda não há consenso sobre o padrão dos valores de VEGF, PIGF e sFlt-1 nas pacientes não gestantes com LES durante a atividade e remissão da doença, sendo necessário elucidar esta pergunta antes que esses fatores possam ser empregados como ferramenta de diagnóstico diferencial entre pré-eclâmpsia e nefrite lúpica, razão pela qual o presente estudo foi desenhado.

6 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo teve caráter transversal e incluiu pacientes com LES em atividade e sem atividade da doença. Foram selecionadas pacientes do sexo feminino com diagnóstico de LES segundo os critérios de classificação do Colégio Americano de Reumatologia revisados em 1997 (45). Todas estavam em acompanhamento no ambulatório de LES da Disciplina de Reumatologia da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) do HUPE da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ). A inclusão foi feita sequencialmente de acordo com agendamento de rotina para consulta reumatológica, quando a paciente preenchia os critérios de inclusão para cada grupo de análise (descritos a seguir). Os esclarecimentos a respeito do protocolo de pesquisa e a assinatura do termo de consentimento (Apêndice A) foram feitos antes da entrevista de pesquisa. Todas as pacientes do grupo em estudo foram avaliadas quanto à atividade através da utilização do índice SLEDAI – 2k Systemic Lupus Activity Index (apêndice C) (46) que foi obtido com o emprego de questionário semiestruturado (apêndice B), exame físico e exames laboratoriais. Foram excluídas do estudo as pacientes que possuíam diagnóstico de outra doença autoimune, incluindo a síndrome antifosfolípídeo (SAF), as que apresentavam taxa de filtração glomerular persistentemente inferior a 30 ml/min e aquelas que não desejaram participar do mesmo ou não assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HUPE. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HUPE sob o registro 2866/2011-CEP/HUPE/CAAE: 0017.0.228.000-11.

Após a inclusão no estudo, a paciente era submetida ao exame clínico e os resultados laboratoriais pertinentes ao índice SLEDAI eram anotados. Para fins de análise dos dados, posteriormente foram excluídas as pacientes com valores no índice SLEDAI entre 3 e 5.

O grupo controle foi composto por mulheres que procuraram espontaneamente atendimento no ambulatório de Ginecologia da Policlínica Piquet Carneiro – UERJ com objetivo de realização de exames de rotina. Este grupo controle foi previamente selecionado para um estudo já concluído (*“Análise da prevalência das displasias cervicais e da infecção pelo papilomavírus humano em mulheres com lúpus eritematoso sistêmico”*, apresentado como tese de doutorado de Evandro Mendes Klumb) e a utilização do material armazenado estava prevista e

autorizada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HUPE, sob o número 1153-CEP/HUPE/CAAE: 0028.0.228.000-05. Após os esclarecimentos sobre o protocolo de pesquisa e a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido específico para esse grupo (apêndice E), as mulheres foram entrevistadas com questionário semiestruturado (apêndice F) para avaliação de aspectos sociodemográficos, caracterização da cor/raça por autodefinição e investigação de manifestações clínicas que sugerissem a presença de doença autoimune. As mulheres que apresentavam no momento da entrevista potencial para inclusão no grupo controle mas que utilizavam imunossupressores, apresentavam qualquer tipo de neoplasia, LES ou qualquer outra doença autoimune, ou ainda apresentassem manifestações clínicas que não permitissem a exclusão dessas enfermidades foram excluídas antes ou durante a entrevista para sua inclusão neste estudo. Foram excluídas da análise mulheres que possuíam vasculopatias, como hipertensão e diabetes, estavam na menopausa, possuíam parentesco com pacientes com LES, não desejaram participar do estudo ou não assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido específico para este grupo (apêndice E) previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HUPE.

Nenhuma das pacientes ou voluntárias do grupo controle apresentava qualquer sinal sugestivo de infecção no momento da coleta dos dados e das amostras de sangue.

6.1 Grupos de análise

Foram analisadas pacientes portadoras de LES não gestantes em período de remissão e de atividade e um grupo controle de mulheres sem doenças autoimunes.

6.1.1 Pacientes não gestantes com lúpus eritematoso sistêmico em atividade: foram incluídas pacientes com índice SLEDAI maior ou igual a 6.

6.1.2 Pacientes não gestantes com lúpus eritematoso sistêmico inativo: foram incluídas pacientes com índice SLEDAI menor ou igual a 2.

6.1.3 Mulheres não gestantes sem doença autoimune e sem uso de medicação imunossupressora.

Todas as manifestações clínicas, alterações laboratoriais específicas da doença e índice de dano cumulativo, esse último quantificado através do emprego do escore de dano do SLICC (Apêndice D) (Systemic Lupus International Collaborative Clinics) (47), foram obtidos através de revisão de prontuário e entrevista direta com cada paciente, momento no qual foi preenchida ficha clínica específica para esse estudo (Apêndice B). Os critérios indicativos de atividade do LES no momento da coleta de sangue foram obtidos através de revisão de prontuário e entrevista direta com cada paciente e emprego do índice SLEDAI (Apêndice C).

6.2 Tamanho amostral

Não foi possível o cálculo do tamanho amostral considerando a falta de um número significativo de estudos para avaliação de fatores angiogênicos e antiangiogênicos em pacientes com LES, especialmente considerando pacientes com nefrite. O presente estudo incluiu 54 pacientes com LES, sendo 24 pacientes com doença ativa (SLEDAI ≥ 6) e 30 pacientes com doença inativa (SLEDAI ≤ 2), e 34 mulheres no grupo controle.

6.3 Procedimentos

- Inicialmente, a paciente foi convidada a participar do estudo quando preencheu o critério de inclusão para cada grupo de estudo. Após a leitura e assinatura do TCLE (em anexo), a paciente respondeu ao questionário específico (Ficha Clínica – Mulheres com LES, em anexo).
- As pacientes com LES tiveram a atividade da doença avaliada por interrogatório direto do paciente, exame clínico e dados obtidos no prontuário de acordo com índice SLEDAI (apêndice C), considerando as queixas e alterações laboratoriais que apareceram no máximo dez dias antes.
- A análise dos parâmetros séricos para o índice SLEDAI (complemento, anti-DNA, trombocitopenia, leucopenia) foi feita a partir de dados disponíveis no prontuário da paciente no momento da consulta, aceitando-se exames realizados até os últimos dez dias anteriores. Caso algum dos parâmetros estivesse indisponível ou tivesse sido realizado com um intervalo maior que dez dias da consulta, era realizada

imediatamente a coleta de um tubo de sangue venoso para análise dos exames pendentes.

- A análise do sedimento urinário com pesquisa de cilindros urinários, da hematúria e da piúria para o índice SLEDAI foi feita a partir da avaliação da sedimentoscopia urinária, aceitando-se exames realizados até os últimos dez dias anteriores. Caso algum dos parâmetros estivesse indisponível ou tivesse sido realizado com um intervalo maior que dez dias da consulta, uma nova sedimentoscopia urinária era solicitada para ser realizada pela paciente nos próximos dez dias.

- A análise quantitativa da proteinúria de 24 horas para o índice SLEDAI foi feita a partir de avaliação de exame de urina de 24 horas ou análise da relação entre a proteinúria e a creatininúria em amostra isolada de urina, aceitando-se exames realizados até os últimos dez dias anteriores. Caso algum destes dois exames estivesse indisponível ou tivesse sido realizado com um intervalo maior que dez dias da consulta, uma nova análise da relação entre a proteinúria e a creatininúria em amostra isolada de urina era solicitada para ser realizada pela paciente nos próximos dez dias.

- Admitiu-se como menor que 500 mg em 24 horas a proteinúria de pacientes que foram consideradas com a doença em remissão, não apresentavam proteinúria maior que 500 mg em 24 horas nos últimos seis meses e apresentavam análise de proteína em fita de amostra isolada de urina inferior a +/4+. Estas pacientes, entretanto, foram excluídas da análise quantitativa da proteinúria de 24 horas.

- Foi feita a coleta de 10 ml de sangue venoso de cada paciente em um tubo sem anticoagulante no momento da consulta para dosagem dos fatores angiogênicos e antiangiogênicos (a seguir).

- Foi feita a revisão do prontuário de todas as pacientes, com a análise dos seguintes pontos: duração da doença; tempo para o diagnóstico do LES; manifestações clínicas e laboratoriais desde o início da doença; critérios clínicos e laboratoriais para nefrite lúpica; realização de biópsia renal e resultado da análise histopatológica; dano cumulativo a partir do índice SLICC; uso de medicações anti-hipertensivas, de estatinas e ácido acetilsalicílico (AAS); valor da creatinina sérica (mg/dl) realizada até 10 dias antes da inclusão no estudo.

- A pesquisa das citocinas (VEGF, PlGF e sFlt-1) foi feita no soro de cada paciente, que foi obtido de acordo com o seguinte procedimento: coleta de sangue, com venopunção empregando agulha 25x8 mm e coleta de sangue em um tubo sem

EDTA, centrifugação do sangue após retração do coágulo em temperatura ambiente durante 15 minutos a 2.500 rpm, aspiração do soro e armazenamento a -20°C em tubos de Eppendorf identificados a partir do número sequencial de inclusão no estudo. O processo de coleta e armazenamento seguiu as recomendações dos fabricantes e era igual para todas as citocinas estudadas.

- Posteriormente, foi feita a quantificação dos fatores angiogênicos e antiangiogênicos do soro em todos os grupos do estudo através do método ELISA.

6.3.1 Quantificação das citocinas através do método ELISA

Foram realizadas as determinações quantitativas do VEGF, do sFlt-1, também conhecido como sVEGF R1, e do PlGF nas amostras de soro das pacientes através da utilização de kits de ELISA Human VEGF Quantikine e Human Soluble VEGF R1/Flt-1 Quantikine, da empresa R&D Systems, Minneapolis, EUA, e Human PlGF Elisa, da empresa DRG Diagnostics, Marburg, Alemanha, no laboratório Cápsula da Policlínica Piquet Carneiro – UERJ, sem que houvesse qualquer conhecimento por parte da equipe do laboratório sobre características clínicas dos pacientes. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as recomendações do fabricante. Em resumo, todos os calibradores, amostras e controles foram analisados em duplicata e cada ensaio teve a sua curva padrão incluída na placa. Para a quantificação do VEGF e do sFlt-1, 100 µl de amostra de cada paciente foram colocados por poço, enquanto que para a quantificação do PlGF 25 µl de amostra foram utilizados por poço. Em seguida, foram realizadas a diluição, a incubação por 2 horas para o VEGF e o sFlt-1 e por 30 minutos para o PlGF, a lavagem e a adição do conjugado enzimático específico de cada kit em cada cavidade. Após uma segunda incubação de 2 horas para o VEGF e o sFlt-1 e de 30 minutos para o PlGF, esta etapa do processo foi concluída com uma nova lavagem das cavidades. Posteriormente, foi adicionado 200 µl de substrato, no caso do VEGF e do sFlt-1 em cada poço, e 100 µl de substrato, no caso do PlGF, com incubação de 25 minutos para o VEGF e de 30 minutos para o sFlt-1 e PlGF, com subsequente adição da solução de parada. A leitura da densidade óptica foi realizada em um leitor de microplaca Anthos Zenyth 200rt (Biochrom Ltd, Cambridge, Inglaterra) dentro de 30 minutos após a adição da solução de parada a 450 nm com correção a 540 nm para o VEGF e o sFlt-1 e dentro de 10 minutos a 450 nm para o PlGF.

O valor médio das absorvâncias para o conjunto de calibradores, amostras dos pacientes e controles foi calculado e subtraído da média da absorvância do padrão zero. Em seguida, uma curva padrão foi criada a partir das médias das absorvâncias obtidas de cada calibrador contra a concentração de cada calibrador. Usando o valor médio das absorvâncias de cada amostra testada, a concentração correspondente foi determinada através da curva de calibração específica para cada kit. A dose de detecção mínima do VEGF foi de 9,0 pg/ml, a do sFlt-1 foi de 3,5 pg/ml e a do PLGF foi de 25 pg/ml. Amostras com resultados abaixo destes valores foram consideradas iguais a 0 pg/ml.

Apesar de o PIGF fazer parte da família VEGF, de acordo com os fabricantes os kits utilizados não apresentavam reação cruzada ou interferência entre estas duas citocinas.

6.4 Análise estatística

O estudo teve por objetivo avaliar se pacientes com LES com doença ativa teriam valores séricos de sFlt-1, VEGF e PIGF diferentes das pacientes com LES inativo e das mulheres do grupo controle que não possuíam doença autoimune, admitindo o nível de significância em 0,05. As manifestações clínicas, tempo de doença, características demográficas, avaliação laboratorial da função renal e drogas em uso das pacientes com LES foram dispostas em tabelas, tendo sido submetidas posteriormente à análise estatística descritiva. O teste exato de Fischer foi utilizado para comparação de variáveis categóricas e o teste U de Mann-Whitney para variáveis contínuas que não apresentavam distribuição normal.

7 RESULTADOS

7.1 Características demográficas e aspectos clínicos das pacientes com LES

Foram incluídas no estudo 54 pacientes com LES, sendo trinta classificadas como portadoras de doença em remissão e vinte e quatro como doença ativa segundo o índice SLEDAI (Apêndice C), com valores definidos em menor ou igual a 2 e maior ou igual a 6 respectivamente. As características demográficas e relacionadas ao diagnóstico do LES estão descritas na tabela 1 de acordo com a atividade da doença. A idade média no momento da inclusão do estudo foi maior no grupo com LES inativo, diferença esta estatisticamente significativa (38,2 x 29,8 anos, intervalo de confiança (IC) 95% $p = 0,008$). A maior parte das pacientes do grupo em remissão se declarou branca ($n = 12$; 40%) ou parda ($n = 12$; 40%), enquanto a maioria das pacientes que estavam com a doença ativa se declarou negra ($n = 10$; 42%) ou parda ($n = 9$; 37%). A média da idade ao início dos sintomas apresentou tendência a diferença estatística, aparentemente maior no grupo de doença ativa (28,6 anos) do que no grupo com doença inativa (22,7 anos) (IC 95% $p = 0,06$). Não houve entre estes dois grupos diferença significativa entre a duração média do LES em anos (10,1 x 7 anos, IC 95% $p = 0,17$) e entre o tempo médio decorrido entre o início dos sintomas em meses e o diagnóstico de LES (13,0 x 17,1 meses, IC 95% $p = 0,51$).

Tabela 1 – Características demográficas e relacionadas ao diagnóstico e duração do LES de acordo com a atividade da doença

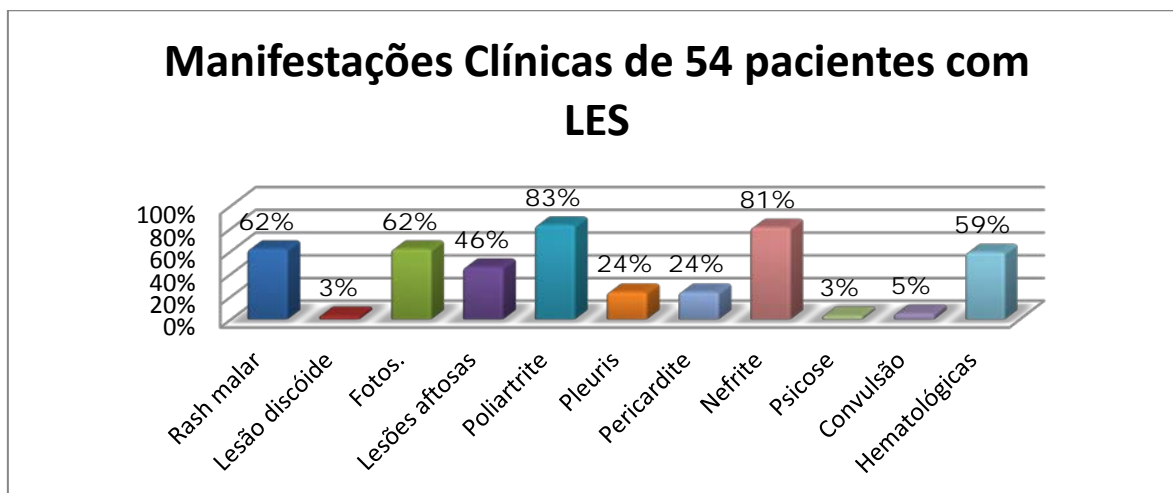
	LES Inativo (30 pacientes, SLEDAI \leq 2)	LES Ativo (24 pacientes, SLEDAI \geq 6)	p valor (IC 95%)
Idade na inclusão			
Média \pm DP (anos)	38,2 \pm 11,9	29,8 \pm 7,8	0,008 ^a
Cor da pele - n (%)			
branca	12 (40%)	5 (21%)	0,11 ^b
parda	12 (40%)	9 (37%)	0,53 ^b
negra	6 (20%)	10 (42%)	0,07 ^b
outros	0	0	NA
Idade ao início dos sintomas			
média \pm DP (anos)	28,0 \pm 9,9	22,8 \pm 6,9	0,06 ^a
variação (anos)	12 - 49	11 - 38	
Duração do LES			
média \pm DP (anos)	10,1 \pm 7,6	7 \pm 5,1	0,17 ^a
variação (anos)	1 - 30	0 - 18	
Tempo decorrido entre o início dos sintomas e o diagnóstico de LES			
média \pm DP (meses)	13,0 \pm 25,3	17,1 \pm 29,3	0,51 ^a
variação (meses)	1 - 108	0,5 - 120	

Legenda: DP, desvio padrão. IC, intervalo de confiança. NA, não aplicável. SLEDAI, Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index (Apêndice C).

Nota: ^a – p valor calculado a partir do teste U de Mann-Whitney.

A manifestação clínica mais frequente entre todas as pacientes incluídas neste estudo foi a artrite, diagnosticada em quarenta e cinco delas (83%). Quarenta e quatro pacientes (81%) apresentaram diagnóstico laboratorial de nefrite associada ao LES em algum momento de sua evolução clínica, sendo que trinta e uma (57%) tiveram a nefrite confirmada por exame histopatológico. Mais da metade das pacientes teve como critério diagnóstico para o LES eritema ou *rash* malar (62%), fotossensibilidade (62%) e alteração hematológica relacionada com o LES (59%), como anemia hemolítica, leucopenia, linfopenia e/ou trombocitopenia. O acometimento do sistema nervoso central foi o critério de classificação mais raro entre estas pacientes, ocorrendo em apenas quatro delas. As demais manifestações clínicas relacionadas ao LES estão na figura 1.

Figura 1 – Principais manifestações clínicas das pacientes com LES incluídas no estudo



Legenda: Fotos. fotossensibilidade.

Os dados clínicos relacionados ao LES, a avaliação laboratorial da função renal e análise histopatológica da biópsia renal das pacientes com LES de acordo com a atividade da doença estão descritos na tabela 2. No momento da inclusão no estudo, o índice SLEDAI (Apêndice C) médio do grupo com doença inativa foi 0,7, enquanto a média do grupo com o LES ativo foi de 11,6 (IC 95%, $p < 0,001$). Já o índice de dano do SLICC (Apêndice D) foi similar entre os dois grupos (0,50 x 0,58, IC 95% $p = 0,59$), assim como a creatinina sérica média (0,79 x 1,00 mg/dl, IC 95% $p = 0,59$). Considerando que a perda excessiva de proteína na urina (maior que 0,5g/24 horas) é um marcador de atividade renal do LES (SLEDAI, apêndice C), a análise quantitativa de urina foi significativamente maior no grupo com doença ativa (2,54 x 0,19 g/24 horas, IC 95% $p < 0,001$), conforme o esperado. Desse grupo, apenas quatro pacientes (16,6%) possuíam proteinúria de 24 horas inferior a 1 g. Todas as pacientes do grupo com doença ativa tiveram a análise quantitativa da proteinúria de 24 horas realizada, enquanto em oito pacientes do grupo em remissão a análise foi qualitativa, de acordo com os critérios explicados anteriormente.

Entre o grupo que apresentava índice SLEDAI menor ou igual a dois, 20 pacientes (66,6%) já haviam apresentado critério clínico e laboratorial para o diagnóstico de nefrite associada ao LES. Quatorze destas pacientes foram submetidas à análise histopatológica renal, sendo dez diagnosticadas com nefrite classes III ou IV com ou sem associação com a classe V, de acordo com a classificação adotada pela OMS e a ISN/RPS de 2003 (3). Nenhuma destas

pacientes apresentava nefrite ativa, definida por qualquer manifestação renal do índice SLEDAI, no momento da inclusão no estudo.

Vinte e uma pacientes (87,5%) possuíam diagnóstico clínico e laboratorial de nefrite associada ao LES antes do início do estudo e três pacientes receberam o diagnóstico de nefrite no momento da inclusão no estudo. A maior parte das pacientes (79,1%) com o índice SLEDAI maior ou igual a 6 já havia sido submetida à biópsia renal. As classes histopatológicas renais mais comuns neste grupo, de acordo com a classificação empregada pela OMS e ISN/RPS – 2003, foram as classes III ou IV com ou sem associação com a classe V (68,4%). A quase totalidade das pacientes (95,8%) com doença ativa possuía manifestações renais no momento da análise, exceto uma paciente que apresentava artrite, leucopenia e anti-DNA positivo. Esta paciente, no entanto, já havia apresentado durante a evolução clínica do LES achados laboratoriais compatíveis com nefrite.

Tabela 2 – Dados clínicos relacionados ao LES, avaliação laboratorial da função renal e análise histopatológica da biópsia renal das pacientes com LES de acordo com a atividade da doença

	LES Inativo (30 pacientes, SLEDAI \leq 2)	LES Ativo (24 pacientes, SLEDAI \geq 6)	p valor (IC 95%)
Índice SLEDAI no momento de inclusão			
valor médio \pm DP	0,7 \pm 0,9	11,6 \pm 4,0	<0,0001 ^a
Índice SLICC no momento de inclusão			
valor médio \pm DP	0,5 \pm 0,9	0,5 \pm 0,9	0,59 ^a
Creatinina sérica			
média \pm DP (mg/dl)	0,7 \pm 0,2	1,0 \pm 0,5	0,59 ^a
Proteinúria			
média \pm DP (g/24h)	0,1 \pm 0,2	2,5 \pm 2,1	<0,0001 ^a
História de nefrite antes da inclusão no estudo – n (%)	20 (66,6%)	21 (87,5%)	0,07 ^b
Nefrite ativa no momento da inclusão do estudo – n (%)	0 (0%)	23 (95,8%)	<0,0001 ^b
Biópsia renal em pacientes com manifestação clínica de nefrite – n (%)	14 (70%)	19 (79,1%)	0,25 ^b
Classe histológica da nefrite (OMS, ISN/RPS - 2003) - n (%)			
III ou IV \pm V	10 (71,4%)	13 (68,4%)	0,58 ^b
V	4 (28,6%)	3 (15,7%)	0,32 ^b
VI	0	1 (5,2%)	0,57 ^b
Inconclusiva	0	2 (10,5%)	0,32 ^b

Legenda: DP, desvio padrão. IC, intervalo de confiança. OMS, Organização Mundial da Saúde. ISN/RPS, *International Society of Nephrology / Renal Pathology Society*. SLEDAI, Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index (Apêndice C). SLICC DI, Systemic Lupus International Collaborative Clinics (Apêndice D).

Nota: ^a – p valor calculado a partir do teste U de Mann-Whitney. ^b – p valor calculado a partir do teste exato de Fischer.

A prednisona era utilizada por quarenta e sete do total de pacientes no momento da inclusão no estudo, sendo o medicamento imunossupressor mais utilizado. Vinte quatro (80%) das trinta pacientes com doença inativa utilizavam corticoesteróide oral, com dose diária média de 4,8 mg. Praticamente todas as pacientes com a doença ativa (95,8%) estavam em uso de prednisona e a dose diária média era de 29,3 mg, considerada estatisticamente maior que o grupo

anterior (IC 95%, $p < 0,0001$). As medicações em uso pelas pacientes com LES de acordo com a atividade da doença estão relacionadas na tabela 3.

Avaliando os medicamentos imunossupressores, a azatioprina era utilizada por 13 pacientes, o micofenolato mofetil por 14, sete estavam recebendo pulsos de ciclofosfamida e apenas duas pacientes utilizavam metotrexato. A dose diária média de azatioprina ($107,5 \times 100$ mg, IC 95% $p = 0,78$) e de micofenolato mofetil ($1,9 \times 2,3$ mg, IC 95% $p = 0,30$) foi similar nos dois grupos (LES ativo e inativo). A única paciente do grupo em remissão que estava em uso de ciclofosfamida utilizava a medicação por sete meses e estava em remissão completa da doença (SLEDAI = 0). Já as pacientes com doença ativa que estavam em uso deste citostático o haviam feito por um curto período (quatro meses ou menos) e ainda não haviam apresentado melhora clínica e laboratorial da doença.

Quarenta e nove (90,7%) das cinquenta e quatro pacientes incluídas no estudo estavam em uso de antimaláricos, não sendo encontrada diferença estatística entre os dois grupos (IC 95%, $p = 0,39$). O antimalárico mais utilizado foi a hidroxicloroquina (31, 63,3%) e dezoito pacientes (36,7%) utilizavam cloroquina.

Não houve diferença entre os dois grupos analisados em relação ao uso de anti-hipertensivos (20 pacientes no grupo em remissão x 21 pacientes no grupo com doença ativa, IC 95% $p = 0,07$), com uma tendência de uso mais frequente em pacientes com o LES em atividade. Entre as usuárias de anti-hipertensivos, apenas uma (2,4%) não utilizava inibidor da enzima conversora da angiotensina (IECA) ou antagonista do receptor da angiotensina II (ARA II) e dezessete (41,4%) utilizavam mais de um anti-hipertensivo. Mais uma vez, não houve diferença entre os dois grupos em estudo (IC 95%, $p = 0,48$ para o uso de IECA/ARA II e $p = 0,30$ para o uso de mais de um anti-hipertensivo). Poucas pacientes estavam em uso de estatinas (4 no grupo inativo x 2 no grupo ativo) e AAS (2 no grupo inativo x 3 no grupo ativo), em proporções estatisticamente similares (IC 95%, $p = 0,44$ para o uso de estatinas e $p = 0,25$ para o uso de AAS).

Tabela 3 – Medicamentos em uso pelas pacientes com LES de acordo com a atividade da doença

	LES Inativo (30 pacientes, SLEDAI ≤ 2)	LES Ativo (24 pacientes, SLEDAI ≥ 6)	p valor (IC 95%)
Prednisona – n (%)	24 (80%)	23 (95,8%)	0,09 ^a
dose média ± DP (mg/dia)	4,8 ± 2,9	29,3 ± 23,7	<0,001 ^b
Azatioprina – n (%)	10 (33,3%)	3(12,5%)	0,07 ^a
dose média ± DP (mg/dia)	107,5 ± 44,1	100 ± 50	0,78 ^b
Ciclofosfamida – n (%)	1 (8,3%)	6 (25%)	0,02 ^a
média de pulsos (n)	6	2,5	NA
Micofenolato Mofetil – n (%)	8 (26,6%)	6 (25%)	0,57 ^a
dose média ± DP (g/dia)	1,9 ± 0,6	2,3 ± 0,8	0,30 ^b
Metotrexato – n (%)	1 (3,3%)	1 (7,6%)	0,69 ^a
dose média (mg/semana)	7,5	15	NA
Antimaláricos – n (%)	28 (93,3%)	21 (87,5%)	0,39 ^a
Anti-hipertensivos – n (%)	20 (66,6%)	21 (87,5%)	0,07 ^a
IECA/ARA II – n/total (%)	19/20 (95%)	21/21 (100%)	0,48 ^a
Mais de 1 anti-hipertensivo – n/total (%)	7/20 (35%)	10/21 (47,6%)	0,30 ^a
Estatinas – n (%)	4 (13,3%)	2 (8,3%)	0,44 ^a
AAS – n (%)	2 (6,6%)	3 (12,5%)	0,25 ^a

Legenda: AAS, Ácido acetilsalicílico. ARA II, Antagonistas dos receptores de angiotensina II. IECA, Inibidores da enzima conversora de angiotensina. NA, não aplicável.

Nota: ^a – p valor calculado a partir do teste exato de Fischer. ^b – p valor calculado a partir do teste U de Mann-Whitney.

7.2 Características demográficas do grupo controle

As características demográficas das mulheres do grupo controle estão expostas na tabela 4. Comparadas com as pacientes com LES, as mulheres do grupo controle possuíam idade média no momento da inclusão do estudo semelhante (IC 95%, $p = 0,24$). A distribuição de acordo com a cor da pele autodeclarada pelas mulheres do grupo controle foi similar: dez (29,4%) consideravam a cor da pele branca, 12 (35,3%) consideravam parda e 11 (32,3%) se autodeclararam negra. Uma mulher do grupo controle se declarou indígena.

Tabela 4 – Características demográficas do grupo controle comparadas com as das pacientes com LES

	Grupo controle (34 mulheres)	Total de pacientes Com LES (54 pacientes)	p valor (IC 95%)
Idade na inclusão			
Média \pm DP (anos)	36,5 \pm 9,7	34,5 \pm 11,0	0,24 ^a
Cor da pele - n (%)			
branca	10 (29,4%)	17 (31,5%)	0,51 ^b
parda	12 (35,3%)	21 (38,9%)	0,45 ^b
negra	11 (32,3%)	16 (29,6%)	0,48 ^b
outros	1 (3%)	0	0,38 ^b

Nota: ^a – p valor calculado a partir do teste U de Mann-Whitney. ^b – p valor calculado a partir do teste exato de Fischer.

7.3 Análise comparativa dos valores do VEGF, PIGF e sFlt-1 encontrados nas pacientes com LES e no grupo controle

Quando comparamos as cinquenta e quatro pacientes com LES incluídas neste estudo com as trinta e quatro mulheres do grupo controle, nota-se que os valores médios dos três fatores analisados são significativamente maiores nas pacientes com LES (tabela 5). As médias do VEGF, PIGF e sFlt-1 no grupo em estudo foram 319,0 \pm 226,0, 42,2 \pm 54,1 e 107,9 \pm 49,2, respectivamente, enquanto no grupo controle as médias encontradas foram 206,2 \pm 119,4, 13,6 \pm 21,6, 70,2 \pm 95,0, todas apresentando diferença estatística (IC 95%, VEGF p = 0,02; PIGF p = 0,02; sFlt-1 p = 0,01).

Tabela 5 – Valores de VEGF, PIGF e sFlt-1 séricos encontrados nas pacientes com LES incluídas no estudo e valores encontrados em mulheres do grupo controle

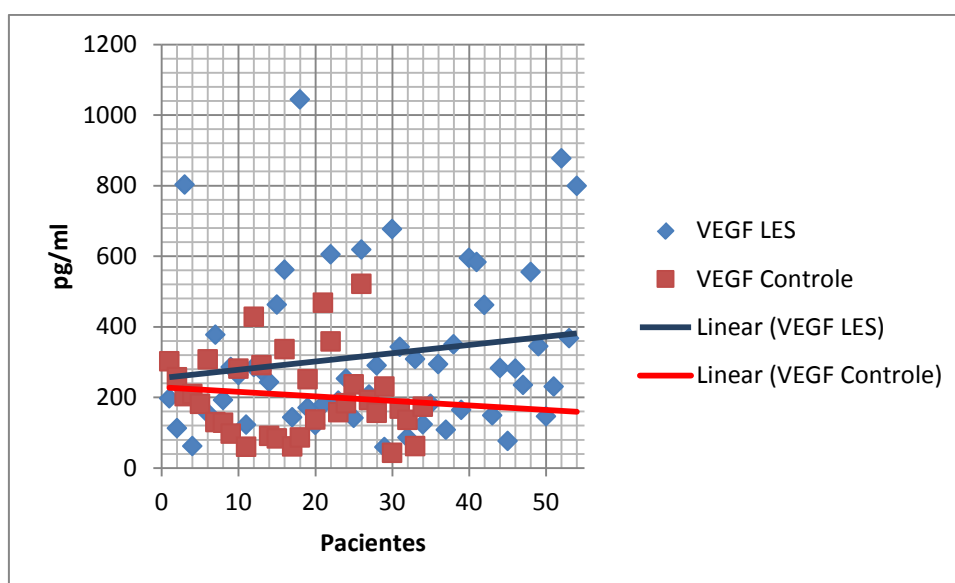
	Pacientes com LES (54 pacientes)	Grupo controle (34 mulheres)	p valor (IC 95%) ^a
VEGF (pg/mL)			
Média ± DP	319,06 ± 226,09	206,26 ± 119,43	0,02
Mediana	258,25	182,59	
PIGF (pg/mL)			
Média ± DP	42,27 ± 54,15	13,68 ± 21,63	0,02
Mediana	0	0	
sFlt-1 (pg/mL)			
Média ± DP	107,93 ± 49,29	70,27 ± 95,07	0,01
Mediana	93,19	0	

Legenda: PIGF, Fator de crescimento placentário. sFlt-1, Receptor *fms-like* tirosina quinase 1 solúvel. VEGF, Fator de crescimento vascular endotelial. IC, Intervalo de confiança.

Nota: ^a – p valor calculado a partir do teste U de Mann-Whitney.

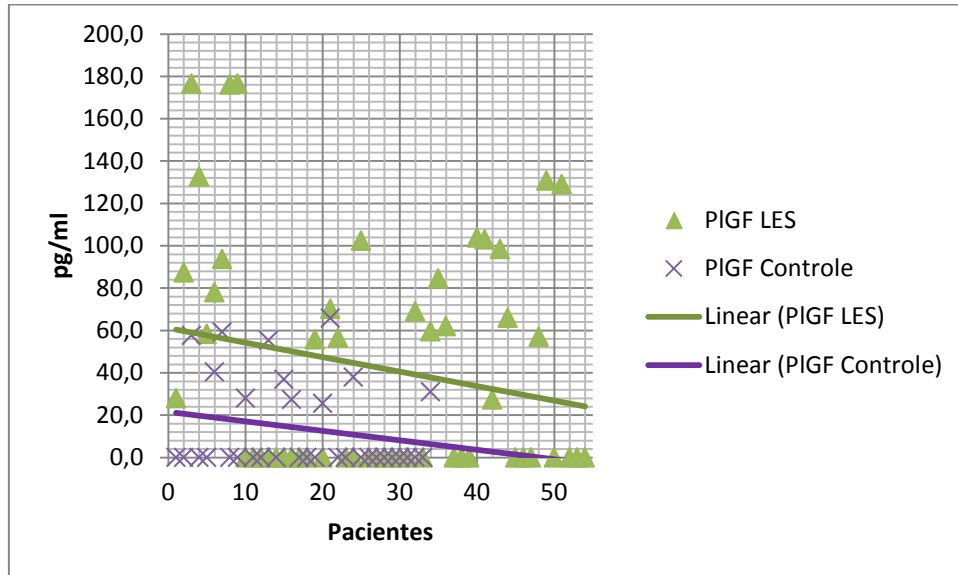
A seguir são apresentados os gráficos de dispersão dos valores séricos de VEGF (gráfico 1), PIGF (gráfico 2) e sFlt-1 (gráfico 3) encontrados nas pacientes com LES e nas mulheres do grupo controle.

Gráfico 1 – Gráfico de dispersão sobre os valores séricos de VEGF encontrados em pacientes com LES e em mulheres do grupo controle



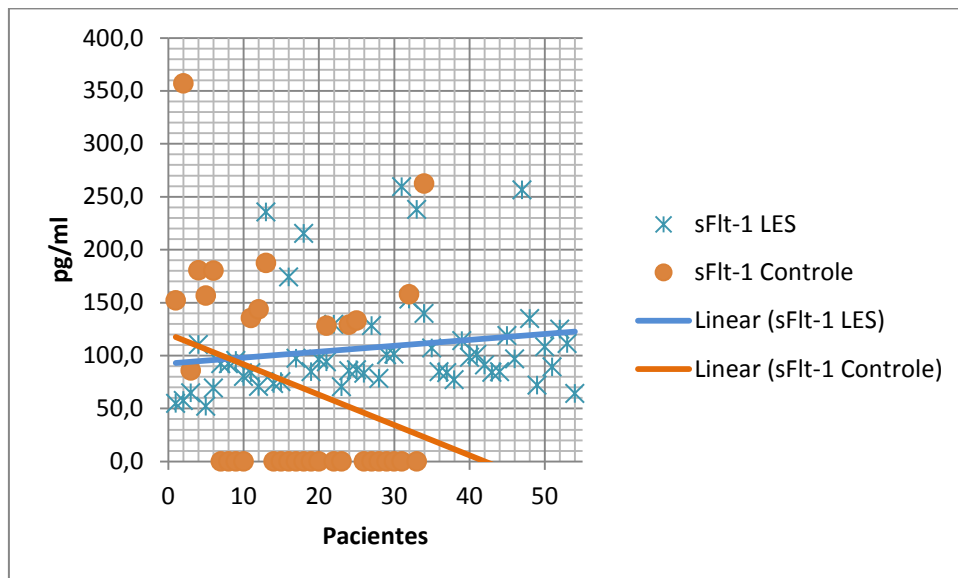
Legenda: VEGF, Fator de crescimento endotelial vascular.
Fonte: O autor, 2014.

Gráfico 2 – Gráfico de dispersão sobre os valores séricos de PIGF encontrados em pacientes com LES e em mulheres do grupo controle



Legenda: PIGF, Fator de crescimento placentário.
Fonte: O autor, 2014.

Gráfico 3 – Gráfico de dispersão sobre os valores séricos de sFlt-1 encontrados em pacientes com LES e em mulheres do grupo controle



Legenda: sFlt-1, Receptor fms-like tirosina quinase 1 solúvel.
Fonte: O autor, 2014.

7.4 Análise comparativa dos valores do VEGF, PIGF e sFlt-1 encontrados nas pacientes com LES de acordo com a atividade da doença e no grupo controle

A tabela 6 demonstra os valores de VEGF, PIGF e sFlt-1 séricos encontrados nas pacientes com LES inativo, com LES ativo e no grupo controle. Não houve diferença estatística na média do VEGF quando comparados os dois grupos de pacientes com LES (média grupo inativo $309,4 \pm 236,4$ x média grupo ativo $331,0 \pm 216,8$, IC 95% $p = 0,50$). O grupo que apresentava a doença em atividade apresentou média de VEGF significativamente superior ao controle (média controle $206,2 \pm 119,4$; IC 95% LES ativo x controle $p = 0,02$) mas não foi encontrada diferença estatística quando a média do grupo controle foi comparada com a média do grupo com doença em remissão (IC 95%, LES inativo x controle $p = 0,10$).

O PIGF apresentou o mesmo padrão do VEGF. A média deste fator angiogênico no grupo com LES com a doença em remissão foi semelhante à média do grupo com LES com a doença em atividade (média grupo ativo $43,0 \pm 59,8$ x média grupo inativo $41,2 \pm 47,3$, IC 95% $p = 0,77$), enquanto a média das pacientes com doença inativa não foi diferente da média das mulheres do grupo controle (média controle $13,6 \pm 21,6$; IC 95% LES inativo x controle $p = 0,08$) e o grupo com doença ativa foi significativamente maior que este último (IC 95%, LES ativo x controle $p = 0,02$).

A média do sFlt-1 sérico, fator antiangiogênico analisado no presente estudo, foi maior nas pacientes com doença ativa do que a média das pacientes com doença em remissão (média grupo ativo $120,5 \pm 54,9$ x média grupo inativo $97,8 \pm 42,4$, IC 95% $p = 0,02$). A média do sFlt-1 do grupo com LES inativo não teve diferença em relação à média do grupo controle (média controle $70,2 \pm 95,0$; IC 95% $p = 0,059$). A média do grupo com doença em atividade também foi superior ao grupo controle (média ativo $120,5 \pm 54,9$, IC 95% $p = 0,02$).

Tabela 6 – Valores de VEGF, PIGF e sFlt-1 séricos encontrados em pacientes com LES de acordo com a atividade da doença e valores encontrados em mulheres do grupo controle

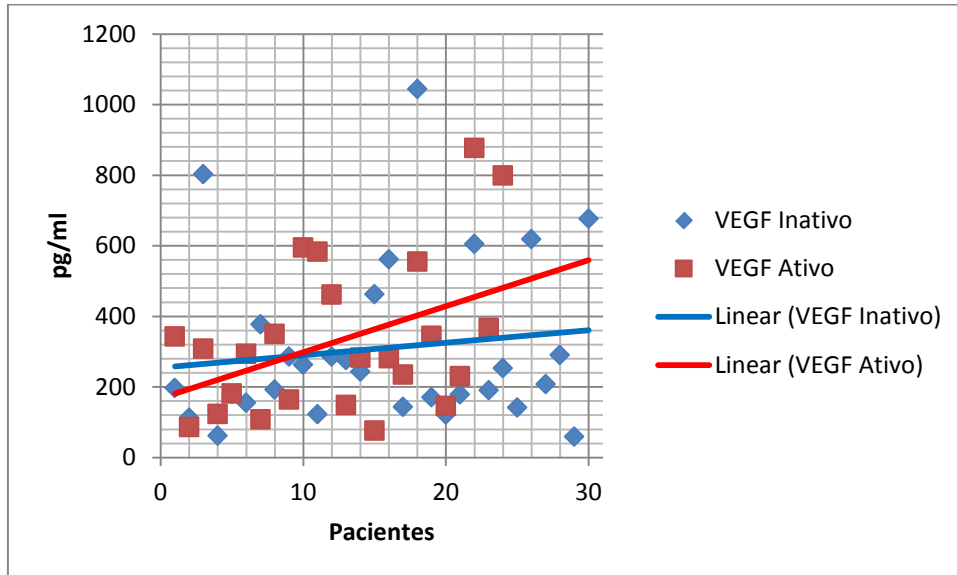
	LES Inativo (30 pacientes, SLEDAI \leq 2)	LES Ativo (24 pacientes, SLEDAI \geq 6)	Grupo controle (34 mulheres)	p valor (IC 95%) ^a
VEGF (pg/mL)				
Média \pm DP	309,4 \pm 236,4	331,0 \pm 216,8	206,2 \pm 119,4	inativo x ativo: 0,50
Mediana	225,5	288,3	182,5	inativo x controle: 0,10 ativo x controle: 0,02
PIGF (pg/mL)				
Média \pm DP	43,0 \pm 59,8	41,2 \pm 47,3	13,6 \pm 21,6	inativo x ativo: 0,77
Mediana	0	13,6	0	inativo x controle: 0,08 ativo x controle: 0,02
sFlt-1 (pg/mL)				
Média \pm DP	97,8 \pm 42,4	120,5 \pm 54,9	70,2 \pm 95,0	inativo x ativo: 0,02
Mediana	86,0	103,9	0	inativo x controle: 0,059 ativo x controle: 0,02

Legenda: PIGF, Fator de crescimento placentário. sFlt-1, Receptor *fms-like* tirosina quinase 1 solúvel. VEGF, Fator de crescimento vascular endotelial. IC, Intervalo de confiança.

Nota: ^a – p valor calculado a partir do teste U de Mann-Whitney.

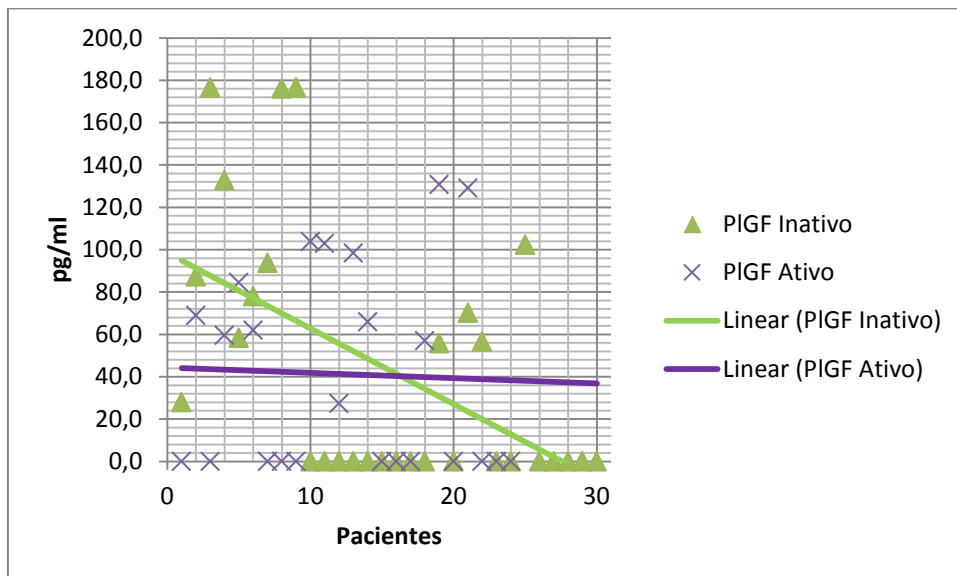
Os valores séricos dos fatores VEGF, PIGF e sFlt-1 encontrados nas pacientes com LES de acordo com a atividade da doença podem ser observados nos gráficos de dispersão a seguir (gráfico 4, gráfico 5 e gráfico 6, respectivamente).

Gráfico 4 – Gráfico de dispersão sobre os valores séricos de VEGF encontrados em pacientes com LES de acordo com a atividade da doença



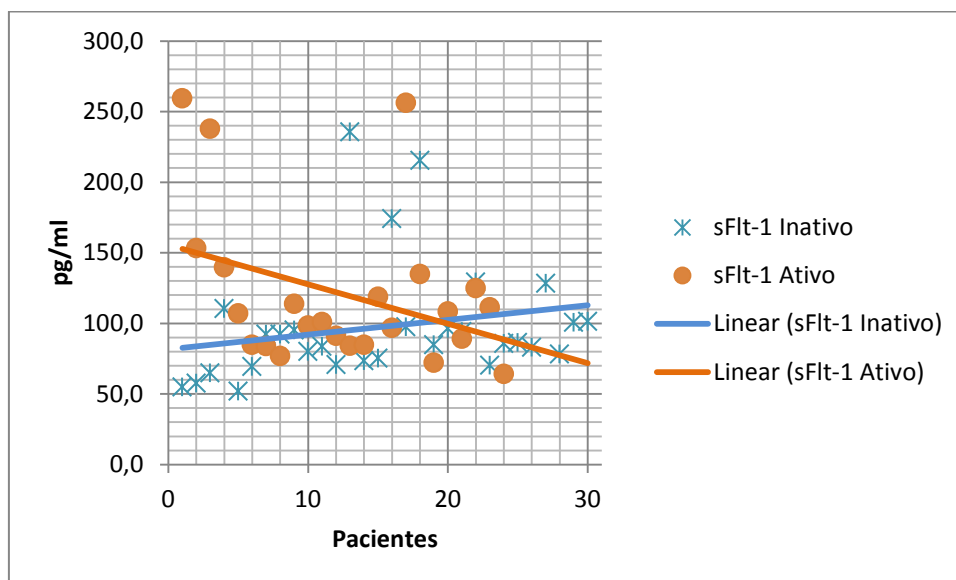
Legenda: VEGF, Fator de crescimento endotelial vascular.
Fonte: O autor, 2014.

Gráfico 5 – Gráfico de dispersão sobre os valores séricos de PIGF encontrados em pacientes com LES de acordo com a atividade da doença



Legenda: PIGF, Fator de crescimento placentário.
Fonte: O autor, 2014.

Gráfico 6 – Gráfico de dispersão sobre os valores séricos de sFlt-1 encontrados em pacientes com LES de acordo com a atividade da doença.



Legenda: sFlt-1, Receptor fms-like tirosina quinase 1 solúvel
Fonte: O autor, 2014.

7.5 Análise comparativa dos valores do VEGF, PlGF e sFlt-1 encontrados nas pacientes com LES inativo com história de nefrite e no grupo controle

Em uma subanálise incluindo apenas as pacientes com LES inativo que possuíam história de nefrite (tabela 7), a média do VEGF sérico foi maior neste grupo do que no controle, quase alcançando diferença estatística (média grupo inativo com história de nefrite $314,5 \pm 208,9$ x média controle $206,2 \pm 119,4$, IC 95% $p = 0,055$). A média do PlGF foi significativamente maior (média grupo inativo com história de nefrite $51,6 \pm 66,1$ x média controle $13,6 \pm 21,6$, IC 95% $p = 0,04$), enquanto não houve diferença na média do sFlt-1 quando estes dois grupos foram comparados (média grupo inativo com história de nefrite $92,0 \pm 38,4$ x média controle $70,2 \pm 95,0$, IC 95% $p = 0,13$).

Tabela 7 – Valores de VEGF, PIGF e sFlt-1 séricos encontrados em pacientes com LES inativo com história de nefrite e valores encontrados em mulheres do grupo controle.

	LES Inativo com história de nefrite (20 pacientes, SLEDAI \leq 2)	Grupo controle (34 mulheres)	p valor (IC 95%) ^a
VEGF (pg/mL)			
Média \pm DP	314,5 \pm 208,9	206,2 \pm 119,4	0,055
Mediana	248,2	182,5	
PIGF (pg/mL)			
Média \pm DP	51,6 \pm 66,1	13,6 \pm 21,6	0,04
Mediana	14,0	0	
sFlt-1 (pg/mL)			
Média \pm DP	92,0 \pm 38,4	70,2 \pm 95,0	0,13
Mediana	84,2	0	

Legenda: PIGF, Fator de crescimento placentário. sFlt-1, Receptor *fms-like* tirosina quinase 1 solúvel. VEGF, Fator de crescimento vascular endotelial. IC, Intervalo de confiança.

Nota: ^a – p valor calculado a partir do teste U de Mann-Whitney.

8 DISCUSSÃO

Nos últimos anos, o estudo do endotélio no LES vem ganhando importância e isto decorre em parte da observação que a morbimortalidade relacionada à doença cardiovascular nesses pacientes é maior que a esperada para os fatores de risco clássicos. Ao mesmo tempo, nas últimas décadas foi observada redução da taxa de mortalidade global neste grupo, principalmente devido à maior precocidade no diagnóstico da doença e de suas complicações, da maior efetividade dos medicamentos específicos e dos utilizados para controle das comorbidades e ainda da maior disponibilidade de medidas de suporte nas unidades de terapia intensiva, além do advento da terapia renal substitutiva e/ou transplante desse órgão (48). Entretanto, não tem sido observada redução significativa da mortalidade cardiovascular (48). Estudos demonstram que pacientes com LES possuem um risco cardiovascular maior que o da população geral, mesmo quando os fatores de risco clássicos como diabetes, tabagismo, hipertrigliceridemia, doença renal e uso de corticoesteroides são controlados para a comparação. A incidência de infarto agudo do miocárdio pode ser até 50 vezes maior nas mulheres jovens quando comparadas com controles pareados pela idade (49). A disfunção vascular encontrada nos pacientes com LES, provavelmente associada a distúrbio nos processos envolvidos na ativação endotelial, resulta na aceleração da aterogênese e por isso precisa ser melhor compreendida (50).

As mulheres com diagnóstico de LES possuem maior frequência de baixos valores da fração HDL do colesterol baixo associado à elevação das frações de LDL, VLDL e de triglicérides, alterações provavelmente relacionadas com um processamento anormal de quilomicrons secundário a baixos níveis de lipoproteína lipase (51). Os níveis de HDL pró-inflamatório, incapazes de proteger o LDL da oxidação, também estão elevados nestas pacientes, podendo promover lesão endotelial e estão associados à aterosclerose subclínica (51). A atividade da doença está correlacionada com a elevação das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e de anticorpos contra proteínas modificadas por estas espécies reativas, podendo promover um ambiente para oxidação de lipoproteínas que contribui para o estado aterogênico (52).

Além dos fatores de risco cardiovasculares clássicos, a lesão de órgãos-alvo em pacientes com LES está associada à deposição de complexos imunológicos,

formados a partir dos autoanticorpos associados à doença, e com a ativação do complemento nos tecidos. Os imunocomplexos presentes na parede vascular estimulam as células endoteliais a expressar moléculas de adesão celular vascular (VCAM-1) e E-selectina, que promovem o recrutamento dos monócitos e neutrófilos para a parede arterial e resultam em lesão endotelial. Além disso, os anticorpos anticélulas endoteliais podem ser encontrados em até 88% das pacientes com LES e induzem um estado pró-inflamatório e pró-adesão celular endotelial através da transcrição do fator nuclear kappa de cadeia leve das células B ativadas (NF- κ B), com consequente aumento da adesão de monócitos (50).

Os pacientes com LES apresentam níveis aumentados de células endoteliais apoptóticas, o que também está relacionado com disfunção endotelial e geração de fator tecidual. A lesão endotelial uma vez estabelecida desencadeia a ativação de mecanismos de reparo vascular, no entanto este processo está deficiente nestes pacientes e é caracterizado, dentre outros aspectos, pela redução das células progenitoras endoteliais (EPC) e das células angiogênicas circulantes (CAC). As EPC e CAC restantes apresentam mais apoptose, mesmo durante a doença inativa, menor produção de moléculas pró-angiogênicas e menor capacidade de diferenciação em células endoteliais maduras (53).

Foi proposto que o aumento do IFN tipo I seria o mecanismo pelo qual o reparo vascular é prejudicado nas pacientes com LES. Denny e colaboradores demonstraram que a disfunção na diferenciação das EPC e CAC é mediado pelo IFN- α , sendo que o bloqueio desta citocina recompõe o fenótipo normal das EPC e CAC (54).

É esperado que, após a lesão endotelial, ocorra um aumento do VEGF, considerando seu papel como modulador da angiogênese, proliferação e migração celular endotelial, quimiotaxia e permeabilidade capilar. Este aumento já foi demonstrado em pacientes com doenças inflamatórias como artrite reumatoide, polimiosite e dermatomiosite e LES ativo comparado com doença inativa ou com o controle (8).

A elevação do VEGF também foi associada a outros processos patológicos, como o câncer. Este fator atua como um grande indutor de angiogênese, que é um requisito para o crescimento e persistência do tumor e de suas metástases. Por este motivo, o bloqueio do VEGF se tornou promissor no tratamento oncológico, sendo desenvolvidos anticorpos monoclonais específicos, compostos sintéticos para inibir a

atividade da tirosina-quinase do VEGF ou proteínas que impedem a ligação e a ativação de seu receptor (55).

Outros mecanismos também podem ser responsáveis pela elevação do VEGF em pacientes com LES. Níveis elevados de IL-17 foram descritos em pacientes com LES e esta citocina pró-inflamatória determinam aumento na produção de VEGF (56). Em pacientes com nefrite lúpica, sua elevação pode estar associada com o reparo capilar dos glomérulos danificados (57). Frieri e colaboradores observaram, através de coloração imunohistoquímica, a presença de VEGF nos glomérulos e túbulos renais obtidos a partir de biópsias em pacientes com LES e nefrite, mas não identificaram este fator em amostras de pacientes saudáveis (58).

No presente estudo, a média do VEGF sérico das pacientes com LES ativo foi significativamente maior do que a média do grupo controle, achado similar ao relatado por outros autores (tabela 6) (5, 6, 8, 9). No entanto, não encontramos diferença estatisticamente significativa em relação à atividade da doença e quando o grupo com doença em remissão foi comparado com o grupo controle, diferentemente do encontrado por Robak e colaboradores em estudo publicado em 2003, no qual pacientes com doença ativa tinham valores mais elevados desta citocina em relação ao grupo inativo. Os pacientes estudados por esse grupo, no entanto, apresentavam doença aparentemente mais branda em média quando comparados aos pacientes estudados no presente estudo. Naquela série, apenas cinco dos 60 casos incluídos apresentavam nefrite e somente cinco usavam algum tipo de imunossupressor (azatioprina ou ciclofosfamida) (6), em contraste ao grupo que estudamos no qual a maioria apresentava doença renal, mesmo no grupo de doença inativa, e 34/54 (63%) das pacientes usavam imunossupressores (tabela 3). É possível considerar que a existência de nefrite tenha interferido na diferenciação dos grupos quanto aos valores de VEGF. Esses resultados favorecem a teoria que a maior intensidade na atividade do LES provocaria maior dano ao endotélio, conforme sugerido por alguns autores (9).

A elevação do VEGF encontrada nas pacientes com LES neste estudo (tabela 5) poderia representar um elemento associado ao aumento do risco cardiovascular relacionado à doença. Foi demonstrado que a expressão dessa citocina, analisada através de técnicas de imunohistoquímica, estava elevada em lesões hipercelulares e ateromatosas e em células endoteliais de microvasos dentro de placas ateroscleróticas avançadas *in vivo* (59). Além de participar do desenvolvimento de

vasos colaterais e reperfusão de áreas obstruídas, alguns autores sugerem que o VEGF propriamente dito pode promover a aterogênese ao induzir passos fundamentais na progressão da aterosclerose, como ativação e migração de monócitos/macrófagos, modulação da contração e crescimento de células musculares lisas e neovascularização do tecido das placas ateroscleróticas (59).

A associação do VEGF sérico com o processo de aterosclerose acelerada em pacientes com LES pode ser identificado mesmo em pacientes jovens. Um estudo demonstrou maior espessamento da camada íntima-média da carótida de pacientes com LES em remissão (índice SLEDAI \leq 4) quando comparado com mulheres saudáveis pareadas pela idade. Este maior espessamento da carótida era independente da idade, dos hábitos tabágicos e dos fatores de risco de Framingham e estava diretamente relacionado com os níveis séricos de VEGF, também significativamente aumentados nas pacientes com LES em conformidade com os achados do presente estudo (56).

Além do LES em si, a presença de nefrite parece influenciar desenvolvimento da aterosclerose. Uma coorte com 78 pacientes com LES sem evidência de doença aterosclerótica relacionou a presença de nefrite no momento da inclusão do estudo com o desenvolvimento de placa aterosclerótica nas artérias carótidas cinco anos após (60). Os autores sugerem que a gravidade do acometimento renal do LES, mais do que a atividade da doença, teria indicado um tratamento mais intensivo, incluindo altas doses de prednisona com o subsequente desenvolvimento de HAS e dislipidemia, dois fatores claramente associados à aterosclerose. Em uma análise multivariada, a dose cumulativa de prednisona foi associada à placa aterosclerótica e espessamento da íntima da artéria carótida (60). É possível, contudo, que o acometimento renal inflamatório também esteja associado aos maiores níveis de VEGF e maior disfunção endotelial além dos danos induzidos pelos corticosteroides.

Considerando os dados apresentados, níveis mais elevados do VEGF sérico em pacientes com LES também encontrados no presente estudo parecem estar associados ao dano endotelial de origem multifatorial, tanto relacionado à doença de base como ao tratamento e suas complicações, à evolução do processo de aterosclerose e também ao histórico de acometimento renal da maior parte das pacientes. Este último ponto é reforçado pela subanálise que incluiu apenas pacientes com doença inativa e história de nefrite (tabela 7), demonstrando uma tendência de elevação do VEGF mesmo em pacientes com índice SLEDAI baixo.

Apesar do pequeno número de pacientes, este achado corrobora a teoria formulada por outros autores que o acometimento renal seria um fator de risco cardiovascular independente (60). Todavia, a confirmação desta hipótese requer a realização de estudo com desenho específico para responder esta questão.

O PIGF, membro da família VEGF, também possui um papel expressivo na neovascularização em adultos, contribuindo na cicatrização de feridas através da angiogênese, além de promover quimiotaxia de monócitos, crescimento de vasos colaterais, mobilização de células precursoras na medula óssea e aumento da atividade do VEGF. Apesar de um estudo relatar o aumento do PIGF em pacientes com LES, principalmente quando a doença estava ativa (40), a mesma autora encontrou uma correlação negativa entre o PIGF e células endoteliais circulantes medidas através de citometria de fluxo, demonstrando a necessidade de um melhor entendimento desta citocina em relação ao LES (41).

Os valores de PIGF neste estudo também estavam aumentados nas pacientes com o LES em comparação ao grupo controle (tabela 6), mas não houve diferença entre os valores encontrados nas pacientes em razão da atividade da doença. Entretanto, a subanálise de pacientes com doença em remissão mas com presença prévia de nefrite (tabela 7) encontrou níveis significativamente maiores de PIGF em relação ao grupo controle. Estes resultados são consistentes com os dois únicos trabalhos encontrados na literatura que avaliaram o PIGF em pacientes com LES (9, 41).

Devido à semelhança funcional com o VEGF, esse aumento significativo do PIGF nas pacientes com doença ativa era esperado. É possível que este fator possa ter uma importância secundária na ativação e reparo endotelial ou mesmo um papel de estímulo no processo inflamatório, como foi proposto anteriormente (41). Pesquisas demonstram que o PIGF também poderia participar no processo de angiogênese ao promover a liberação de VEGF por monócitos (61).

Todavia, o PIGF também já foi implicado na patogênese das doenças ateroscleróticas e eventos cardiovasculares (62) através da conexão com o receptor transmembrana *Fms-like* tirosina quinase 1 (Flt-1), acelerando o processo aterosclerótico através do estímulo a angiogênese intramural e recrutamento monocitário (63). A expressão elevada de PIGF em lesões ateroscleróticas em humanos estaria associada com a inflamação da placa e densidade microvascular, sugerindo um papel do PIGF na desestabilização da placa e, conseqüentemente, a

manifestação clínica da doença (64). Aparentemente, as implicações do PIGF na doença cardiovascular são similares às do VEGF e em conjunto contribuiriam para a maior frequência de doença cardiovascular em pacientes com LES.

Já o receptor solúvel do VEGF-1, sFlt-1, foi descoberto recentemente e o seu papel fisiológico ainda não está bem estabelecido. Sabemos que ele é normalmente encontrado na circulação de homens e mulheres, é produzido por células endoteliais e monócitos e sua produção é aumentada quando estas duas células são ativadas (65). O sFlt-1 possui uma grande afinidade pelo VEGF e acredita-se que ele funcione como regulador negativo da disponibilidade do VEGF ou que ele prolongue as diferentes atividades desta citocina angiogênica (6). Foi demonstrado que este receptor solúvel faz parte de um sistema vascular intrínseco que guia os brotos vasculares para longe do vaso parental, em conjunto com o VEGF (66).

O evento em que o sFlt-1 teve seu papel bem descrito é a pré-eclâmpsia. As pacientes com esta condição possuem uma produção placentária aumentada deste receptor solúvel, diretamente relacionada com a gravidade da doença e que resulta na redução proporcional de VEGF e PIGF (25). Em pacientes com lúpus não gestantes, os valores encontrados por outros autores durante a remissão da doença são semelhantes aos da população geral, mas os resultados relacionando o sFlt-1 com a doença ativa são contraditórios (6, 7).

Um estudo recente avaliando crianças e adolescentes com LES encontrou valores maiores para sFlt-1 nos pacientes com nefrite ativa quando comparados com pacientes com história de nefrite em remissão e com um grupo controle sem LES. Os valores de VEGF encontrados foram maiores para as pacientes que tinham nefrite ativa, mas estavam inversamente relacionados com o sFlt-1 tanto nos pacientes com nefrite ativa quanto com nefrite inativa. A redução do VEGF circulante resultaria em diminuição de seu efeito protetor endotelial e glomerular, o que tornaria o sFlt-1 um possível agente causador de lesão endotelial (67).

Assim como publicado de Edelbauer e colaboradores, o presente estudo encontrou valores médios maiores de sFlt-1 sérico nas pacientes com LES ativo tanto em comparação com o grupo de pacientes com doença em remissão quanto com o grupo controle (tabela 6). É possível que, pelo menos em parte, os níveis elevados de sFlt-1 encontrados nas pacientes com LES sejam decorrentes de mecanismos de autorregulação que existem entre o VEGF e o seu receptor solúvel, como demonstrado por Barleon e colaboradores (68). Esses resultados reforçam a

possibilidade de associação dos níveis séricos de sFlt-1 com o acometimento renal agudo do LES, considerando que praticamente todas as pacientes com doença ativa no presente estudo apresentavam nefrite. Este fato também pode justificar o resultado discordante com encontrado por Hrycek e colaboradores, que relataram níveis séricos de sFlt-1 menores nas pacientes com LES do que o grupo controle (7). É possível que os valores séricos desta citocina encontrados nas pacientes com doença inativa, no presente estudo, que foram mais altos que no grupo controle ainda que sem significância estatística, tenham sofrido influência do passado de nefrite no grupo estudado.

O sFlt-1 elevado encontrado em pacientes com doença ativa, de forma similar ao que ocorre na PE, pode estar relacionado com a fisiopatologia da nefrite lúpica. A ligação do sFlt-1 ao VEGF circulante determinaria como consequência a menor disponibilidade de VEGF às células endoteliais glomerulares, condição que facilitaria a lesão endotelial e a apoptose celular observada em pacientes com nefrite lúpica. O dano às células do endotélio glomerular promoveria a exposição da membrana glomerular basal à circulação, permitindo a ligação com autoanticorpos, como os anti-DNA, e a deposição de complexos imune, atraindo monócitos. Os macrófagos ativados no rim produzem citocinas pró-inflamatórias, que induzem uma resposta inflamatória crônica que culmina na expansão da matriz extracelular, tanto no glomérulo quanto no espaço tubulointersticial, e em proteinúria (69).

O sFlt-1 ainda pode influenciar a disfunção endotelial em pacientes com nefropatias. Di Marco e colaboradores, em um estudo com 130 pacientes com doença renal crônica, encontraram níveis plasmáticos elevados desta citocina comparados ao grupo controle. A análise multivariada demonstrou uma associação com a função renal e com níveis de fator de von Willebrand, um marcador de disfunção endotelial. O soro dos pacientes estudados induziu a apoptose de células endoteliais *in vitro* e reduziu a geração de óxido nítrico em duas linhagens de células endoteliais diferentes, efeitos que foram revertidos quando o soro recebeu anticorpos contra sFlt-1 (70). Onoue e colaboradores, por outro lado, descreveram uma associação entre a redução dos níveis circulantes de sFlt-1 com a piora da aterosclerose que acompanha a disfunção renal (71).

Neste estudo, incluímos muitas pacientes com elevada morbidade, incluindo muitas com nefrite lúpica, mas cujo curso de doença até o momento da inclusão não havia determinado dano definitivo persistente. Não encontramos na literatura

estudos que tenham avaliado a mensuração do dano cumulativo em razão das citocinas angiogênicas e antiangiogênicas como realizamos neste estudo. No entanto, os resultados apresentados não sugerem haver associação entre a presença de danos crônicos e os níveis séricos das citocinas estudadas, mas que os níveis séricos delas tenham relação apenas com o curso de um processo inflamatório. A medida do dano cumulativo aferido a partir do índice de dano de SLICC (Apêndice D) (47) pode ser considerado baixo (menor que 1) nos dois grupos de pacientes com LES (tabela 2). Este instrumento aborda 12 sistemas orgânicos para identificar danos ocorridos nos pacientes a despeito de sua causa, resultantes da atividade da doença, de sua terapia ou mesmo de doenças intercorrentes, como câncer, diabetes e doenças cardiovasculares (72). Um índice SLICC igual ou maior que 1 está associado a uma maior mortalidade entre 5 e 10 anos (73), sendo que a maioria (66%) das pacientes estudadas não possuía qualquer alteração descrita neste índice de dano, o que torna difícil estabelecer o significado deste índice em razão dos valores das citocinas analisadas.

Este é o primeiro estudo em adultos na literatura em que a maior parte das pacientes (81,4%) possui história clínica, laboratorial e/ou histopatológica de nefrite lúpica, incluindo mais da metade (66,6%) das pacientes com a doença em remissão. O entendimento do padrão das citocinas angiogênicas e antiangiogênicas nesta manifestação do LES é fundamental para permitir o potencial emprego destes marcadores no diagnóstico diferencial entre nefrite lúpica e PE, conforme já sugerem alguns autores. Além disso, fatores pouco estudados em mulheres com LES mas importantes durante a gestação, como o PIGF e o sFlt-1, foram analisados e este conhecimento permitirá formar a base de futuras pesquisas.

A definição da atividade do LES é motivo de debate na literatura e não há consenso, com mais de uma medida de avaliação da atividade da doença publicada (72). Robak e colaboradores utilizaram o SLAM para avaliação da atividade da doença, enquanto a maior parte dos autores que avaliou as citocinas angiogênicas e antiangiogênicas no LES (7-9, 42) utilizou o índice SLEDAI (74), que consiste na soma de 24 critérios para 9 sistemas de órgãos e avaliação da atividade da doença com relação aos últimos 10 dias. Ele tem sido utilizado para avaliação em vários centros, com bons resultados quanto à validade e à reprodutibilidade inclusive no Brasil (72).

O atual estudo também escolheu para avaliação da atividade do LES o índice SLEDAI, já validado para língua portuguesa (46), em uma versão modificada chamada SLEDAI-2K (Apêndice C) (75). Esta versão utiliza os mesmos parâmetros de análise que a anterior mas tem por objetivo refletir a doença ativa persistente em descritores que anteriormente só seriam considerados positivos em novos casos ou recorrências, como alopecia, erupções cutâneas, úlceras de mucosa e proteinúria maior que 0,5g em 24 horas (75).

Mesmo entre os estudos que escolheram o SLEDAI como medida de avaliação da atividade da doença existem divergências sobre os pontos de corte selecionados para caracterizar a doença ativa. Definimos como alta atividade da doença um escore SLEDAI igual a 6 ou maior, pequena atividade do LES um escore entre 3 e 5 e doença inativa um escore igual a 2 ou menor, critérios similares aos utilizados por outros autores (76, 77). Para análise dos dados, apenas os grupos com alta atividade do LES e doença inativa foram examinados. As pacientes com pequena atividade (escore SLEDAI entre 3 e 5) foram excluídas do estudo para evitar que estes casos com valores intermediários gerassem dúvidas quanto à classificação em relação à atividade da doença, criando assim um fator de confusão.

Um ponto limitante encontrado neste estudo foi o pequeno número de pacientes incluídas, resultante do rígido critério de exclusão. Um número significativo de pacientes com SAF associada, com suspeita de SAF ou que apresentavam índice SLEDAI entre 3 e 5 foram excluídas da análise, com intuito de evitar fatores de confusão e de polarizar as pacientes em relação ao diagnóstico de atividade ou remissão do LES.

Publicações recentes demonstraram que o VEGF sérico e outros marcadores pró-inflamatórios estão aumentados em pacientes com SAF (78), principalmente nos pacientes com trombose arterial (79), e também relataram a elevação do PIGF sérico em pacientes com trombose tanto venosa quanto arterial (79). A elevação do VEGF também já foi descrita em pacientes com outras doenças autoimunes, como artrite reumatoide (80), espondilite anquilosante (81) e psoríase (82).

Estes estudos demonstram que as citocinas avaliadas, na verdade, não são específicas para o LES e estão relacionadas com doenças inflamatórias crônicas. Desta forma, é pertinente a exclusão desse estudo de pacientes com SAF associada ao LES ou portadoras de outras doenças autoimunes, considerando o provável viés na análise.

Os fatores estudados não se mostraram eficazes para identificar a atividade do LES, considerando a grande dispersão dos resultados dentro do próprio grupo, no entanto a sua associação com outros marcadores de atividade pode ser útil para este fim. O PIGF e principalmente o VEGF séricos estão diretamente associados com a função endotelial e podem ser novos marcadores de risco cardiovascular na aterosclerose coronariana prematura (57).

A elevação do fator antiangiogênico sFlt-1 está relacionada tanto com a atividade do LES quanto com a PE, podendo inclusive estar associado especificamente com a nefrite lúpica. No entanto, publicações analisando esta citocina em gestantes, utilizando o mesmo kit utilizado no presente estudo, encontraram valores séricos médios de vinte até sessenta vezes maiores do que os que foram aqui relatados, chegando a 8.150 pg/ml em casos de PE precoce (25). É possível, portanto, que a elevação do sFlt-1 sérico proporcionado pelo LES não seja capaz de influenciar no diagnóstico de PE, justificando a sua inclusão e análise em pesquisas futuras.

O padrão de elevação de VEGF e PIGF com a atividade da doença favorecem a aplicação destes fatores angiogênicos como método para auxílio no diagnóstico diferencial entre nefrite lúpica e PE em gestantes com LES, visto que estas citocinas estão reduzidas em pacientes com PE (25). A elevação do sFlt-1 em pacientes com doença ativa não exclui a análise desta citocina para o mesmo propósito, considerando a possibilidade de diferença de valores.

O melhor entendimento dos fatores angiogênicos e antiangiogênicos em pacientes com LES nos permitirá avaliar o potencial emprego da dosagem das citocinas avaliadas no diagnóstico precoce de atividade da nefrite lúpica, como sugerem alguns autores, e também como auxiliar na diferenciação entre nefrite lúpica e PE em pacientes com LES.

CONCLUSÕES

- Valores séricos médios de VEGF, PIGF e sFlt-1 foram maiores em pacientes com LES em comparação ao grupo controle.
- Pacientes com LES ativo apresentaram os valores séricos médios das três citocinas maiores do que o grupo controle.
- Não houve diferença estatística entre os valores séricos médios do VEGF, PIGF e sFlt-1 quando as pacientes com LES inativo foram comparadas ao grupo controle.
- Apenas os valores séricos médios do sFlt-1 foram significativamente maiores no grupo com LES ativo em comparação ao grupo com doença em remissão.
- Não houve diferença entre os dois grupos em relação aos valores séricos médios de VEGF e PIGF.

REFERÊNCIAS

1. Cortes-Hernandez J, Ordi-Ros J, Paredes F, Casellas M, Castillo F, Vilardell-Tarres M. Clinical predictors of fetal and maternal outcome in systemic lupus erythematosus: a prospective study of 103 pregnancies. *Rheumatology (Oxford)*. 2002;41(6):643-50.
2. Saxena R, Mahajan T, Mohan C. Lupus nephritis: current update. *Arthritis Res Ther*. 2011;13(5):240.
3. Weening JJ, D'Agati VD, Schwartz MM, Seshan SV, Alpers CE, Appel GB, et al. The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15(2):241-50.
4. Barber C, Herzenberg A, Aghdassi E, Su J, Lou W, Qian G, et al. Evaluation of clinical outcomes and renal vascular pathology among patients with lupus. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2012;7(5):757-64.
5. Robak E, Wozniacka A, Sysa-Jedrzejowska A, Stepien H, Robak T. Circulating angiogenesis inhibitor endostatin and positive endothelial growth regulators in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2002;11(6):348-55.
6. Robak E, Sysa-Jedrzejowska A, Robak T. Vascular endothelial growth factor and its soluble receptors VEGFR-1 and VEGFR-2 in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *Mediators Inflamm*. 2003;12(5):293-8.
7. Hrycek A, Janowska J, Cieslik P. Selected angiogenic cytokines in systemic lupus erythematosus patients. *Autoimmunity*. 2009;42(5):459-66.
8. Kuryliszyn-Moskal A, Klimiuk PA, Sierakowski S, Ciolkiewicz M. Vascular endothelial growth factor in systemic lupus erythematosus: relationship to disease activity, systemic organ manifestation, and nailfold capillaroscopic abnormalities. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2007;55(3):179-85.
9. Zhou L, Lu G, Shen L, Wang L, Wang M. Serum levels of three angiogenic factors in systemic lupus erythematosus and their clinical significance. *Biomed Res Int*. 2014;2014:627126.
10. Navarro C, Candia-Zuniga L, Silveira LH, Ruiz V, Gaxiola M, Avila MC, et al. Vascular endothelial growth factor plasma levels in patients with systemic lupus erythematosus and primary antiphospholipid syndrome. *Lupus*. 2002;11(1):21-4.
11. Austin HA, 3rd, Muenz LR, Joyce KM, Antonovych TT, Balow JE. Diffuse proliferative lupus nephritis: identification of specific pathologic features affecting renal outcome. *Kidney Int*. 1984;25(4):689-95.
12. Avihingsanon Y, Benjachat T, Tassanarong A, Sodsai P, Kittikovit V, Hirankarn N. Decreased renal expression of vascular endothelial growth factor in lupus nephritis is associated with worse prognosis. *Kidney Int*. 2009;75(12):1340-8.

13. Avihingsanon Y, Phumesin P, Benjachat T, Akkasilpa S, Kittikowit V, Praditpornsilpa K, et al. Measurement of urinary chemokine and growth factor messenger RNAs: a noninvasive monitoring in lupus nephritis. *Kidney Int.* 2006;69(4):747-53.
14. Tandon A, Ibanez D, Gladman DD, Urowitz MB. The effect of pregnancy on lupus nephritis. *Arthritis Rheum.* 2004;50(12):3941-6.
15. Lateef A, Petri M. Managing lupus patients during pregnancy. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2013;27(3):435-47.
16. Tandon A, Ibañez D, Gladman DD, Urowitz MB. The effect of pregnancy on lupus nephritis. *Arthritis Rheum.* 2004;50(12):3941-6.
17. Smyth A, Oliveira GH, Lahr BD, Bailey KR, Norby SM, Garovic VD. A systematic review and meta-analysis of pregnancy outcomes in patients with systemic lupus erythematosus and lupus nephritis. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2010;5(11):2060-8.
18. Klumb EM, Barros LMS, Romeiro L, Jesús NR, Levy RA, Albuquerque EMN. Impacto da nefrite sobre os resultados gestacionais de mulheres com lúpus eritematoso sistêmico. *Revista Brasileira de Reumatologia.* 2005;45(3):107-13.
19. Sibai B, Dekker G, Kupferminc M. Pre-eclampsia. *Lancet.* 2005;365(9461):785-99.
20. Duley L. Pre-eclampsia and the hypertensive disorders of pregnancy. *Br Med Bull.* 2003;67:161-76.
21. Davison JM, Homuth V, Jeyabalan A, Conrad KP, Karumanchi SA, Quaggin S, et al. New aspects in the pathophysiology of preeclampsia. *J Am Soc Nephrol.* 2004;15(9):2440-8.
22. Maynard SE, Min JY, Merchan J, Lim KH, Li J, Mondal S, et al. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest.* 2003;111(5):649-58.
23. Silasi M, Cohen B, Karumanchi SA, Rana S. Abnormal placentation, angiogenic factors, and the pathogenesis of preeclampsia. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2010;37(2):239-53.
24. Koga K, Osuga Y, Yoshino O, Hirota Y, Ruimeng X, Hirata T, et al. Elevated serum soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 (sVEGFR-1) levels in women with preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(5):2348-51.
25. Levine RJ, Maynard SE, Qian C, Lim KH, England LJ, Yu KF, et al. Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *N Engl J Med.* 2004;350(7):672-83.

26. Levine RJ, Thadhani R, Qian C, Lam C, Lim KH, Yu KF, et al. Urinary placental growth factor and risk of preeclampsia. *JAMA*. 2005;293(1):77-85.
27. Buhimschi CS, Norwitz ER, Funai E, Richman S, Guller S, Lockwood CJ, et al. Urinary angiogenic factors cluster hypertensive disorders and identify women with severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 2005;192(3):734-41.
28. Stepan H, Walther T. Questionable role of the angiotensin II receptor subtype 1 autoantibody in the pathogenesis of preeclampsia. *Hypertension*. 2007;50(1):e3; author reply e4.
29. Schlembach D, Wallner W, Sengenberger R, Stiegler E, Mortl M, Beckmann MW, et al. Angiogenic growth factor levels in maternal and fetal blood: correlation with Doppler ultrasound parameters in pregnancies complicated by pre-eclampsia and intrauterine growth restriction. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2007;29(4):407-13.
30. Crispi F, Dominguez C, Llurba E, Martin-Gallan P, Cabero L, Gratacos E. Placental angiogenic growth factors and uterine artery Doppler findings for characterization of different subsets in preeclampsia and in isolated intrauterine growth restriction. *Am J Obstet Gynecol*. 2006;195(1):201-7.
31. Thadhani R, Mutter WP, Wolf M, Levine RJ, Taylor RN, Sukhatme VP, et al. First trimester placental growth factor and soluble fms-like tyrosine kinase 1 and risk for preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(2):770-5.
32. Romero R, Nien JK, Espinoza J, Todem D, Fu W, Chung H, et al. A longitudinal study of angiogenic (placental growth factor) and anti-angiogenic (soluble endoglin and soluble vascular endothelial growth factor receptor-1) factors in normal pregnancy and patients destined to develop preeclampsia and deliver a small for gestational age neonate. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2008;21(1):9-23.
33. Espinoza J, Romero R, Nien JK, Gomez R, Kusanovic JP, Goncalves LF, et al. Identification of patients at risk for early onset and/or severe preeclampsia with the use of uterine artery Doppler velocimetry and placental growth factor. *Am J Obstet Gynecol*. 2007;196(4):326 e1-13.
34. Akolekar R, Syngelaki A, Sarquis R, Zvanca M, Nicolaides KH. Prediction of early, intermediate and late pre-eclampsia from maternal factors, biophysical and biochemical markers at 11-13 weeks. *Prenat Diagn*. 2011;31(1):66-74.
35. Sibai BM. Imitators of severe pre-eclampsia. *Semin Perinatol*. 2009;33(3):196-205.
36. Day CJ, Lipkin GW, Savage CO. Lupus nephritis and pregnancy in the 21st century. *Nephrol Dial Transplant*. 2009;24(2):344-7.
37. Qazi U, Lam C, Karumanchi SA, Petri M. Soluble Fms-like tyrosine kinase associated with preeclampsia in pregnancy in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*. 2008;35(4):631-4.

38. Rhee JS, Young BC, Rana S. Angiogenic factors and renal disease in pregnancy. *Case Rep Obstet Gynecol.* 2011;2011:281391.
39. Robak E, Woźniacka A, Sysa-Jedrzejowska A, Stepień H, Robak T. Circulating angiogenesis inhibitor endostatin and positive endothelial growth regulators in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 2002;11(6):348-55.
40. Robak E, Kulczycka L, Sysa-Jedrzejowska A, Wierzbowska A, Robak T. Circulating proangiogenic molecules PIGF, SDF-1 and sVCAM-1 in patients with systemic lupus erythematosus. *Eur Cytokine Netw.* 2007;18(4):181-7.
41. Robak E, Kierstan M, Cebula B, Krawczynska A, Sysa-Jedrzejowska A, Wierzbowska A, et al. Circulating endothelial cells and angiogenic proteins in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 2009;18(4):332-41.
42. Edelbauer M, Kshirsagar S, Riedl M, Billing H, Tönshoff B, Haffner D, et al. Soluble VEGF receptor 1 promotes endothelial injury in children and adolescents with lupus nephritis. *Pediatr Nephrol.* 2012;27(5):793-800.
43. Sakly N, Mirshahi P, Ducros E, Soria J, Ghedira I, Mirshahi M. Angiogenic activity in sera of patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 2009;18(8):705-12.
44. Heshmat NM, El-Kerdany TH. Serum levels of vascular endothelial growth factor in children and adolescents with systemic lupus erythematosus. *Pediatr Allergy Immunol.* 2007;18(4):346-53.
45. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1997;40(9):1725.
46. Sato EI, Ferraz MB, Lourenzi VPM, Natour J, Ikedo F, Atra E. Estudo da reprodutibilidade e validade do índice de atividade do lúpus eritematoso sistêmico. *Rev Bras Reumatol.* 1991;31(4):133-6.
47. Gladman D, Ginzler E, Goldsmith C, Fortin P, Liang M, Urowitz M, et al. The development and initial validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology damage index for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1996;39(3):363-9.
48. Yap DY, Tang CS, Ma MK, Lam MF, Chan TM. Survival analysis and causes of mortality in patients with lupus nephritis. *Nephrol Dial Transplant.* 2012;27(8):3248-54.
49. Manzi S, Meilahn EN, Rairie JE, Conte CG, Medsger TA, Jansen-McWilliams L, et al. Age-specific incidence rates of myocardial infarction and angina in women with systemic lupus erythematosus: comparison with the Framingham Study. *Am J Epidemiol.* 1997;145(5):408-15.

50. Narshi CB, Giles IP, Rahman A. The endothelium: an interface between autoimmunity and atherosclerosis in systemic lupus erythematosus? *Lupus*. 2011;20(1):5-13.
51. Kahlenberg JM, Kaplan MJ. Mechanisms of premature atherosclerosis in rheumatoid arthritis and lupus. *Annu Rev Med*. 2013;64:249-63.
52. Wang G, Pierangeli SS, Papalardo E, Ansari GA, Khan MF. Markers of oxidative and nitrosative stress in systemic lupus erythematosus: correlation with disease activity. *Arthritis Rheum*. 2010;62(7):2064-72.
53. Kahlenberg JM, Kaplan MJ. The interplay of inflammation and cardiovascular disease in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther*. 2011;13(1):203.
54. Denny MF, Thacker S, Mehta H, Somers EC, Dodick T, Barrat FJ, et al. Interferon-alpha promotes abnormal vasculogenesis in lupus: a potential pathway for premature atherosclerosis. *Blood*. 2007;110(8):2907-15.
55. Takahashi S. Vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF receptors and their inhibitors for antiangiogenic tumor therapy. *Biol Pharm Bull*. 2011;34(12):1785-8.
56. Colombo BM, Cacciapaglia F, Puntoni M, Murdaca G, Rossi E, Rodriguez G, et al. Traditional and non traditional risk factors in accelerated atherosclerosis in systemic lupus erythematosus: role of vascular endothelial growth factor (VEGATS Study). *Autoimmun Rev*. 2009;8(4):309-15.
57. Frieri M. Accelerated atherosclerosis in systemic lupus erythematosus: role of proinflammatory cytokines and therapeutic approaches. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2012;12(1):25-32.
58. Frieri M, Samih MA, Dzhindzhikhashvili M, Liu H, Balsam L, Rubinstein S. Toll-like receptor 9 and vascular endothelial growth factor levels in human kidneys from lupus nephritis patients. *J Nephrol*. 2012;25(6):1041-6.
59. Inoue M, Itoh H, Ueda M, Naruko T, Kojima A, Komatsu R, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in human coronary atherosclerotic lesions: possible pathophysiological significance of VEGF in progression of atherosclerosis. *Circulation*. 1998;98(20):2108-16.
60. Doria A, Shoenfeld Y, Wu R, Gambari PF, Puato M, Ghirardello A, et al. Risk factors for subclinical atherosclerosis in a prospective cohort of patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*. 2003;62(11):1071-7.
61. Bottomley MJ, Webb NJ, Watson CJ, Holt L, Bukhari M, Denton J, et al. Placenta growth factor (PIGF) induces vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion from mononuclear cells and is co-expressed with VEGF in synovial fluid. *Clin Exp Immunol*. 2000;119(1):182-8.

62. Cassidy A, Chiuve SE, Manson JE, Rexrode KM, Girman CJ, Rimm EB. Potential role for plasma placental growth factor in predicting coronary heart disease risk in women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29(1):134-9.
63. Khurana R, Moons L, Shafi S, Luttun A, Collen D, Martin JF, et al. Placental growth factor promotes atherosclerotic intimal thickening and macrophage accumulation. *Circulation.* 2005;111(21):2828-36.
64. Pilarczyk K, Sattler KJ, Galili O, Versari D, Olson ML, Meyer FB, et al. Placenta growth factor expression in human atherosclerotic carotid plaques is related to plaque destabilization. *Atherosclerosis.* 2008;196(1):333-40.
65. Barleon B, Reusch P, Totzke F, Herzog C, Keck C, Martiny-Baron G, et al. Soluble VEGFR-1 secreted by endothelial cells and monocytes is present in human serum and plasma from healthy donors. *Angiogenesis.* 2001;4(2):143-54.
66. Luft FC. Soluble fms-like tyrosine kinase-1 and atherosclerosis in chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2014;85(2):238-40.
67. Edelbauer M, Kshirsagar S, Riedl M, Billing H, Tonshoff B, Haffner D, et al. Soluble VEGF receptor 1 promotes endothelial injury in children and adolescents with lupus nephritis. *Pediatr Nephrol.* 2012;27(5):793-800.
68. Barleon B, Siemeister G, Martiny-Baron G, Weindel K, Herzog C, Marmé D. Vascular endothelial growth factor up-regulates its receptor fms-like tyrosine kinase 1 (FLT-1) and a soluble variant of FLT-1 in human vascular endothelial cells. *Cancer Res.* 1997;57(23):5421-5.
69. Feliars D. Vascular endothelial growth factor as a prognostic marker of lupus nephritis. *Kidney Int.* 2009;75(12):1251-3.
70. Di Marco GS, Reuter S, Hillebrand U, Amler S, König M, Larger E, et al. The soluble VEGF receptor sFlt1 contributes to endothelial dysfunction in CKD. *J Am Soc Nephrol.* 2009;20(10):2235-45.
71. Onoue K, Uemura S, Takeda Y, Somekawa S, Iwama H, Imagawa K, et al. Reduction of circulating soluble fms-like tyrosine kinase-1 plays a significant role in renal dysfunction-associated aggravation of atherosclerosis. *Circulation.* 2009;120(24):2470-7.
72. Freire EA, Souto LM, Ciconelli RM. Assessment measures in systemic lupus erythematosus. *Rev Bras Reumatol.* 2011;51(1):70-80.
73. Sutton EJ, Davidson JE, Bruce IN. The systemic lupus international collaborating clinics (SLICC) damage index: a systematic literature review. *Semin Arthritis Rheum.* 2013;43(3):352-61.

74. Bombardier C, Gladman DD, Urowitz MB, Caron D, Chang CH. Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE. *Arthritis Rheum.* 1992;35(6):630-40.
75. Gladman DD, Ibañez D, Urowitz MB. Systemic lupus erythematosus disease activity index 2000. *J Rheumatol.* 2002;29(2):288-91.
76. Ginzler EM, Wofsy D, Isenberg D, Gordon C, Lisk L, Dooley MA, et al. Nonrenal disease activity following mycophenolate mofetil or intravenous cyclophosphamide as induction treatment for lupus nephritis: findings in a multicenter, prospective, randomized, open-label, parallel-group clinical trial. *Arthritis Rheum.* 2010;62(1):211-21.
77. Costedoat-Chalumeau N, Amoura Z, Hulot JS, Hammoud HA, Aymard G, Cacoub P, et al. Low blood concentration of hydroxychloroquine is a marker for and predictor of disease exacerbations in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2006;54(10):3284-90.
78. Erkan D, Willis R, Murthy VL, Basra G, Vega J, Ruiz-Limón P, et al. A prospective open-label pilot study of fluvastatin on proinflammatory and prothrombotic biomarkers in antiphospholipid antibody positive patients. *Ann Rheum Dis.* 2014;73(6):1176-80.
79. Smadja D, Gaussem P, Roncal C, Fischer AM, Emmerich J, Darnige L. Arterial and venous thrombosis is associated with different angiogenic cytokine patterns in patients with antiphospholipid syndrome. *Lupus.* 2010;19(7):837-43.
80. Ozgonenel L, Cetin E, Tutun S, Tonbaklar P, Aral H, Guvenen G. The relation of serum vascular endothelial growth factor level with disease duration and activity in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol.* 2010;29(5):473-7.
81. Lin TT, Lu J, Qi CY, Yuan L, Li XL, Xia LP, et al. Elevated serum level of IL-27 and VEGF in patients with ankylosing spondylitis and associate with disease activity. *Clin Exp Med.* 2014.
82. Meki AR, Al-Shobaili H. Serum Vascular Endothelial Growth Factor, Transforming Growth Factor β 1, and Nitric Oxide Levels in Patients With Psoriasis Vulgaris: Their Correlation to Disease Severity. *J Clin Lab Anal.* 2014.

APÊNDICE A – Termo de consentimento livre e esclarecido**Estudo para diagnóstico diferencial entre pré-eclâmpsia e nefrite lúpica**

Nome : _____ Idade: _____

Data: ____ / ____ / ____ C. Identidade : _____ Emitida por
: _____Endereço : _____ CEP:

Você está sendo convidada a participar deste projeto porque está sendo atendida pelo serviço de Obstetrícia ou Reumatologia do Hospital Universitário Pedro Ernesto. Este projeto tem por objetivo estudar se existe diferença entre algumas proteínas (VEGF, PlGF, sFlt-1) no sangue de mulheres com e sem lúpus eritematoso sistêmico durante o período de gravidez. Para participar, é necessário responder a um questionário, colher um tubo de sangue venoso e um pote pequeno de urina (exame de EAS). Pode ser necessário colher urina de 24 horas – este exame será dispensado se já tiver sido feito na última semana. Caso você tenha lúpus será necessário colher mais um tubo de sangue para avaliar a doença. Este estudo será desenvolvido por médicos do Pedro Ernesto e alunos de medicina da UERJ.

A participação neste estudo não é obrigatória e, mesmo aceitando participar, você poderá sair do estudo a qualquer momento, sem que isto leve a alguma punição ou restrição no seu tratamento. Todos os dados deste estudo serão mantidos em segredo, mas poderão ser publicados em revistas científicas sem qualquer identificação dos participantes.

Participando deste estudo não terá nenhum custo diferente dos que já vinha tendo com o seu tratamento e também não terá qualquer custo com os exames que serão realizados. Participando deste estudo também não receberá qualquer tratamento diferenciado em relação às outras pacientes.

Qualquer dúvida antes, durante ou após o estudo poderá ser esclarecida pelo seu médico assistente e/ou médicos responsáveis pelo estudo.

Declaro que concordei em participar deste projeto, de acordo com os esclarecimentos acima:

Nome : _____ Assinatura : _____

Data : ____ / ____ / ____

Médicos responsáveis pelo projeto: Dr. Evandro M. Klumb (tel: 2868 8216), Dr. Guilherme R. R. de Jesús e Dr. Nilson R. de Jesús (tel: 2868 8451).

Comitê de ética em Pesquisa do HUPE: (tel: 2868 8253).

Testemunha : _____ Testemunha : _____

APÊNDICE B – Ficha clínica para pacientes com LES**Estudo para avaliação de fatores angiogênicos e antiangiogênicos em mulheres com LES****Ficha Clínica - Mulheres com LES**

Data do preenchimento ___/___/___

1 - Identificação:

Nome _____ Prontuário _____

Idade _____ Estado civil _____ Naturalidade _____

Endereço _____ Bairro _____

_____ Cidade _____ CEP _____

Telefone _____

Cor: Branca () Parda () Negra () Indígena () Amarela () Outra ()**2 - Manifestações Clínicas:**

Idade do início da doença _____ Idade do diagnóstico _____

Idade de óbito _____ Causa _____

Data dos primeiros sintomas de LES: ___/___/___

Tempo entre início dos sintomas e diagnóstico: _____ meses

Sintomas nos primeiros três meses:

—

—

Manifestações clínicas e laboratoriais evolutivas:

Eritema malar () Lesão discóide () Úlcera oral () Fotossensibilidade ()

Artrite () Serosite () Pericardite () Pleuris () Ascite () Neurológicas ()

Psicose () Convulsão () Outros _____

Renais () Proteinúria > 0,5 g/d (>3+) () Cilindrúria () Hematúria ()

Biópsia: Data ___/___/___ Tipo _____

Hematológicas () Anemia hemolítica com reticulocitose ()

Leucopenia < 4000/mm³, em > 2 ocasiões ()Linfopenia < 1500/mm³, em > 2 ocasiões ()

Trombocitopenia < 100 000/ mm³ na ausência de medicamentos
ofensivos ()

Imunológicas: anti-DNA nativo () anti-Sm () anti- SS-A (Ro) () anti-SS-B (La) ()
anti-RNP () VDRL Falso + () ↓ complemento () FAN () Título:_____ Padrão:

Medicações em uso:

HAS S () N () Qual

medicação_____

Uso de Estatina S () N ()

Uso de AAS S () N ()

Creatinina sérica (mg/dl): _____

Proteinúria (g/24h ou relação proteinúria/creatininúria): _____

APÊNDICE C – Medida da Atividade da Doença Lúpus Eritematoso Sistêmico (SLEDAI)

Descrição	Definição	Pontos
Convulsão	Início recente. Excluir infecção metabólica ou causas devido ao medicamento	8
Psicose	Capacidade alterada para função em atividade normal devido a distúrbio severo na percepção da realidade. Inclui alucinação, incoerência, perda marcante de associações, empobrecimento do conteúdo do pensamento, pensamento ilógico marcante, comportamento bizarro, desorganizado ou catatônico. Excluir uremia e causas devido ao medicamento.	8
Síndrome cerebral orgânica	Função mental alterada com orientação prejudicada, memória ou outra função intelectual com início rápido e características clínicas instáveis. Inclui estado alterado da consciência com redução da capacidade de foco e incapacidade de manter a atenção no ambiente mais pelo menos 2 dos seguintes: distúrbio de percepção, fala incoerente, insônia ou sonolência durante o dia ou aumento ou diminuição da atividade psicomotora. Excluir causas devido ao medicamento, infecção ou metabólicas.	8
Distúrbio visual	Alterações retinianas de LES . Incluir corpos citóides, hemorragia retiniana, exsudato seroso ou hemorragia na coróide, ou neurite óptica. Excluir causas devido ao medicamento, infecção ou hipertensão.	8
Distúrbio dos nervos cranianos	Novo começo de neuropatia motora ou sensorial comprometendo nervos cranianos.	8
Dor de cabeça lúpica	Dor de cabeça severa persistente; pode ser enxaqueca, mas não deve ser responsiva à analgesia narcótica.	8
Acidente vascular cerebral (AVC)	Novo início de acidente(s) vascular(es) cerebral(is). Excluir arteriosclerose.	8
Vasculite	Ulceração, gangrena, nódulos moles dos dedos, infarto periungueal, hemorragia <i>splinter</i> , ou biópsia ou arteriografia de vasculite.	8
Artrite	Mais de 2 articulações com dor e sinais de inflamação (isto é, sensibilidade, inchaço e efusão).	4
Miosite	Músculo proximal dolorido ou fraqueza associada com aldolase ou creatina fosfoquinase elevada, ou alterações de eletromiograma, ou uma biópsia apresentando miosite.	4
cilindros urinários	Cilindros de hemácias ou heme-granular	4
Hematúria	> 5 hemácias por campo. Excluir cálculo, infecção ou outras causas.	4
Proteinúria	> 0,5 g por 24 horas. Novo início ou aumento recente de mais que 0,5 g por 24 horas.	4
Piúria	> 5 leucócitos por campo. Excluir infecção.	4
Nova erupção	Novo início ou recorrência de erupção do tipo inflamatório	2
Alopecia	Novo início ou recorrência de perda anormal de cabelo difusa ou em placa.	2
Ulceras na mucosa	Novo início ou recorrência de ulcerações nasais ou orais.	2
Pleurisia	Dor torácica pleurítica com atrito pleural ou efusão ou espessamento pleural	2
Pericardite	Dor pericárdica com pelo menos 1 dos seguintes: efusão de atrito ou confirmação por eletrocardiograma.	2
Baixo complemento	Diminuição no CH50, C3 ou C4 abaixo do limite mínimo do normal para exame de laboratório.	2
Ligação ao DNA aumentada	ligação > 25 % pelo ensaio de Farr ou acima da faixa normal para exame de laboratório.	2
Febre	> 38 °C. Excluir causas infecciosas.	1
Trombocitopenia	< 100 000 plaquetas por mm ³	1
Leucopenia	< 3000 leucócitos por mm ³ . Excluir causas devido ao medicamento.	1

APÊNDICE D – Índice de dano cumulativo (SLICC)

SLICC

Nome _____

Prontuário _____

	Escore	Paciente	Data
Ocular Catarata	1		
Mudança na retina ou atrofia óptica	1		
Neuropsiquiátrico Déficit cognitivo*	1		
Convulsões tratadas por 6m	1		
AVC (score 2>1)	1 (2)		
Neuropatia craniana ou periférica (exceto óptica)	1		
Mielite transversa	1		
Renal TFG medida ou estimada < 50%	1		
Proteinúria > 3,5 g/24horas	1		
OU			
Doença renal terminal (aguardando diálise ou transplante)	3		
Pulmonar Hipertensão pulmonar (HVD ou P2 > A2)	1		
Fibrose pulmonar (exame físico ou radiográfico)	1		
Síndrome dos pulmões encolhidos	1		
Fibrose pleural (radiográfico)	1		
Infarto pulmonar (radiográfico)	1		
Cardiovascular Angina ou cirurgia de revascularização miocárdica	1		
IAM (score 2 se > 1)	1 (2)		
Cardiomiopatia (disfunção ventricular)	1		
Doença Valvar (sopro sistólico ou sopro diastólico > 3/6)	1		
Pericardite por 6m ou pericardiectomia	1		
Vascular periférico Claudicação por 6m	1		
Perda pequena de tecido (polpa digital)	1		
Qualquer perda significativa de tecido (dedo ou membro) (score 2 se > 1)	1 (2)		
Trombose venosa com edema, ulceração ou estase venosa	1		
Gastrointestinal Infarto ou ressecção do intestino abaixo do duodeno, esplênico, hepático ou da vesícula biliar, por qualquer causa (score 2 se >1 lugar)	1 (2)		
Insuficiência mesentérica	1		
Peritonite crônica	1		
Estreitamento ou qualquer cirurgia do TGI superior	1		
Musculoesquelético Atrofia ou fraqueza muscular	1		
Artrite deformante ou erosiva (incluindo deformidades redutíveis, com exceção de necrose avascular)	1		
Osteoporose com fratura ou colapso vertebral (com exceção avascular)	1		
Necrose avascular (score 2 se > 1)	1 (2)		
Osteomielite	1		
Pele Alopecia crônica cicatricial	1		
Cicatriz extensa ou de panículum que não seja escalpo polpa digital	1		
Ulceração de pele (excluindo trombose) por 6 m	1		
Insuf. Gonadal prematura	1		

Diabetes Mellitus (apesar de tratamento)	1		
Malignidade (excluindo displasia) (score 2 se > 1 lugar)	1 (2)		

APÊNDICE E – Termo de consentimento para o grupo controle

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da pesquisa: COLO DE ÚTERO: ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE TIPOS DE HPV EM LESÕES PRÉ-MALIGNAS E MALIGNAS.

Nome : _____ Idade: _____
 Data: __ / __ / __ C. Identidade: _____ Emitida por: _____ Reg.: _____
 Endereço : _____ CEP: _____

Você está sendo convidada a participar de uma pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE/UEJR) e do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG/UERJ) que visa identificar as mulheres infectadas pelo papilomavírus humano (HPV), determinar o tipo de HPV nas mulheres infectadas, avaliar a presença de alguns fatores que podem estar associados a esta infecção e identificar as mulheres que apresentam alterações no colo do útero. Ao realizar este estudo, nosso grupo de pesquisa da UERJ pretende melhorar o conhecimento sobre a infecção pelo HPV na população e as ações de prevenção do câncer do colo do útero.

O referido estudo será conduzido por médicos, professores e alunos de cursos de graduação dessa instituição, e incluirá, além da realização de questionário com perguntas de caráter pessoal, a coleta de material do colo do útero, como realizado no exame preventivo ginecológico, e de uma amostra de seu sangue, da forma usualmente empregada nos laboratórios de análises clínicas.

O material do colo do útero será examinado no laboratório para verificação de possíveis alterações celulares (exame citopatológico – preventivo) e da presença e tipo do HPV. O sangue coletado será processado visando sua utilização em estudos moleculares, bioquímicos e imunológicos.

É importante que você saiba que sua participação nesta pesquisa é completamente voluntária e que você pode se recusar a participar ou interromper sua participação a qualquer momento, sem que isto venha a causar qualquer prejuízo ao seu tratamento. Participando deste estudo, você também não receberá qualquer ajuda financeira ou tratamento diferenciado, exceto os recomendados, de acordo com a indicação médica e disponibilidades de recursos desta instituição.

As informações obtidas na entrevista e os resultados dos exames poderão ser consultados pelo Comitê de Ética do HUPE/UERJ e pela equipe de pesquisadores envolvidos. Seu nome não será revelado, ainda que informações sejam utilizadas para fins educativos ou de publicação, que ocorrerão independentemente dos resultados obtidos.

Qualquer dúvida antes, durante ou após o estudo que guarde relação com este, poderá ser esclarecida pelo seu médico assistente.

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO E ASSINATURA

Com base nos esclarecimentos que me foram dados acima, declaro que concordei em participar desta pesquisa e entendo que ao fazê-lo não terei nenhum custo diferente dos que já vinha tendo com o meu tratamento, bem como também não terei qualquer custo com os exames que porventura vierem a ser realizados.

Conforme previsto neste projeto, autorizo a utilização do material coletado em estudos futuros desde que sejam mantidos os critérios do projeto atual.

_____	____ / ____ / ____
(Assinatura do Paciente)	dia mês ano
_____	____ / ____ / ____
(Nome do Paciente – letra de forma)	dia mês ano
_____	____ / ____ / ____
(Testemunha, se necessário)	dia mês ano
_____	____ / ____ / ____
(Assinatura da pessoa que obteve o consentimento)	dia mês ano

APÊNDICE F – Ficha clínica das mulheres do grupo controle, com exposição dos dados pertinentes ao presente estudo

1. Data da Entrevista: / / _2_ _0_ _

2. Nº do Prontuário: _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _

3. Nome Completo: _____

4. Endereço: _____ Bairro: _____
 Cidade: _____ CEP: _____

5. Telefone Residencial/Celular: _____ / _____

6. Em que dia, mês e ano a senhora nasceu?

_ _ _ / _ _ _ / _ _ _ _ 99/99/9999 _ NS/NR
 Dia Mês Ano

7. Em que local a senhora nasceu?

a. País: _____ _ _ (codificação posterior)

b. Cidade/Estado: _____ _ _ (codificação posterior)

8. Há quantos anos a senhora mora na cidade do Rio de Janeiro?

_ _ anos 99 _ NS/NR

9. Qual é a situação conjugal atual da senhora?

1 _ Solteira 4 _ Viúva

2 _ Casada ou vive com alguém na mesma casa 9 _ NS/NR

3 _ Separada/Desquitada/Divorciada

15. Na sua opinião, qual é a sua cor ou raça?

1 _ Branca 3 _ Negra 5 _ Amarela
 2 _ Parda 4 _ Indígena 9 _ NS/NR

18. Algum médico já disse que a senhora tem ou teve algumas das doenças que vou citar?

Quando

a. sífilis	1 <input type="text"/> _ Sim	2 <input type="text"/> _ Não	_____
b. gonorréia	1 <input type="text"/> _ Sim	2 <input type="text"/> _ Não	_____
c. Clamydia/Tricomoníase	1 <input type="text"/> _ Sim	2 <input type="text"/> _ Não	_____
d. verruga genital/condiloma(HPV)	1 <input type="text"/> _ Sim	2 <input type="text"/> _ Não	_____
e. herpes	1 <input type="text"/> _ Sim	2 <input type="text"/> _ Não	_____
f. AIDS	1 <input type="text"/> _ Sim	2 <input type="text"/> _ Não	_____
g. câncer de mama	1 <input type="text"/> _ Sim	2 <input type="text"/> _ Não	_____
h. câncer de colo do útero	1 <input type="text"/> _ Sim	2 <input type="text"/> _ Não	_____
i. câncer de ovário	1 <input type="text"/> _ Sim	2 <input type="text"/> _ Não	_____
j. câncer de endométrio	1 <input type="text"/> _ Sim	2 <input type="text"/> _ Não	_____
l. lúpus	1 <input type="text"/> _ Sim	2 <input type="text"/> _ Não	_____
m. outro tipo de câncer	1 <input type="text"/> _ Sim	2 <input type="text"/> _ Não	_____
Qual?	_____		

19. Mencione se alguns de seus familiares (PAIS-1, IRMÃOS-2, FILHOS-3 AVÓS-4, TIOS-5 OU PRIMOS-6) têm ou já tiveram alguma das seguintes doenças. (M-materno ou P-paterno) Quem?

- | | | | | | | | |
|----------------------------|---|--------------------------|-----|---|--------------------------|-----|-------|
| a. câncer de mama | 1 | <input type="checkbox"/> | Sim | 2 | <input type="checkbox"/> | Não | _____ |
| b. câncer de colo do útero | 1 | <input type="checkbox"/> | Sim | 2 | <input type="checkbox"/> | Não | _____ |
| c. câncer de ovário | 1 | <input type="checkbox"/> | Sim | 2 | <input type="checkbox"/> | Não | _____ |
| d. câncer de endométrio | 1 | <input type="checkbox"/> | Sim | 2 | <input type="checkbox"/> | Não | _____ |
| f. lupus | 1 | <input type="checkbox"/> | Sim | 2 | <input type="checkbox"/> | Não | _____ |
| e. outro tipo de câncer | 1 | <input type="checkbox"/> | Sim | 2 | <input type="checkbox"/> | Não | _____ |
- Qual? _____

Exclusão de LES / Doença auto-imune / Uso de imunossupressor

47. A senhora é portadora de doença reumática conhecida?

- 1 Sim 2 Não 9 NS/NR

48. A senhora apresenta alguma queixa reumática?

- 1 Sim 2 Não 9 NS/NR

49. A senhora apresenta ou já apresentou qualquer um desses sinais/sintomas que vou citar?

- | | | | | | | |
|---|---|--------------------------|-----|---|--------------------------|-----|
| a. história familiar de doença auto-imune | 1 | <input type="checkbox"/> | Sim | 2 | <input type="checkbox"/> | Não |
| b. lesões na pele compatíveis com lúpus | 1 | <input type="checkbox"/> | Sim | 2 | <input type="checkbox"/> | Não |
| c. fotosensibilidade | 1 | <input type="checkbox"/> | Sim | 2 | <input type="checkbox"/> | Não |
| d. rash malar | 1 | <input type="checkbox"/> | Sim | 2 | <input type="checkbox"/> | Não |
| e. lesões discóides | 1 | <input type="checkbox"/> | Sim | 2 | <input type="checkbox"/> | Não |
| f. artralgia / artrite | 1 | <input type="checkbox"/> | Sim | 2 | <input type="checkbox"/> | Não |
| g. derrame pleural | 1 | <input type="checkbox"/> | Sim | 2 | <input type="checkbox"/> | Não |
| h. dor pelurítica | 1 | <input type="checkbox"/> | Sim | 2 | <input type="checkbox"/> | Não |
| i. derrame pericárdico | 1 | <input type="checkbox"/> | Sim | 2 | <input type="checkbox"/> | Não |
| j. anemia hemolítica | 1 | <input type="checkbox"/> | Sim | 2 | <input type="checkbox"/> | Não |
| l. púrpura trombocitopênica imunológica | 1 | <input type="checkbox"/> | Sim | 2 | <input type="checkbox"/> | Não |
| m. nefrite | 1 | <input type="checkbox"/> | Sim | 2 | <input type="checkbox"/> | Não |
| n. FAN positivo | 1 | <input type="checkbox"/> | Sim | 2 | <input type="checkbox"/> | Não |
| o. auto anticorpos | 1 | <input type="checkbox"/> | Sim | 2 | <input type="checkbox"/> | Não |

É POSSÍVEL EXCLUIR O DIAGNÓSTICO DE LES? 1 Sim 2 Não

50. A senhora usa ou já usou algum imunossupressor?

- 1 Sim. Qual? _____ 2 Não 9 NS/NR

51. A senhora usa ou já usou qualquer um dos medicamentos que vou citar?

- | | | | | | | |
|-------------------------|---|--------------------------|-----|---|--------------------------|-----|
| a. AZATIOPRINA | 1 | <input type="checkbox"/> | Sim | 2 | <input type="checkbox"/> | Não |
| b. CICLOFOSFAMIDA | 1 | <input type="checkbox"/> | Sim | 2 | <input type="checkbox"/> | Não |
| c. MICOFENOLATO MOFETIL | 1 | <input type="checkbox"/> | Sim | 2 | <input type="checkbox"/> | Não |
| d. CICLOSPORINA | 1 | <input type="checkbox"/> | Sim | 2 | <input type="checkbox"/> | Não |
| e. METOTREXATO | 1 | <input type="checkbox"/> | Sim | 2 | <input type="checkbox"/> | Não |

52. A senhora usa ou já usou cortisona?

- 1 Sim. Quando? _____ Motivo? _____
 2 Não
 9 NS/NR

OBSERVAÇÕES:

Doenças intercorrentes?

1 Sim. Qual? _____ 2 Não 9 NS/NR

Outras observações:

APÊNDICE G – The use of angiogenic and antiangiogenic factors in the differential diagnosis of pre-eclampsia, antiphospholipid syndrome nephropathy and lupus nephritis (Artigo científico em revisão para publicação)

XML Template (2014) [12.1.2014-9:34pm] [1-1]
#D:\ms3\comp\app\journal\SAGE\382\LUP\40100000\400571A\991\w5-LUP\401057.3d (LUP) [PREPINTER .eps]

Author Query Form

Journal Title: Lupus (LUP)

Article Number: 529172

Dear Author/Editor,

Greetings, and thank you for publishing with SAGE. Your article has been copyedited and typeset, and if we have any queries for you they are listed below. Please address these queries when you return your proof corrections. Thank you for your time and effort.

Please ensure that you have obtained and enclosed all necessary permissions for the reproduction of artistic works, (e.g. illustrations, photographs, charts, maps, other visual material, etc.) not owned by yourself, and ensure that the Contribution contains no unlawful statements and does not infringe any rights of others, and agree to indemnify the Publisher, SAGE Publications Ltd, against any claims in respect of the above warranties and that you agree that the Conditions of Publication form part of the Publishing Agreement.

Any colour figures have been incorporated for the on-line version only. Colour printing in the journal must be arranged with the Production Editor, please refer to the figure colour policy outlined in the e-mail.

Please assist us by clarifying the following query:

1. Please check the running heading is correct.

SPECIAL ARTICLE

The use of angiogenic and antiangiogenic factors in the differential diagnosis of pre-eclampsia, antiphospholipid syndrome nephropathy and lupus nephritis

GR de Jesus¹, NR de Jesus¹, RA Levy² and EM Klumb²

¹Department of Obstetrics, ²Department of Rheumatology, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Brazil

Pre-eclampsia (PE) is a major cause of maternal mortality and morbidity, perinatal deaths, preterm birth and intrauterine growth restriction. Differential diagnosis with antiphospholipid syndrome (APS) nephropathy and systemic lupus erythematosus (SLE) nephritis during pregnancy is difficult, if not sometimes impossible, as all three diseases may present hypertension and proteinuria. Improvement in diagnosis of PE has also offered new paths for differential diagnosis with other conditions and the analysis of angiogenic (vascular endothelial growth factor, placental growth factor) and antiangiogenic factors (serum soluble fms-like tyrosine kinase 1, soluble endoglin) is promising for differentiation between PE, APS Nephropathy and SLE nephritis. This article reviews published studies about those factors in non-pregnant and pregnant patients with APS and SLE, compared with patterns described in PE. *Lupus* (2014) 0, 1–3.

Key words: Angiogenic factors; antiphospholipid Syndrome; systemic Lupus; erythematosus; pre-eclampsia; pregnancy; antiangiogenic factors

Introduction

Pre-eclampsia (PE) is a major cause of maternal mortality and morbidity, perinatal deaths, preterm birth and intrauterine growth restriction. Its frequency ranges from 2% to 7% in healthy nulliparous women, but a few medical conditions can increase its incidence, such as chronic hypertension, diabetes mellitus, previous PE, systemic lupus erythematosus (SLE) and antiphospholipid syndrome (APS). Definite diagnosis of PE is based on hypertension and proteinuria after 20 weeks of pregnancy, but those findings can already be present before pregnancy or be a consequence of an underlying disease, not directly related to PE itself.¹

APS nephropathy and SLE nephritis are two of those conditions that require special attention by clinical practitioners, as both have hypertension and proteinuria as main forms of presentation

and affect women of reproductive age. Additional laboratory and clinical findings can also overlap between PE, APS nephropathy and SLE nephritis, making it hard, sometimes impossible, to identify the disease responsible for the clinical condition. This has practical implications, because the treatment varies significantly: In PE, delivery should be considered; anticoagulation is recommended for APS nephropathy and immunosuppressive drugs should be administered to patients with SLE nephritis.²

In the last decade, improvement in the diagnosis of PE has also offered new paths for differential diagnosis with other conditions. It has been described that antiangiogenic factors, such as serum soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt-1) and soluble endoglin (sEng), are increased in patients with PE compared to healthy controls, whereas serum vascular endothelial growth factor (VEGF) and placental growth factor (PlGF), two important angiogenic factors, are decreased. During pregnancy, these angiogenic factors induce production of nitric oxide and vasodilatory prostacyclins in endothelial cells, increase vascular permeability and promote glomerular healing. Its

Correspondence to: Guilherme R de Jesus, Departamento de Obstetrícia, Hospital Universitário Pedro Ernesto, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Avenida Professor Manoel de Abreu, 500, 1º andar, 20550-170, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.
 Email: guilhermedejesus@gmail.com
 Received 24 February 2014; accepted 4 March 2014

blockage by antiangiogenic factors results in endothelial dysfunction, hypertension and proteinuria in patients with PE.³

The analysis of angiogenic and antiangiogenic factors is promising for differentiation between PE, APS nephropathy and SLE nephritis. Understanding patterns of those factors in non-pregnant patients with APS and SLE pregnancy is crucial and few publications have addressed this question. The group from St Thomas' Hospital studied VEGF expression in monocytes of 55 primary APS patients, describing increased expression compared to controls,⁴ and also reported significantly higher soluble VEGF in a similar group of patients.⁵ Smadja et al. analyzed serum VEGF and PlGF 34 patients with APS, divided between arterial and venous thrombosis, and compared results to 180 healthy controls and 80 patients with deep venous thrombosis without antiphospholipid antibodies. VEGF was higher than controls in patients with APS and arterial thrombosis, while it was similar to controls in patients with venous thrombosis. Moreover, PlGF was higher than controls in both groups of patients with APS.⁶

There are no published studies examining sFlt-1 in non-pregnant patients with APS or even analyzing angiogenic and antiangiogenic factors in pregnant patients with APS, but these markers could be useful in hypertensive disorders of pregnancy, as reported elevation of VEGF and PlGF in patients with APS is the opposite of that found in patients with PE. However, studies analyzing sFlt-1 in non-pregnant APS patients are needed before it could be tested during pregnancy, in order to evaluate the influence of the underlying disease in this marker.

There are more publications considering angiogenic and antiangiogenic factors in non-pregnant patients with SLE. Most studies described increased VEGF in patients with active disease, with similar results when inactive SLE was compared to controls, and PlGF was also elevated in SLE patients compared to controls in two publications from the same group.⁷ These results may represent endothelial dysfunction, which is known to be present in patients with SLE. Considering sFlt-1 analysis in non-pregnant patients with SLE, results are inconsistent, with a recent report of elevated sFlt-1 in children with active SLE nephritis compared to inactive SLE nephritis and controls.⁸

In our center, we investigated PlGF and sFlt-1 in 57 patients with SLE, both active and inactive, and compared the results to 34 healthy control women without autoimmune disease (unpublished data). Patients with SLE had increased PlGF and sFlt-1 compared to controls, while there was no

Table 1 Serum placental growth factor (PlGF) and soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt-1) in patients with systemic lupus erythematosus (SLE) compared to healthy controls

	PlGF (mean, pg/ml)	sFlt-1 (mean, pg/ml)
All SLE (n = 57)	42.08 ^a	109.70 ^a
Active SLE (n = 25)	41.85 ^b	118.21 ^c
Inactive SLE (n = 32)	42.26 ^b	103.05 ^c
Controls (n = 34)	13.68 ^a	70.27 ^a

^ap = 0.01, confidence interval (CI) 95%, Mann-Whitney test. ^bp = 0.74, CI 95%, Mann-Whitney test. ^cp = 0.13, CI 95%, Mann-Whitney test.

statistical difference in the studied factors when SLE patients were compared according to disease activity (Table 1). The singularity of this group is that most of the SLE patients had a history of nephritis, a clinical manifestation that has not been reported in most of publications about angiogenic factors and lupus.

Once again, the results of serum VEGF and PlGF in patients with SLE have a pattern different from those reported in patients with PE. sFlt-1 appears to be elevated in both conditions, but values are apparently higher in PE. During pregnancy, one study described increased sFlt-1 in SLE patients with PE compared to SLE patients without PE,⁹ while a case report of an SLE patient with a history of nephritis who developed severe PE at 21 weeks and six days of pregnancy found sFlt-1 above the 95th percentile with PlGF lower than the first percentile.¹⁰

In conclusion, evaluation of angiogenic (VEGF, PlGF) and antiangiogenic (sFlt-1, sEng) factors in patients with APS and SLE may represent endothelial dysfunction associated with those diseases, but can also be a useful tool to differentiate APS nephropathy and SLE nephritis from PE during pregnancy. This could improve management of pregnant patients with APS and SLE, providing a more accurate diagnosis and allowing appropriate treatment. In Hospital Universitário Pedro Ernesto, there are ongoing studies to enhance current knowledge of the aforementioned factors in patients with autoimmune diseases during the gestational period and outside of it.

Funding

This research received no specific grant from any funding agency in the public, commercial, or notfor-profit sectors

Conflict of interest statement

The authors have no conflicts of interest to declare.

References

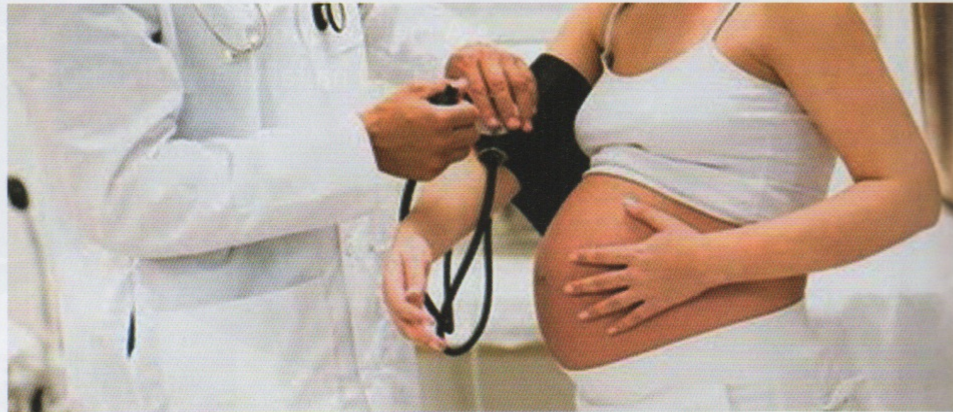
- 1 Sibai B, Dekker G, Kupferminc M. Pre-eclampsia. *Lancet* 2005; 365: 785–799.
- 2 Sibai BM. Imitators of severe pre-eclampsia. *Semin Perinatol* 2009; 33: 196–205.
- 3 Maynard SE, Min JY, Merchan J, et al. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest* 2003; 111: 649–658.
- 4 Cuadrado MJ, Buendia P, Velasco F, et al. Vascular endothelial growth factor expression in monocytes from patients with primary antiphospholipid syndrome. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 2461–2469.
- 5 Williams FM, Parmar K, Hughes GR, Hunt BJ. Systemic endothelial cell markers in primary antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost* 2000; 84: 742–746.
- 6 Smadja D, Gaussem P, Roncal C, Fischer AM, Emmerich J, Darnige L. Arterial and venous thrombosis is associated with different angiogenic cytokine patterns in patients with antiphospholipid syndrome. *Lupus* 2010; 19: 837–843.
- 7 Robak E, Kierstan M, Cebula B, et al. Circulating endothelial cells and angiogenic proteins in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2009; 18: 332–341.
- 8 Edelbauer M, Kshirsagar S, Riedl M, et al. Soluble VEGF receptor 1 promotes endothelial injury in children and adolescents with lupus nephritis. *Pediatr Nephrol* 2012; 27: 793–800.
- 9 Qazi U, Lam C, Karumanchi SA, Petri M. Soluble Fms-like tyrosine kinase associated with preeclampsia in pregnancy in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 2008; 35: 631–634.
- 10 Rhee JS, Young BC, Rana S. Angiogenic factors and renal disease in pregnancy. *Case Rep Obstet Gynecol* 2011; 2011: 281391.

APÊNDICE H –. Citocinas angiogênicas na pré-eclâmpsia e na nefrite (Artigo científico)

Artigo Original

Citocinas Angiogênicas na PRÉ-CLÂMPSIA e na NEFRITE LÚPICA

Guilherme R. Jesus¹, Evandro M. Klumb²



A pré-eclâmpsia é uma desordem multifuncional de causa desconhecida que é exclusiva da gestação humana. É caracterizada pela resposta vascular anormal à placentação, levando ao aumento da resistência vascular periférica, da agregação plaquetária, ativação do sistema de coagulação e disfunção endotelial. Os achados clínicos de pré-eclâmpsia podem se manifestar como uma síndrome materna (hipertensão e proteinúria com ou sem outras anormalidades multissistêmicas) ou uma síndrome fetal (restrição do crescimento intra-uterino, oligodramnia, oxigenação deficiente) [1]. Na prática clínica, a síndrome materna é provavel-

mente mais de uma patologia com grandes diferenças entre a pré-eclâmpsia que ocorre próximo ao termo sem envolvimento fetal demonstrável e a pré-eclâmpsia que é associado com baixo peso ao nascer e parto prematuro [2].

A pré-eclâmpsia é uma das principais causas de morbi-mortalidade materna, morte perinatal, parto pré-termo e restrição de crescimento intra-uterino. Apesar de um bom desfecho para a maioria das gestantes, o atraso no seu diagnóstico pode favorecer a evolução para sua forma mais grave, a eclâmpsia, caracterizada por uma ou mais convulsões sobrepostas aos achados de pré-eclâmpsia. Enquanto nos

1- Disciplina de Obstetria, 2- Disciplina de Reumatologia - UERJ.

países desenvolvidos a frequência de eclâmpsia é de uma para duas mil gestações, nos países em desenvolvimento pode chegar até a uma em cada cem gestações. Calcula-se que pacientes gestantes em países desenvolvidos apresentam um risco médio de mortalidade por causas obstétricas durante a vida de um para quatro mil a um para dez mil, enquanto nos países com baixa renda esse risco varia entre um para quinze e um para cinquenta, apresentando uma taxa de mortalidade cem a duzentas vezes maior que na Europa e América do Norte [3].

Apesar de um grande número de pesquisas, a etiologia da pré-eclâmpsia continua desconhecida. Existem duas correntes de pensamento atuais que são discordantes: o modelo isquêmico, no qual a isquemia e a reperfusão levam a um estresse oxidativo e doença vascular; e o modelo imunológico, que considera uma mal-adaptação imune materno-paternal, isto é, uma reação aloimune materna disparada pela rejeição do aloenxerto fetal [1].

A disfunção endotelial generalizada pode ser responsável por todos os aspectos clínicos encontrados na pré-eclâmpsia e a identificação de fatores circulantes que servem como mediadores desta disfunção tornou-se assunto de grande interesse nas últimas décadas. Diversos grupos publicaram alterações em citocinas, fatores de crescimento e químicos, como TNF- α , IL-6, IL-1 α , IL-1 β , Fas Ligand, produtos lipídicos oxidados, neuroquinina-B e ADMA que são liberados pela placenta e/ou outras fontes maternas na pré-eclâmpsia [4].

Independentemente do modelo proposto como causa da pré-eclâmpsia, sabe-se que na gestação normal existe uma interação do trofoblasto endovascular e dos leucócitos decíduais, especialmente células natural-killer (NK), resultando na liberação de mitógenos responsáveis pela angiogênese necessária para o desenvolvimento placentário, principalmente o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e o fator de crescimento placentário (PIGF). Concentrações elevadas de VEGF livre também são importantes para manter em repouso o endotélio apesar do estresse inflamatório típico que envolve uma gesta-

ção normal. Outras funções do VEGF incluem induzir a produção de óxido nítrico e prostaciclina pelas células endoteliais, reduzindo o tônus vascular e a pressão arterial, promover a recuperação glomerular em modelo animal de glomerulonefrite e microangiopatia trombótica e, aumentar a permeabilidade vascular. Estudos sobre fatores antiangiogênicos demonstraram que o bloqueio de seus sinalizadores resultou em hipertensão e proteinúria. Considerando estes dados, o VEGF apresenta um papel importante não apenas na regulação da pressão sanguínea mas também em manter a integridade da barreira de filtração glomerular [5, 6].

Além da pré-eclâmpsia, a expressão reduzida do VEGF foi associada a várias nefropatias como a glomerulonefrite crescêntica, glomerulosclerose focal e a nefropatia por IgA, enquanto a administração de VEGF foi capaz de estabilizar a função renal em vários modelos animais, tendo como exemplos a microangiopatia trombótica e a lesão renal crônica por ciclosporina. Os efeitos protetores foram mediados principalmente pela preservação de estruturas capilares glomerulares e peritubulares [7].

Maynard e colaboradores estudaram o perfil genético de tecido placentário em mulheres com e sem pré-eclâmpsia e encontraram que o mRNA do receptor *frms-like* tirosina quinase 1 solúvel (sFlt-1) encontrava-se com expressão aumentada nas mulheres com pré-eclâmpsia. O sFlt-1 é uma variante do receptor de VEGF Flt-1 que não possui domínios transmembrana e citoplasmáticos, agindo como potente antagonista de VEGF e PIGF, apresentando, portanto, um perfil antiangiogênico. O mesmo grupo formulou a hipótese que o sFlt-1 circulante em excesso secretado pela placenta na pré-eclâmpsia levaria a disfunção endotelial, hipertensão e proteinúria ao antagonizar o VEGF e PIGF circulantes [5].

Maynard também demonstrou em outro estudo, que os níveis de sFlt-1 sérico medido por ELISA em pacientes com pré-eclâmpsia era maior que gestantes com pressão normal, chegando o aumento a 5 vezes no caso de pré-eclâmpsia grave. Considerando que o sFlt-1 funciona como antago-

nista ao se ligar aos fatores angiogênicos e prevenir a interação com seus receptores de superfície celular, foi demonstrado nesse grupo de pacientes que os valores séricos das frações livres de VEGF e PIGF estavam reduzidos proporcionalmente ao aumento de sFlt-1. Por fim, utilizando um modelo animal no qual foi administrado um adenovírus recombinante produtor de sFlt-1, houve desenvolvimento de hipertensão e proteinúria em ratas gestantes e não gestantes, inclusive com análise da histopatologia renal evidenciando endoteliose glomerular, lesão característica da pré-eclâmpsia [5].

Outros autores sugerem que, fisiologicamente, o estado pró-angiogênico do segundo trimestre da gestação (aumento de PIGF com sFlt-1 baixo) seria convertido para um estado anti-angiogênico (aumento do sFlt-1 e queda do PIGF e VEGF) e que nas pacientes com pré-eclâmpsia esta conversão seria mais precoce e abrupta, como um exagero do processo normal de controle do crescimento e funcionamento placentário [8].

Além da dificuldade de predição e de entendimento da fisiopatologia, a pré-eclâmpsia apresenta semelhança clínica e laboratorial com várias patologias obstétricas, clínicas e cirúrgicas, como por exemplo o fígado gorduroso agudo da gravidez, a púrpura trombocitopênica trombótica, a síndrome hemolítica urêmica, a sepse e a reativação do lúpus eritematoso sistêmico [9]. O tratamento difere entre estas patologias e o diagnóstico incorreto pode levar a uma elevada morbi-mortalidade materna e fetal [10].

Entre as pacientes com nefrite lúpica, os achados clínicos e laboratoriais são semelhantes àquelas com pré-eclâmpsia grave, apresentando hipertensão, proteinúria e edema [11]. A exacerbação grave do LES pode ocorrer em 25-30% das gestantes, inclusive podendo haver abertura do quadro durante a gravidez ou no período pós-parto [12].

Em uma revisão sistemática recente de 2751 gestações em 1842 pacientes com LES foram encontrados reativação da doença em 25,6% dos casos, hipertensão em 16,3%, nefrite em 16,1%, pré-eclâmpsia em 7,6%, eclâmpsia em 0,8% e prematuridade

em 39,4% dos partos. Houve associação positiva entre parto prematuro e nefrite ativa, assim como entre hipertensão e nefrite ativa ou história de nefrite [13].

A revisão de 76 gestações em 63 pacientes com lúpus no Hospital Universitário Pedro Ernesto encontrou resultados semelhantes. 15% das pacientes desenvolveram pré-eclâmpsia, 30% hipertensão arterial, 27% dos fetos apresentaram sofrimento fetal crônico e 14 pacientes precisaram aumentar corticosteróides durante a gestação. O parto ocorreu numa idade gestacional média de 35 semanas e foi notado um aumento do óbito fetal em pacientes com nefrite comparados quando comparado com pacientes sem nefrite (37% x 12,2%) [14].

Além dos resultados adversos maternos e perinatais associados à pré-eclâmpsia e ao LES, o diagnóstico diferencial entre as duas condições é complexo: ambos podem apresentar aumento de proteinúria, hipertensão, trombocitopenia e deterioração da função renal. A queda do complemento sérico, esperado durante a atividade do LES e que poderia auxiliar no diagnóstico diferencial, pode estar mascarado pelo seu aumento fisiológico na gestação. Há, portanto, necessidade de melhorar a acurácia do diagnóstico diferencial entre pré-eclâmpsia e LES com nefrite e a medida dos marcadores angiogênicos e anti-angiogênicos como sFlt-1 e PIGF torna-se promissora para este papel, mas estudos ainda são aguardados [15].

Até o momento, apenas um estudo contendo pacientes gestantes com LES estudou as medidas de sFlt-1 em pacientes com diagnóstico de pré-eclâmpsia, encontrando concentrações elevadas em comparação às pacientes com LES sem diagnóstico de pré-eclâmpsia. No entanto, o estudo é pequeno (18 casos e 34 controles), não avalia pacientes com nefrite lúpica e não mediu os títulos dos fatores angiogênicos VEGF e PIGF [16].

Hrycek [17] e Robak [18] estudaram sFlt-1 em pacientes com LES não gestantes e relataram não haver diferença da medida nas pacientes com doença inativa em relação ao controle. No entanto o primeiro autor encontrou valores menores em pacientes com

a doença ativa comparado com o controle enquanto o segundo encontrou valores maiores, ambos com diferença estatisticamente significativa.

O VEGF foi o fator mais amplamente estudado. Todos os autores concordam que não há aumento deste fator na doença inativa em comparação ao grupo controle [19]; [20]; [18]; [17]; [21]. Em relação à doença ativa, a maior parte dos autores encontrou aumento de VEGF [19]; [18]; [21], sendo que Navarro relatou aumento maior nas pacientes com insuficiência renal comparando com as pacientes com função renal normal [22]. Já Hrycek encontrou resultados semelhantes ao controle mesmo no LES ativo [17].

Avihingsanon estudou a expressão do mRNA do VEGF renal em material obtido através de biópsia para caracterização de nefrite em 35 pacientes com lúpus. Vinte e sete pacientes tiveram o diagnóstico histopatológico de nefrite lúpica classe IV e oito pacientes classe III segundo a classificação da Sociedade Internacional de Nefrologia / Sociedade de Patologia Renal (ISN/RPS, sigla em inglês). Os níveis de VEGF mRNA foram menores nas pacientes com nefrite lúpica quando comparados com o controle nas pacientes com formação de crescente, com altos valores do índice de atividade medido através de achados patológicos descritos por Austin [23] e com proliferação difusa endocapilar. No entanto, amostras com mais de 25% de infiltração neutrofílica glomerular não mostraram diferença no VEGF. O autor

encontrou, através da análise de uma curva ROC, um nível de mRNA capaz de prever 53% dos casos de perda de função renal (dobrando a creatinina sérica ou doença renal estágio terminal) em 12 meses [7].

Formulou-se a hipótese que a redução intra-renal de VEGF seria causada pela perda de células podócitárias na urina, já que o mesmo autor demonstrou em estudo anterior um aumento de VEGF urinário em pacientes com nefrite lúpica comprovadas por biópsia [24]. Ele comparou a amostra urinária de 21 pacientes no dia da realização da biópsia utilizada para medir o VEGF mRNA intra-renal e encontrou um aumento de WT-1 (marcador podocitário) e VEGF comparado com o controle [7].

A comparação deste resultado apresentado por Avihingsanon com os outros autores que estudaram o VEGF sérico não pode ser feita, pois o método de quantificação (PCR x ELISA) e o material obtido (tecido x soro) eram diferentes. Os efeitos locais do VEGF podem ser diferentes da resposta sistêmica e as medicações imunossupressoras utilizadas pelos pacientes podem servir como fator de confusão. O autor ainda comenta que a detecção do VEGF é de diferentes fontes celulares nestes dois modelos de estudo, sendo o VEGF sérico originado das células endoteliais e o VEGF renal originado das células epiteliais tubulares e podócitos [7].

Em suma, os estudos realizados em mulheres com pré-eclâmpsia e em pacientes com nefrite

A disfunção endotelial generalizada pode ser responsável por todos os aspectos clínicos encontrados na pré-eclâmpsia e a identificação de fatores circulantes que servem como mediadores desta disfunção tornou-se assunto de grande interesse nas últimas décadas. Diversos grupos publicaram alterações em citocinas, fatores de crescimento e químicos, como TNF- α , IL-6, IL-1 α , IL-1 β , Fas Ligand, produtos lipídicos oxidados, neuroquinina-B e ADMA que são liberados pela placenta e/ou outras fontes maternas na pré-eclâmpsia.



lúpica demonstram a importância dos fatores angiogênicos e anti-angiogênicos como citocinas diretamente envolvidas na fisiopatologia dessas condições. Por outro lado, esses mesmos estudos

sugerem a possibilidade de uso dessas citocinas como marcadores para o diagnóstico diferencial entre a pré-eclâmpsia e a nefrite lúpica em atividade durante a gestação.

Bibliografia

- Sibai, B., G. Dekker, and M. Kupferminc, *Pre-eclampsia*. *Lancet*, 2005. **365**(9461): p. 785-99.
- Vatten, L.J. and R. Skjaerven, *Is pre-eclampsia more than one disease?* *BJOG*, 2004. **111**(4): p. 298-302.
- Duley, L., *Pre-eclampsia and the hypertensive disorders of pregnancy*. *Br Med Bull*, 2003. **67**: p. 161-76.
- Davison, J.M., V. Homuth, A. Jeyabalan, K.P. Conrad, S.A. Karumanchi, S. Quaggin, et al., *New aspects in the pathophysiology of preeclampsia*. *J Am Soc Nephrol*, 2004. **15**(9): p. 2440-8.
- Maynard, S.E., J.Y. Min, J. Merchan, K.H. Lim, J. Li, S. Mondal, et al., *Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia*. *J Clin Invest*, 2003. **111**(5): p. 649-58.
- Silasi, M., B. Cohen, S.A. Karumanchi, and S. Rana, *Abnormal placentation, angiogenic factors, and the pathogenesis of preeclampsia*. *Obstet Gynecol Clin North Am*, 2010. **37**(2): p. 239-53.
- Avihingsanon, Y., T. Benjachat, A. Tassanarong, P. Sodsai, V. Kittikovit, and N. Hirankarn, *Decreased renal expression of vascular endothelial growth factor in lupus nephritis is associated with worse prognosis*. *Kidney Int*, 2009. **75**(12): p. 1340-8.
- Levine, R.J., S.E. Maynard, C. Qian, K.H. Lim, L.J. England, K.F. Yu, et al., *Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia*. *N Engl J Med*, 2004. **350**(7): p. 672-83.
- Haukkamaa, L., M. Salminen, H. Laivuori, H. Leinonen, V. Hiilesmaa, and R. Kaaja, *Risk for subsequent coronary artery disease after preeclampsia*. *Am J Cardiol*, 2004. **93**(6): p. 805-8.
- Sibai, B.M., *Imitators of severe pre-eclampsia*. *Semin Perinatol*, 2009. **33**(3): p. 196-205.
- Tandon, A., D. Ibanez, D.D. Gladman, and M.B. Urowitz, *The effect of pregnancy on lupus nephritis*. *Arthritis Rheum*, 2004. **50**(12): p. 3941-6.
- Cortes-Hernandez, J., J. Ordi-Ros, F. Paredes, M. Casellas, F. Castillo, and M. Vilardell-Tarres, *Clinical predictors of fetal and maternal outcome in systemic lupus erythematosus: a prospective study of 103 pregnancies*. *Rheumatology (Oxford)*, 2002. **41**(6): p. 643-50.
- Smyth, A., G.H. Oliveira, B.D. Lahr, K.R. Bailey, S.M. Norby, and V.D. Garovic, *A systematic review and meta-analysis of pregnancy outcomes in patients with systemic lupus erythematosus and lupus nephritis*. *Clin J Am Soc Nephrol*. **5**(11): p. 2060-8.
- Klumb, E.M., L.M.S. Barros, L. Romeiro, N.R. Jesús, R.A. Levy, and E.M.N. Albuquerque, *Impacto da nefrite sobre os resultados gestacionais de mulheres com lúpus eritematoso sistêmico*. *Revista Brasileira de Reumatologia*, 2005. **45**(3): p. 107-113.
- Day, C.J., G.W. Lipkin, and C.O. Savage, *Lupus nephritis and pregnancy in the 21st century*. *Nephrol Dial Transplant*, 2009. **24**(2): p. 344-7.
- Qazi, U., C. Lam, S.A. Karumanchi, and M. Petri, *Soluble Fms-like tyrosine kinase associated with preeclampsia in pregnancy in systemic lupus erythematosus*. *J Rheumatol*, 2008. **35**(4): p. 631-4.
- Hrycek, A., J. Janowska, and P. Cieslik, *Selected angiogenic cytokines in systemic lupus erythematosus patients*. *Autoimmunity*, 2009. **42**(5): p. 459-66.
- Robak, E., A. Sysa-Jedrzejewska, and T. Robak, *Vascular endothelial growth factor and its soluble receptors VEGFR-1 and VEGFR-2 in the serum of patients with systemic lupus erythematosus*. *Mediators Inflamm*, 2003. **12**(5): p. 293-8.
- Robak, E., A. Wozniacka, A. Sysa-Jedrzejewska, H. Stepien, and T. Robak, *Circulating angiogenesis inhibitor endostatin and positive endothelial growth regulators in patients with systemic lupus erythematosus*. *Lupus*, 2002. **11**(6): p. 348-55.
- Robak, E., L. Kulczycka, A. Sysa-Jedrzejewska, A. Wierzbowska, and T. Robak, *Circulating proangiogenic molecules PIGF, SDF-1 and sVCAM-1 in patients with systemic lupus erythematosus*. *Eur Cytokine Netw*, 2007. **18**(4): p. 181-7.
- Kuryliszyn-Moskal, A., P.A. Klimiuk, S. Sierakowski, and M. Ciolkiewicz, *Vascular endothelial growth factor in systemic lupus erythematosus: relationship to disease activity, systemic organ manifestation, and nailfold capillaroscopic abnormalities*. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2007. **55**(3): p. 179-85.
- Navarro, C., L. Candia-Zuniga, L.H. Silveira, V. Ruiz, M. Gaxiola, M.C. Avila, et al., *Vascular endothelial growth factor plasma levels in patients with systemic lupus erythematosus and primary antiphospholipid syndrome*. *Lupus*, 2002. **11**(1): p. 21-4.
- Austin, H.A., 3rd, L.R. Muenz, K.M. Joyce, T.T. Antonovych, and J.E. Balow, *Diffuse proliferative lupus nephritis: identification of specific pathologic features affecting renal outcome*. *Kidney Int*, 1984. **25**(4): p. 689-95.
- Avihingsanon, Y., P. Phumetin, T. Benjachat, S. Akkasilpa, V. Kittikovit, K. Praditpornsilpa, et al., *Measurement of urinary chemokine and growth factor messenger RNAs: a noninvasive monitoring in lupus nephritis*. *Kidney Int*, 2006. **69**(4): p. 747-53.