

MICHELLE REMIÃO UGOLINI LOPES

**Assinatura de interferon tipo I na síndrome
antifosfolípide primária**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciências

Programa de Ortopedia e Traumatologia

Orientadora: Dra. Danieli Castro Oliveira de
Andrade

**SÃO PAULO
2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Lopes, Michelle Remião Ugolini
Assinatura de interferon tipo I na síndrome
antifosfolípide primária / Michelle Remião Ugolini
Lopes. -- São Paulo, 2018.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Ortopedia e Traumatologia.
Orientadora: Danieli Castro Oliveira de Andrade .

Descritores: 1.interferon tipo I 2.síndrome
antifosfolipídica 3.genes 4.trombofilia 5.anticorpos
6.doenças autoimunes

USP/FM/DBD-301/18

Responsável: Eidi Raquel Franco Abdalla - CRB-8/4901

Dedico esta tese:

Aos meus pais, Clarice e Celso, meus exemplos de vida, apaixonados por sua profissão e que sempre me incentivaram na busca por conhecimento e aprimoramento.

Ao meu esposo, Alex, pelo imenso amor, admiração, cumplicidade e companheirismo na realização de nossos sonhos.

Aos meus familiares e amigos, por entenderem os momentos de ausência, e sempre me acolherem com carinho em nossos encontros.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, Dra. Danieli Castro Oliveira de Andrade, por todos seus ensinamentos, não apenas relacionados à pesquisa, mas também por seus ensinamentos de vida. Me guiarei sempre por seus exemplos de dedicação, perseverança e ética ao longo do meu caminho.

A minha coorientadora, Dra. Dirce Maria Carraro, pelo seu apoio e expertise na área de genética que desempenharam um papel fundamental para elaboração dessa pesquisa.

A Prof. Dra. Eloisa Silva Dutra de Oliveira Bonfá, por todo seu entusiasmo na área da pesquisa, que acabam contagiando toda sua equipe. Seus ensinamentos foram imprescindíveis desde a elaboração do projeto inicial até a finalização do manuscrito. Que esse entusiasmo perdure por todas as lideranças da Disciplina de Reumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, da qual tenho orgulho em pertencer.

Aos Doutores Eduardo Ferreira Borba Neto, Alexandre Wagner Silva de Souza e Ana Krepischi que compuseram minha banca de qualificação, pelas contribuições bastante relevantes e enriquecedoras para a tese.

A Ana Paula Gândara da equipe do Laboratório de Investigação Médica (LIM-17) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela elaboração e execução das análises laboratoriais desta pesquisa, fundamentais para o resultado obtido.

A Giovana Torrezan e Eloisa Helena R. Olivieri da equipe do AC Camargo Cancer Center por todo apoio desde a elaboração do projeto até a extração do RNA, determinação da assinatura genética e análise dos resultados obtidos.

A Danielle Daffre por toda dedicação na análise estatística e pela paciência em me ensinar detalhadamente cada etapa do processo.

A Iana Nascimento e Renata Rosa, Pós-Graduandas em síndrome antifosfolípide, pela grande ajuda na seleção dos pacientes e por todo apoio e amizade em diversas fases do projeto. Não há dúvidas que o caminho foi mais leve por tê-las ao meu lado.

A Dra. Erica Okazaki, assistente da disciplina de Hematologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, por toda ajuda na seleção dos controles positivos e parceria durante esse projeto.

A Dra. Vilma Trindade Viana, Margareti Borges, Virginia Lucia Bonoldi e Elaine Pires Leon da equipe do Laboratório de Investigação Médica (LIM-17) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo pela ajuda principalmente na fase do projeto piloto que foi essencial para que todo o resto desse certo.

Aos médicos assistentes da Disciplina de Reumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, especialmente aos colegas da enfermaria e do ambulatório de lúpus e síndrome antifosfolípide por todo o apoio e incentivo na rotina de trabalho.

As secretárias da Disciplina de Reumatologia: Cristina, Cláudia, Marta e Mayra, pela constante disposição em ajudar nas mais diversas situações.

A todos os pacientes, motivos da nossa profissão e motivos da realização desta pesquisa, pela confiança depositada em nosso trabalho.

Agradecimentos Especiais

À FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo,
que aprovou e financiou a execução deste projeto, pela confiança que
dedica aos pesquisadores e à pesquisa científica.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação.
Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias.

Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana,
Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão
de Biblioteca e Documentações; 2011.

Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas	
Lista de tabelas	
Lista de gráficos	
Resumo	
Abstract	
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Síndrome Antifosfolípide	2
1.1.1 Aspectos clínicos e laboratoriais	2
1.1.2 Aspectos epidemiológicos.....	4
1.1.3 Avanços no entendimento da fisiopatogenia.....	5
1.2 Interferon Tipo I	6
1.3 Genes Induzidos por Interferon	8
1.4 Assinatura de Interferon nas Doenças Autoimunes.....	9
1.5 INF na Lesão Endotelial, Aterosclerose e Antiangiogênese.....	10
1.6 Interferon na Síndrome Antifosfolípide	12
2 OBJETIVOS.....	15
2.1 Objetivo Primário	16
2.2 Objetivo Secundário	16
3 MÉTODOS	17
3.1 Aspectos Éticos	18
3.2 Seleção de Pacientes.....	19
3.3 Desenho do Estudo	21
3.4 Avaliação Clínica	21
3.5 Avaliação Laboratorial	22
3.5.1 Autoanticorpos	22
3.5.2 Perfil lipídico.....	22
3.5.3 Exames com alto perfil de variação	23
3.6 Análise Genética	23
3.6.1 Isolamento de PBMC e avaliação de qualidade de RNA	23
3.6.2 Escolha dos genes induzidos por IFN	24
3.6.3 Análise de PCR quantitativa em tempo real	26
3.6.4 Análise estatística e cálculo da assinatura de IFN	27
4 RESULTADOS.....	29
4.1 Características demográficas	30
4.2 Desfecho Primário.....	33
4.3 Desfecho Secundário	35
5 DISCUSSÃO	37
6 CONCLUSÕES	41
7 ANEXOS	43
8 REFERÊNCIAS.....	58
APÊNDICE.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aCL	- Anticardiolipina
ACP	- Análise de componente principal
aPL	- Anticorpos antifosfolípidos
AR	- Artrite reumatoide
AUC	- Área abaixo da curva ou Acurácia
a β 2GPI	- Anti-beta-2-glicoproteína I
Beta-2 GPI	- Beta-2-glicoproteína-I
CAC	- Célula angiogênica circulante
CAPPesq	- Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
cDNA	- Ácido desoxirribonucleico complementar
CEP	- Célula endotelial progenitora
CIPE	- Centro Internacional de Pesquisa
CMSP	- Células mononucleares do sangue periférico
DNA	- Ácido desoxirribonucleico
E	- Especificidade
ES	- Esclerodermia
FMUSP	- Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
GBD	- Granulócitos de baixa densidade
GIs	- Genes induzidos por interferon
GWAS	- <i>Genome Wide Associations Studies</i>
HBPM	- Heparina de baixo peso molecular
HC	- Hospital das Clínicas
HIV	- Vírus da imunodeficiência humana
HTLV	- Vírus linfotrópico da célula T humana
IFN	- Interferon
LA	- Anticoagulante lúpico
LDL	- Lipoproteína de densidade baixa
LES	- Lúpus eritematoso sistêmico

NOAC	- Novos anticoagulantes orais
RIN	- RNA <i>integrity number</i>
RNA	- Ácido ribonucleico
ROC	- <i>Receiver operating curve</i>
RT-PCR	- Reação em cadeia por polimerase em tempo real
S	- Sensibilidade
SAF	- Síndrome antifosfolípide
TCLE	- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TLDA	- <i>TaqMan® Low Density Assay</i>
TLR	- Receptores do tipo Toll - <i>Toll like receptors</i>
TTPA	- Tempo de trombina parcial ativada
VEGF	- Fator de crescimento endotelial vascular
VHS	- Velocidade de hemossedimentação
VLDL	- Lipoproteína de densidade muito baixa
VPN	- Valor preditivo negativo
VPP	- Valor preditivo positivo

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Genes selecionados para a análise customizada TLDA.....	25
Tabela 2 - Características demográficas, clínicas e laboratoriais dos grupos.....	32
Tabela 3 - Prevalência da assinatura de IFN nos pacientes e controles	34
Tabela 4 - Dados demográficos e a assinatura de IFN.....	35
Tabela 5 - Assinatura de IFN e as manifestações clínicas do critério de SAF.....	36
Tabela 6 - Assinatura de IFN e as manifestações não-critério de SAF.....	36

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 - Assinatura de Interferon em pacientes e controles saudáveis.....33
- Gráfico 2 - Curva ROC da assinatura de Interferon.....34

RESUMO

Lopes MRU. *Assinatura de interferon tipo I na síndrome antifosfolípide primária* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

Introdução: a síndrome antifosfolípide (SAF) primária é uma vasculopatia autoimune mediada por autoanticorpos com trombose como sua principal manifestação clínica. A presença de anticorpos antifosfolípides (aPL), embora relevante para confirmar o diagnóstico, não parece ser suficiente para explicar completamente a fisiopatologia da doença e um segundo gatilho é usualmente necessário. Além das hipóteses de infecções virais e insulto inflamatório como possíveis desencadeantes, parece que os receptores *toll like* (TLR) e o Interferon (IFN) tipo I são possíveis protagonistas nesse processo, contribuindo para o início da trombose. Recentemente, dois pequenos estudos demonstraram que uma porcentagem relevante de pacientes com SAF primária tem uma regulação positiva de genes IFN em células mononucleares do sangue periférico (CMSP). Entretanto, 20% e 28% dos pacientes nessas duas coortes tiveram anticorpos anti-dsDNA positivos, um autoanticorpo altamente específico do lúpus eritematoso sistêmico (LES). **Objetivo:** avaliar se os pacientes com SAF bem caracterizados apresentam assinatura para interferon nas células mononucleares periféricas. Secundariamente foram avaliadas possíveis associações clínico laboratoriais com a assinatura de IFN. **Métodos:** foram selecionados 53 pacientes do sexo feminino com diagnóstico de SAF primária de acordo com os critérios de Sidney, com idade igual ou maior a 18 anos, selecionados no Ambulatório de SAF da Disciplina de Reumatologia do HCFMUSP, pareados por sexo e idade com 50 controles saudáveis. Um terceiro grupo com 29 paciente com antecedente de trombofilias não imunomediadas também foi incluído. Após a coleta de sangue as CMSPs foram purificadas por metodologia de Ficoll. A expressão gênica das CMSPs foi realizada através do TaqMan® RNA Assay em placas TLDA. Foram pesquisados 41 genes induzidos por IFN (GILs). Uma análise de componente principal (ACP) foi realizada para determinar quais genes deveriam compor a assinatura de IFN. O teste de z-score foi utilizado para normalizar e calcular a assinatura de IFN para cada paciente. O *cutoff* da assinatura de IFN foi definido por uma curva ROC, e foi escolhido o ponto que maximizava a sensibilidade e especificidade. Características demográficas, clínicas e laboratoriais foram analisadas buscando por associações com a assinatura de IFN. **Resultados:** 11 genes estavam superexpressos nos pacientes com SAF em comparação aos controles. Após a análise de ACP foram escolhidos 6 genes que representavam mais de 95% do comportamento da amostra para compor a assinatura de IFN:

DNAJA1, IFI27, IFI6, IFIT5, MX1 e TYK2. O *cutoff* encontrado pela curva ROC foi de 3,9 folds (AUC = 0,706, S = 0,49, E = 0,86, VPP = 0,79, VPN = 0,61). A assinatura de IFN estava presente em 49% dos pacientes com SAF primário vs. 14% dos controles saudáveis e 17% dos controles positivos ($p < 0,001$). Foi encontrada associação entre a assinatura de IFN e uma ocorrência mais precoce do primeiro evento clínico ($p = 0,023$), e com ocorrência de eventos obstétricos (em especial pré-eclâmpsia, $p = 0,032$). Não foi encontrada nenhuma associação entre a assinatura de IFN e número de eventos trombóticos, exames laboratoriais, comorbidades, antecedentes familiares de doenças autoimunes, e escores de risco de retrombose. De todos os tratamentos em uso a única associação encontrada foi entre uma menor assinatura de IFN e o uso de estatinas ($p = 0,026$). Conclusão: esse estudo indica que pacientes com SAF primária bem caracterizados apresentam uma assinatura de IFN tipo I, não observada em outras trombofilias não imunidade-mediadas ou em controles saudáveis. Também demonstrou-se que essa superexpressão de genes regulados por IFN tipo I está associada a um início mais precoce dos eventos e pré-eclâmpsia. Mais estudos são necessários para determinar se este subgrupo de pacientes se beneficiará de intervenções terapêuticas direcionadas à via de sinalização IFN tipo I.

Descritores: interferon tipo I; síndrome antifosfolipídica; genes; trombofilia; anticorpos; doenças autoimunes

ABSTRACT

Lopes MRU. *Type I Interferon signature in primary antiphospholipid syndrome* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2018.

Introduction: primary antiphospholipid syndrome (PAPS) is an autoimmune vasculopathy mediated by autoantibodies with thrombosis as its main clinical manifestation. The presence of antiphospholipid antibodies, while relevant to confirm the diagnosis, does not seem to be sufficient to fully explain the pathophysiology and a second trigger is usually needed. Besides the hypotheses of viral infections and inflammatory insult as possible triggers, type I Interferon (IFN) has been pointed as a possible protagonist. Recently, two studies have demonstrated that a relevant percentage of PAPS patients have an up-regulation of IFN genes in peripheral blood mononuclear cells (PBMC). However, 20% and 28% of patients in these 2 cohorts, had anti-dsDNA positive antibodies, a highly specific Systemic Lupus Erythematosus (SLE) autoantibody. Objective: The aim of this study is to determine the prevalence of type I IFN signature in PBMC of patients with PAPS without specific SLE autoantibodies and search for it with clinical and laboratorial associations. Methods: 53 PAPS patients (according to Sydney’s criteria) were consecutively selected and age-matched with 50 healthy controls. A third group, with non-immune-mediated thrombophilia patients, was also included. The expression of 41 IFN induced genes was analysed using real time quantitative PCR (TaqMan Low Density Array). A principal component analysis (PCA) was used to determine which genes should compose the IFN signature and z-score was calculated. The IFN signature score cut-off was defined with a ROC curve, as the point that maximized both the specificity and sensitivity. Clinical and laboratorial features were analysed searching for associations with IFN signature. Results: 11 IFN genes were highly expressed in primary APS patients. After PCA, 6 genes remained in the IFN signature: DNAJA1, IFIT5, IFI27, MX1, IFI6, TYK2. The ROC cutoff was 3,9 folds (AUC = 0.706, S = 0.49, E = 0.86, VPP = 0.79, VPN = 0.61). The type I IFN signature was present in 49% of patients with primary APS compared to 14.0% of healthy controls and 17% of non-immune-mediated thrombophilia patients ($p < 0.0001$). The mean IFN score was significantly higher in PAPS patients (4.0 fold higher, $p < 0.0001$) than in controls. A higher IFN signature was associated with a younger age at the first APS event ($p = 0.023$) and with the presence of obstetric events, especially with preeclampsia ($p = 0.032$). There was no association between IFN signature and number of thrombotic events, laboratory exams, comorbidities, family history of autoimmune diseases, and thrombosis risk scores. Treatment with statins was associated with lower levels of IFN scores ($p = 0.026$). Conclusion: our

result indicates that PAPS patients, without lupus specific antibodies, have an enhanced type I IFN gene signature, not observed in non-immune mediated thrombophilia. We also provide novel data demonstrating that this overexpression of type I IFN-regulated genes is associated with an earlier onset of APS events and preeclampsia. Further studies are necessary to determine if this subgroup of patients will benefit of interventions targeting the type I IFN signalling pathway.

Descriptors: interferon type I; antiphospholipid syndrome; genes; thrombophilia; antibodies; autoimmune diseases

1 INTRODUÇÃO

1.1 Síndrome Antifosfolípide

1.1.1 Aspectos clínicos e laboratoriais

A síndrome antifosfolípide (SAF) é uma doença autoimune sistêmica caracterizada por trombooses e/ou morbidade gestacional recorrente, associadas à presença de anticorpos antifosfolípidos (aPL). Diferentemente das outras doenças autoimunes, a maioria das manifestações da SAF está diretamente relacionadas a eventos trombóticos, que podem afetar pequenos, médios ou grandes vasos^{1,2}.

Outras manifestações mais raras incluem trombocitopenia, anemia hemolítica, anomalias nas válvulas cardíacas, lesões cutâneas (como livedo reticular, vasculopatia livedoide) e anormalidades não trombóticas do sistema nervoso central (convulsões, coreia e declínio cognitivo)³. Embora inicialmente tenha sido descrita em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES), a síndrome antifosfolípide também pode ocorrer em pacientes sem doença autoimune subjacente (o que ocorre em aproximadamente 50% dos casos). A SAF é denominada como primária quando na ausência de outra doença autoimune².

Para o diagnóstico da SAF segundo os critérios classificatórios atuais, é obrigatória a associação de um evento trombótico (arterial ou venoso) ou obstétrico à presença de anticorpos antifosfolípidos. Os anticorpos

antifosfolípides que determinam o diagnóstico da síndrome são: o anticoagulante lúpico (LA), a anticardiolipina (aCL) subclasses IgG ou IgM e a anti-beta-2-glicoproteína I (a β 2GPI) subclasses IgG ou IgM. Esses anticorpos devem estar positivos em pelo menos duas ocasiões com intervalo mínimo de 12 semanas para caracterização da síndrome. Os critérios classificatórios de SAF (Critérios de Sydney, 2006)¹ encontram-se detalhados no Quadro 1.

Quadro 1 - Critérios de classificação da síndrome antifosfolípide

Critérios Clínicos	
Eventos trombóticos	Trombose arterial, venosa ou em pequenos vasos, em qualquer tecido, confirmada por meio de imagem ou histopatológica (trombose sem inflamação significativa).
Eventos Gestacionais	<ul style="list-style-type: none"> - 3 ou mais perdas com menos de 10 semanas de gestação. - 1 ou mais perdas com mais de 10 semanas de gestação. - Prematuridade < 34 sem por eclâmpsia, pré-eclâmpsia ou insuficiência placentária. <p>* <i>Excluir: alterações hormonais, anatômicas e cromossômicas.</i></p>
Critérios Laboratoriais	
<ul style="list-style-type: none"> - Anticardiolipina IgG ou IgM em altos títulos (Elisa > 40GPL/MPL ou > percentil 99). - Anti-β2 glicoproteína I IgG ou IgM em altos títulos (Elisa > percentil 99). - Anticoagulante lúpico (Métodos: TTPA, dRVVT, dentre outros). <p>Para classificar como SAF há necessidade de preencher 2 critérios (pelo menos 1 clínico e 1 laboratorial), presentes dentro de um intervalo \leq 5 anos. Os aPL devem estar positivos em pelo menos 2 ocasiões com intervalo \geq 12 semanas.</p>	

As indicações para pesquisa dos aPLs são: presença de trombooses em jovens, trombooses em sítios não habituais, acidentes vasculares encefálicos em pacientes com menos de 50 anos, trombose com doença autoimune associada (p.ex.: LES), abortamentos de repetição ou morbidade gestacional associada à prematuridade, plaquetopenia inexplicada, tempo de trombina parcial ativada (TTPA) prolongado sem causa definida, presença de livedo reticular importante². Dentre os diagnósticos diferenciais de SAF,

estão outras trombofilias hereditárias ou adquiridas como as deficiências das proteínas C e S, antitrombina III, protrombina mutante, presença do fator V de Leiden e hiperhomocisteinemia².

Apesar do caráter autoimune dessa trombofilia, o tratamento da SAF é baseado na anticoagulação e na antiagregação plaquetária. Apenas algumas manifestações imunológicas da SAF irão necessitar de imunossupressores².

1.1.2 Aspectos epidemiológicos

A SAF é caracterizada como primária quando ocorre de forma isolada e secundária se associada a outras doenças autoimunes como LES², artrite reumatoide (AR)⁴ e síndrome de Sjögren⁵. O lúpus é a doença mais frequentemente associada à SAF. Segundo o projeto Euro-Fosfolípide, 53% dos pacientes apresentam a forma primária enquanto 36% estão associados com o LES⁶.

A SAF primária é a causa mais comum de trombofilia adquirida e é responsável por 15% a 20% de todos os episódios de trombose venosa profunda, um terço dos casos novos de acidente vascular encefálico que ocorrem em pacientes com menos de 50 anos, e 10% a 15% de mulheres com perda fetal recorrente⁷. A prevalência real da SAF primária ainda é desconhecida mas estima-se que 0,3% a 1,0% da população seja acometida⁸.

A aparente predominância da SAF no sexo feminino pode ser decorrente do fato da morbidade gestacional ser uma característica importante na doença ou pelo fato da maioria das séries de SAF descritas

serem pacientes portadores de LES, que é sabidamente mais prevalente em mulheres. Em torno de 30% a 40% dos pacientes com LES apresentam anticorpos antifosfolípidos positivos, mas apenas 15% tem a síndrome completa⁸.

1.1.3 Avanços no entendimento da fisiopatogenia

Existe uma comprovada associação entre a presença dos aPL e eventos trombóticos, mas o exato mecanismo de ação implicado ainda é desconhecido. Sabe-se que os aPL ligam-se a proteínas do plasma ou de membranas expressas em diversas células (plaquetas, células endoteliais, monócitos, fibroblastos e células do trofoblasto) propiciando esse estado pró-trombótico². A beta-2-glicoproteína-I (beta-2 GPI) e a protrombina parecem ser as principais proteínas ligantes desses anticorpos envolvidas na patogênese da doença².

Apesar da SAF ser considerada uma doença mediada por autoanticorpos, novas hipóteses têm sugerido que os anticorpos antifosfolípidos não são suficientes para determinar fenômenos trombóticos⁹. Haveria a necessidade de um segundo gatilho além desses autoanticorpos⁹. Em modelos animais, os aPL foram capazes de desencadear trombose apenas após um insulto inflamatório¹⁰. Nesse sentido, uma infecção, por exemplo, poderia representar esse segundo gatilho⁹.

Recentemente, estudos têm apontado o *toll-like receptor 4* (TLR4) como importante mediador na patogenia do SAF, contribuindo com os efeitos trombóticos dos aPLs¹¹⁻¹⁵. O TLR4 é uma proteína transmembrana

expressa principalmente em células do sistema imune inato, que funciona como um correceptor da anexina2. A ligação da Anti- β 2GP1/ β 2GP1 no complexo anexina2/TLR4 ativaria cascatas de sinalização (via MyD88/IRAK4/TRAF6 ou via TRIF) promovendo a ativação do NF κ B e transcrição de genes pró-inflamatórios, dentre eles, genes relacionados a produção de IFN tipo I (principalmente IFN- β)^{11,12,15}. Esse mecanismo de transcrição de Genes Induzidos por Interferon (GIs) a partir da ativação de TLRs é muito semelhante ao do LES¹⁶, o que levanta a possibilidade IFN I fazer parte da fisiopatogenia do SAF.

1.2 Interferon Tipo I

O Interferon (IFN) é uma citocina produzida principalmente por leucócitos que interfere na replicação de fungos, vírus, bactérias e células tumorais por meio da estimulação da atividade de outras células de defesa. Ele induz um estado de resistência antiviral em células teciduais não infectadas. O vírus, ao replicar-se, vai ativar o gene codificante do interferon. Após sua síntese, o IFN sai da célula e entra na corrente sanguínea, até chegar às células vizinhas que ainda não foram atacadas. O IFN liga-se à membrana celular dessas células e ativa o gene codificante de outras proteínas antivirais. Estas proteínas antivirais, por sua vez, impedem a replicação viral¹⁷.

Os interferons podem ser classificados em três tipos (I, II ou III) de acordo com o tipo receptor que ligam e com sua função biológica que exercem^{17,18}:

- **IFN tipo I** pode pertencer a uma de cinco classes (α - com 13 isotipos, β , ω , ε e κ) e tem a função de induzir a produção de proteínas que impedem a replicação viral pela célula infectada^{17,18}.
- **IFN do tipo II** corresponde ao IFN- γ , cuja função é ativar macrófagos, estimular a expressão de complexo maior de histocompatibilidade e aumentar a atividade de células *natural killers*^{17,18}.
- **IFN do tipo III**, corresponde ao IFN- λ , cuja função é complementar a função do INF tipo I em estimular a produção de proteínas que interferem com a replicação viral nas células vizinhas à infectada^{17,18}.

Além da sua função no controle de infecções virais e bacterianas, o IFN I destaca-se por sua ação imunomoduladora, atuando de maneira pleiotrópica em diversas células do sistema imune¹⁸. O IFN é predominantemente produzido por células plasmocitóides dendríticas. Nas células dendríticas o IFN I é capaz de induzir a maturação, migração para os órgãos linfoides secundários, e aumentar a apresentação de antígenos por meio de maior expressão de moléculas MHC classe I e II. Nos fagócitos, ele aumenta a produção de citocinas e como consequência, torna mais eficaz a eliminação do patógeno. Nos linfócitos T, o IFN induz resposta Th1, inibe a apoptose, promove o desenvolvimento de células de memória e estimula células T citotóxicas. Nos Linfócitos B ele promove diferenciação de células B, produção de anticorpos e troca de classe de imunoglobulina¹⁸. Atuando dessa maneira, o IFN I funciona como ponte entre a imunidade inata e a adaptativa¹⁶.

Uma desregulação na atividade do interferon, mais especificamente sua hiperexpressão, está intimamente relacionada com o desenvolvimento de várias doenças do colágeno como lúpus e artrite reumatoide¹⁸.

1.3 Genes Induzidos por Interferon

O IFN é responsável pela sinalização intracelular e transcrição de vários genes induzidos por IFN (GIs) que culminam na produção de diversas proteínas com funções biológicas distintas¹⁹. Um exemplo importante é a proteína Mx1 que está envolvida na resposta contra um grande número de vírus de ácido ribonucleico (RNA)²⁰. Quando um vírus se liga a um receptor de reconhecimento de padrão, como os *toll-like receptors* (importantes na identificação de infecções) eles determinam a produção de IFN. Esses por sua vez ativam os GIs para potencializar a resposta a essa infecção através da produção de proteínas^{19,20}.

Uma maneira bastante acurada de pesquisar a atividade de IFN em humanos é pela pesquisa da expressão dos genes induzidos por essa citocina¹⁷. Os GIs já descritos na literatura estão detalhados em uma biblioteca de genes que foi criada a partir de um estudo seminal na área da genética que é o Estudo de Associação Genômica Ampla (do inglês, GWAS). O GWAS é um estudo observacional que descreve um conjunto de variações genéticas em diferentes indivíduos para avaliar se algumas variantes genéticas podem estar associadas a determinadas doenças²¹. O GWAS é particularmente relevante em doenças complexas, não monogênicas, como é o caso do LES²².

1.4 Assinatura de Interferon nas Doenças Autoimunes

O IFN foi uma das primeiras citocinas a ter sua associação com doenças autoimunes bem caracterizada. Em 1979 Hooks²³ demonstrou a presença de elevados níveis de IFN- α no soro de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES), correlacionando-os com a atividade e gravidade da doença²³. Na década de 1990 ficou evidente que o uso terapêutico do IFN- α pode induzir o surgimento de doença lúpus-*like*^{24,25}. Posteriormente foi mostrado ainda que o soro de pacientes lúpicos podia induzir monócitos a se diferenciarem em células com projeções tipo células dendríticas²⁶.

A análise por *microarray* da expressão gênica de células mononucleares de sangue periférico (CMSP) no LES, em 2003, evidenciou um aumento marcante de GILs, caracterizando o que hoje é conhecido como a assinatura de IFN e estabelecendo o papel fundamental do IFN na patogenia do LES²⁷. Existem indícios sugerindo que a participação do IFN no LES seja maior no início da doença¹⁶ e possivelmente associada à perda de tolerância, passo necessário no mecanismo autoimune²⁷. Acredita-se que a formação de imunocomplexos contendo ácidos nucleicos [ácido desoxirribonucleico (DNA) ou RNA] seja capaz de ativar as células dendríticas plasmocitoides a produzir IFN I. Os imunocomplexos, ao se ligarem aos *toll-like receptors* do tipo 3, 7 e 9, ativam uma cascata de sinalização (via MyD88, IRAK1, TRAF6, IRF5 e IRF7) que determina a produção de diversos genes, dentre eles os do IFN I. O IFN I produzido se liga aos receptores de IFN (IFNAR 1 e 2) ativando kinases (JAK1 e TYK2) que via sinalização STAT1 e 2 induzem ainda mais a expressão desses genes.¹⁶ Isso amplifica a produção de IFN no microambiente celular^{27,28}.

Há evidências de participação de IFN-I em outros distúrbios autoimunes, embora esteja menos claro o papel e a importância dessa citocina nessas doenças. Existem relatos, por exemplo, do uso terapêutico do IFN e o desencadeamento de artrite reumatoide^{29,30}, esclerose sistêmica (ES)^{31,32}, miastenia gravis³³ e psoríase³⁴. É possível que desregulação na via do IFN leve à perda de tolerância e desencadeamento da autoimunidade. Sabe-se, por exemplo, que polimorfismos no gene do fator de transcrição IRF5, envolvido na ativação do gene do IFN- α , aumentam a suscetibilidade a diversas doenças autoimunes^{18,35}. Variações gênicas de outros elementos envolvidos na via do IFN, como STAT4 e JAK, TYK2, também são vistas mais associadas ao LES e AR^{18,35}. Essas observações reforçam a importância do IFN na patogênese da autoimune.

1.5 INF na Lesão Endotelial, Aterosclerose e Antiangiogênese

Na última década, a patogênese da aterosclerose foi cada vez mais associada à inflamação e nesse aspecto, o IFN tem assumido papel de destaque³⁶. Em 2003, Levy³⁷ demonstrou que, camundongos sem receptor de lipoproteína de densidade baixa (LDL), isto é, não suscetíveis a aterosclerose, quando submetidos a tratamento prolongado com IFN- α apresentaram aumento da placa aterosclerótica³⁷. Esses achados foram confirmados por Goossens³⁸ em 2010 com IFN- β ³⁸. Além disso, foi demonstrado que camundongos *knocked out* para o receptor de IFN-I desenvolveram placas ateroscleróticas reduzidas, com menor conteúdo macrófágico e menor risco de desestabilização³⁸. Em humanos foi ainda observado que a secreção de IFN- α se correlacionou com a instabilidade da placa aterosclerótica³⁹.

No contexto do LES, no qual se observa elevada incidência de eventos cardiovasculares não explicada pelos fatores de risco tradicionais, a contribuição da inflamação, e particularmente do IFN, no desenvolvimento da aterosclerose é a mais significativa⁴⁰. Uma das explicações formuladas baseia-se na disfunção endotelial vista no LES⁴⁰⁻⁴². Nessa doença ocorre elevação de células endoteliais apoptóticas circulantes⁴⁰ e lesão celular endotelial que não é suficientemente reparada⁴¹, caracterizando o desbalanço entre lesão e reparação vascular⁴⁰.

A vasculogênese deficiente se deve a alterações nas células endoteliais progenitoras (CEPs) derivadas da medula óssea e nas células angiogênicas circulantes (CACs), caracterizando-se pela redução de CEPs circulantes e pela diminuição da capacidade das CEPs e CACs em se diferenciar em células endoteliais maduras, sintetizadoras de níveis adequados de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)⁴². Acredita-se que a atuação do IFN nesse aspecto da doença seja significativa, já que a interrupção da sinalização do IFN nas CEPs e CACs lúpicas reestabelece sua função normal e, por sua vez, CEPs e CACs de indivíduos normais apresentam a mesma disfunção observada em pacientes lúpicos quando expostos a IFN- α ⁴². Essas características parecem ser mediadas pelo IFN- α pela inibição das vias da interleucina 1 (IL-1), *up-regulation* do antagonista do receptor da IL-1 e *down-regulation* do VEGF^{40,41}. Há indícios sugerindo também existir ativação plaquetária aumentada mediada por IFN^{41,43}.

Outro aspecto recentemente caracterizado foi a existência de um subtipo de neutrófilos pró-inflamatórios chamados granulócitos de baixa densidade (GBD), identificados no sangue de pacientes lúpicos e com

efeitos citotóxicos no endotélio. Os GBD produzem IFN-I suficiente para evitar a diferenciação de CEPs em células endoteliais maduras⁴⁴.

Além desse aspecto importante na lesão endotelial e possível contribuição para um estado pró-trombótico, um estudo recente demonstrou que as pacientes lúpicas que desenvolvem pré-eclâmpsia possuíam maiores níveis de IFN- α que estavam intimamente relacionados com uma desregulação angiogênica quando comparadas às pacientes que tiveram uma gestação normal⁴⁵.

1.6 Interferon na Síndrome Antifosfolípide

Como mencionado anteriormente, a SAF é uma vasculopatia mediada por autoanticorpos. As trombozes e os eventos gestacionais são suas principais manifestações clínicas^{1,2}. A presença de anticorpos antifosfolípidos, embora relevante para confirmar o diagnóstico, parece não ser suficiente para explicar completamente a fisiopatologia da doença e um segundo gatilho é geralmente necessário⁹. Além da hipótese de infecção viral e insulto inflamatório como possíveis desencadeantes^{9,10}, parece que os TLRs e o IFN I poderiam ser possíveis coadjuvantes nesse processo^{10-15,46-48}.

Apesar do primeiro estudo no assunto ter encontrado achados aparentemente negativos com relação à associação da assinatura de IFN na SAF primária⁴⁹, dois pequenos estudos posteriores mostraram que uma porcentagem relevante de pacientes com SAF primária apresenta uma hiperexpressão de alguns genes relacionados a IFN em suas PBMCs^{50,51}. Uma análise retrospectiva dos dados públicos disponíveis daquele primeiro

estudo⁴⁹ realizada por van den Hoogen *et al.*⁵¹, mostrou que na verdade havia uma hiperexpressão de genes induzidos por IFN do tipo I naqueles pacientes com SAF⁵¹, porém em níveis abaixo do limiar utilizado no primeiro estudo⁴⁹.

Uma comparação dessa expressão gênica entre pacientes com LES e SAF mostrou que a assinatura de IFN é de fato mais robusta nos pacientes com LES do que nos pacientes com SAF primária. Isso gerou a hipótese de que essa assinatura no SAF poderia ser um marcador de pacientes que poderiam desenvolver mais características do lúpus ao longo do tempo. Em um desses trabalhos mais recentes⁵⁰, de fato 28% dos pacientes com SAF apresentavam anticorpos anti-dsDNA positivos, um autoanticorpo altamente específico para LES e que pode estar presente anos antes da doença se desenvolver⁵⁰.

Embora características sorológicas e clínicas de SAF e LES tenham sido descritas nesses estudos prévios^{50,51}, não foram encontradas correlações entre essas características e a assinatura do IFN⁵¹. Foram observadas apenas tendências de associação entre maiores níveis de IFN e títulos mais altos de ANA e anticorpos anti-dsDNA⁵¹. Curiosamente, os pacientes com SAF primária tratados com hidroxicloroquina e estatinas tiveram escores IFN menores do que os pacientes que não tomam esses medicamentos⁵¹.

Sabe-se que o interferon tipo I (IFN) é um elemento chave na patogênese do lúpus eritematoso sistêmico. Cerca de metade dos pacientes com lúpus têm expressão predominante de genes induzidos por interferon

em CMSP⁵². Essa assinatura IFN tipo I foi bastante estudada em estudos longitudinais de pacientes com LES e, embora os níveis sanguíneos de IFN pareçam estar associados à atividade da doença⁵³, a assinatura genética dessa citocina no sangue é geralmente estável e não é útil para prever atividade do LES^{54,55}. Entretanto, vale ressaltar que a assinatura do IFN tipo I mostrou ser um marcador de subgrupos de doença mais graves (com comprometimento renal, hematológico e neurológico)⁵² e também um marcador de manifestações sorológicas, como níveis mais altos de anti-DNAs e fator ativador da família de células B (BAFF) e níveis mais baixos de complemento sérico⁵⁶.

Portanto, neste estudo, pretendeu-se avaliar a assinatura do IFN tipo I em pacientes com SAF primária bem caracterizada a fim de confirmar achados prévios de que o IFN tipo I pode ser relevante na patogênese da doença primária da SAF mesmo em pacientes sem anticorpos específicos para LES.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Primário

Avaliar se os pacientes com SAF primária, sem anticorpos específicos para LES, apresentam uma assinatura para interferon tipo I nas células mononucleares de sangue periférico.

2.2 Objetivo Secundário

Avaliar possíveis associações entre as manifestações clínicas, os achados laboratoriais e o tratamento vigente com a assinatura de IFN.

3 MÉTODOS

3.1 Aspectos Éticos

Esse estudo foi submetido e aprovado pela Comissão Científica da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Diretoria Clínica do HCFMUSP (#12563) (Anexo A).

O procedimento proposto está de acordo com as recomendações e as diretrizes das principais sociedades específicas da área nacional e internacional. Todos os indivíduos participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexos B e C).

Esse projeto foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (Projeto regular - Nº Processo: 2014/17965-1 Período de vigência: 01/03/2016 a 30/04/2018) e teve o apoio institucional da FMUSP e AC Camargo Câncer Center. O apoio institucional recebido da FAPESP, da FMUSP e do AC Camargo Cancer Center foram valiosos e fundamentais para a realização deste projeto. O financiamento FAPESP possibilitou a obtenção de todos os insumos, reagentes, materiais e bens para garantir cada etapa do projeto: coleta de sangue, separação das CMSPs, congelamento a -80 °C, extração do RNA, avaliação da qualidade do RNA extraído, criação do DNA complementar, análise genética por reação em cadeia por polimerase em tempo real (RT-PCR) [*TaqMan*[®] *Low Density Assay* (TLDA)] e análise estatística dos dados obtidos.

Com relação à FMUSP, a infraestrutura existente na Clínica Médica/Disciplina de Reumatologia foi essencial para a realização do projeto. O LIM 17 da FMUSP disponibilizou de uma equipe com uma bióloga além da infraestrutura do laboratório.

Toda parte de extração de RNA foi realizada no Laboratório de Extração de Macromoléculas do AC Camargo Cancer Center, que conta com uma equipe formada por uma pesquisadora, biólogas e doutorandas que me auxiliaram no manejo dos equipamentos e reações. No Centro Internacional de Pesquisa (CIPE) do AC Camargo Cancer Center, além do apoio da pesquisadora e da técnica de laboratório responsáveis, existe toda a estrutura para realização do projeto máquinas de RT-PCR próprias para a metodologia TLDA e todos os materiais necessários para as análises genéticas do projeto em questão. Houve o apoio da equipe do AC Camargo Center também para a análise dos dados em *softwares* próprios disponíveis no centro.

3.2 Seleção de Pacientes

Um total de 53 pacientes com SAF primária seguidos na Divisão de Reumatologia do HCFMUSP foram consecutivamente selecionados. Todos os pacientes incluídos tinham idade entre 18 e 60 anos, atendiam aos critérios de Sydney¹ e tinham pelo menos um evento trombótico como uma característica da APS. A fim de reduzir o viés de tratamento na análise da expressão gênica, apenas pacientes com SAF trombóticos em anticoagulação com antagonistas da vitamina K foram incluídos. Os critérios

de exclusão foram a concomitância de qualquer outra doença autoimune ou outra trombofilia, o uso de tratamento imunossupressor ou infecções virais crônicas conhecidas [vírus da imunodeficiência humana (HIV), vírus linfotrófico da célula T humana (HTLV), Hepatite B, Hepatite C) e existência de neoplasias malignas. É importante ressaltar que pacientes com autoanticorpos específicos para LES (anti-dsDNA ou anti-Sm) também foram excluídos deste estudo. Um segundo grupo de 50 controles saudáveis pareados por idade também foi selecionado. Como os controles saudáveis não estavam em uso de anticoagulantes, um terceiro grupo (grupo controle positivo) com pacientes com trombofilia não imunomediada (como hiperhomocisteinemia, deficiência de proteína S e C) - todos anticoagulados com antagonistas da vitamina K - também foi incluído. Esses pacientes com trombofilias não imunomediadas foram provenientes do ambulatório de Hematologia do HCFMUSP e eram sabidamente aPL negativos.

Critérios de inclusão para o grupo SAF:

- Ter idade entre 18 e 60 anos.
- Preencher os critérios de Sydney [1] para SAF primária.
- Ter pelo menos um evento trombótico como característica da SAF.
- Estar em anticoagulação com antagonistas da vitamina K.

Critérios de exclusão para o grupo SAF:

- Apresentar qualquer outra doença autoimune ou trombofilia em concomitância.
- Tomar de imunossupressores.

- Apresentar infecções virais crônicas conhecidas (HIV, HTLV, Hepatite B, Hepatite C).
- Ter o diagnóstico de neoplasias malignas atuais ou passadas.
- Ter autoanticorpos específicos para LES (anti-DNAs ou anti-Sm) positivos em qualquer momento do acompanhamento.

3.3 Desenho do Estudo

Trata-se de um estudo observacional transversal. Todos os pacientes e controles foram submetidos a uma avaliação clínica (história e exame físico minucioso) e uma coleta de sangue no mesmo momento da avaliação.

Antes da avaliação clínica e coleta de sangue, todos os indivíduos participantes concordaram em participar e assinaram os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) específicos para cada grupo: paciente ou controle (Anexos B e C).

3.4 Avaliação Clínica

Todos os dados foram obtidos por meio de pesquisa em prontuário eletrônico, entrevistas e exame físico dos participantes, utilizando um formulário padronizado para coleta de dados, incluindo dados demográficos, clínicos, laboratoriais e de tratamento.

3.5 Avaliação Laboratorial

3.5.1 Autoanticorpos

O fator anti-núcleo (FAN), anticorpos específicos para o LES (Anti-dsDNA, anti-Sm, anti-P), anticorpos antifosfolípidos (anticardiolipina IgG / IgM, anti β 2GPI IgG / IgM e anticoagulante lúpico) e outros autoanticorpos frequentemente presentes em pacientes com LES (como anti-SSA, anti-SSB e anti-RNP) foram obtidos de um banco de dados eletrônico prospectivo responsável por armazenar todos os exames laboratoriais realizados durante o seguimento dos pacientes. Para as análises de associação foi considerado como positivo ter algum desses anticorpos positivo em qualquer momento do acompanhamento.

3.5.2 Perfil lipídico

Rotineiramente, com uma frequência de pelo menos uma vez ao ano, os pacientes que fazem acompanhamento no neste serviço realizam exames para avaliação do perfil lipídico uma vez que apresentam um maior risco cardiovascular advindo de suas doenças autoimunes. Portanto os exames de perfil lipídico [Colesterol total, LDL, lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL), HDL, Triglicérides] também foram obtidos do banco de dados eletrônico prospectivo responsável por armazenar todos os exames laboratoriais realizados durante o seguimento dos pacientes. Para as análises de associação foram considerados os exames mais recentes dos últimos 12 meses.

3.5.3 Exames com alto perfil de variação

Exames com maior potencial de variação em curtos períodos e que poderiam influenciar no resultado da expressão dos GIs foram coletados concomitantemente à amostra que foi utilizada para expressão genética. Esses exames foram:

- Hemograma completo.
- Frações do Complemento (C3 e C4).
- Creatinina (Cr).
- Proteína C reativa (PCR).
- Velocidade de Hemossedimentação (VHS).
- Urina 1 e Relação proteína/Creatinina.
- Coagulograma completo.
- Sorologias virais (HIV, Hepatitas B e C, HTLV).

3.6 Análise Genética

3.6.1 Isolamento de PBMC e avaliação de qualidade de RNA

As amostras de soro foram coletadas em tubos de heparina sódica para isolamento de PBMC. O PBMC foi isolado utilizando uma centrifugação rápida pelo o método do Ficoll-Hypaque e depois armazenado a -70 °C.

O RNA foi isolado de monócitos purificados usando o kit de isolamento de miRNA Kit: miRNeasy mini kit (Qiagen) e o equipamento automatizado (Qiagen). A qualidade do RNA foi avaliada pelo aparelho Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies®) usando o kit RNA 6000 Nano LabChip (Agilent Technologies®). O *software* calcula uma relação entre

as bandas ribossômicas 18S e 28S para amostras eucarióticas e gera o número do RNA *Integrity Number* (RIN) (variando de 0 a 10). Apenas amostras com RIN > 7 procederam para a análise de expressão gênica.

As amostras de RNA foram tratadas com uma unidade da enzima DNase I (Ambion®). Após o tratamento, 1 µg do RNA foi usada para fazer a transcrição reversa do ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA) em uma reação de 20 µL usando o SuperScript III RNase H - Reverse Transcriptase, 10 mM de dNTP Mix, Oligo(dT)₁₂₋₁₈ Primer, Ribonuclease H e Inibidor da RNase Recombinante RNaseOUT (todos da Invitrogen, Carlsbad, CA).

3.6.2 Escolha dos genes induzidos por IFN

Para a análise da assinatura de IFN, foram selecionados 41 genes induzidos por IFN (Tabela 1) previamente descritos como participantes em importantes vias envolvidas na patogênese do LES de acordo com o GWAS⁵⁶.

Tabela 1 - Genes selecionados para a análise customizada TLDA

Identificação	Genes	Nome dos Genes
Hs01911452_s1	IFIT1	<i>Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1</i>
Hs00895608_m1	MX1	<i>Myxovirus resistance 1, interferon-inducible protein p78</i>
Hs00169345_m1	EIF2AK2	<i>Eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 2</i>
Hs01070332_m1	IFIH1	<i>Interferon induced with helicase C domain 1</i>
Hs01547283_m1	IRF3	<i>Interferon regulatory factor 3</i>
Hs00158114_m1	IRF5	<i>Interferon regulatory factor 5</i>
Hs01014809_g1	IRF7	<i>Interferon regulatory factor 7</i>
Hs00175238_m1	IRF8	<i>Interferon regulatory factor 8</i>
Hs00960941_m1	SULT1E1	<i>Sulfotransferase family 1E</i>
Hs00152844_m1	ELF1	<i>E74-like factor 1</i>
Hs00177464_m1	TYK2	<i>Tyrosine kinase 2</i>
Hs01018347_m1	IRAK1	<i>Interleukin-1 receptor-associated kinase 1</i>
Hs00234713_m1	TNFAIP3	<i>Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3</i>
Hs00374581_m1	TNIP1	<i>TNFAIP3 interacting protein 1 ABIN-1</i>
Hs00372523_m1	LRRC20	<i>Leucine rich repeat containing 20</i>
Hs00267809_m1	PTPRM	<i>Protein tyrosine phosphatase, receptor type, M PTPRL 1</i>
Hs01013996_m1	STAT1	<i>Signal transducer and activator of transcription 1, 91kda</i>
Hs01063858_m1	IKBKE	<i>Inhibitor of kappa light polypeptide gene in B-cells, kinase epsilon</i>
Hs00174103_m1	IL8	<i>Interleukin 8</i>
Hs01058986_m1	RARRES3	<i>Retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 3</i>
Hs00737883_m1	IFNK	<i>Interferon kappa</i>
Hs01040689_m1	ANKS1A	<i>Ankyrin repeat and sterile alpha motif domain containing 1A</i>
Hs00748530_s1	UBE2L3	<i>Ubiquitin-conjugating enzyme E2L 3</i>
Hs00173500_m1	LPAR1	<i>Lysophosphatidic acid receptor 1</i>
Hs00324748_m1	PPM1H	<i>Protein phosphatase, Mg2+/Mn2+ dependent, 1H</i>
Hs00157342_m1	EFNA5	<i>Ephrin-A5</i>
Hs00204823_m1	VSIG2	<i>V-set and immunoglobulin domain containing 2</i>
Hs00176908_m1	PIK3C3	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase, catalytic subunit type 3</i>
Hs00545621_m1	KLB	<i>Klotho beta</i>
Hs00158502_m1	KPNA1	<i>Karyopherin alpha 1 (importin alpha 5)</i>
Hs00266011_m1	DNAJA1	<i>Dnaj (Hsp40) homolog, subfamily A, member 1</i>
Hs01546665_m1	RPS6KA1	<i>Ribosomal protein S6 kinase, 90kda, polypeptide 1</i>
Hs01075861_m1	CD44	<i>CD44 molecule</i>
Hs00383235_m1	PTN	<i>Pleiotrophin 1</i>
Hs01086373_g1	IFI27	<i>Interferon, alpha-inducible protein 27</i>
Hs00413458_m1	IFI35	<i>Interferon-induced protein 35</i>
Hs00951349_m1	IFI44	<i>Interferon-induced protein 44</i>
Hs00915292_m1	IFI44L	<i>Interferon-induced protein 44-like</i>
Hs00242571_m1	IFI6	<i>Interferon, alpha-inducible protein 6</i>
Hs00202721_m1	IFIT5	<i>Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 5</i>
Hs00705137_s1	IFITM1	<i>Interferon induced transmembrane protein 1</i>

3.6.3 Análise de PCR quantitativa em tempo real

A expressão desses genes foi analisada utilizando PCR quantitativo em tempo real (TaqMan[®] Low Density Assay - TLDA de Life Technologies). As placas TLDA foram customizadas com os 41 genes alvos e mais seis *housekeeping genes* (18S, ACTB, B2M, GAPDH, GUSB, HPRT1) para serem escolhidos na normalização. Para o cálculo da expressão relativa, todos os resultados foram normalizados para os *housekeeping genes* mais estáveis selecionados através da análise do algoritmo geNorm (Genome Biology, 2002). Os três genes normalizadores mais estáveis selecionados foram o HPRT1, ACTB e B2M. Normalização é o procedimento pelo qual as variações específicas da amostra técnica (por exemplo, diferenças na quantidade total de DNA complementar) é corrigida. O *software* qbase+ faz um cálculo de normalização baseado na média de vários genes normalizadores (ao invés de usar um gene normalizador único) reduzindo a chance de sub ou superestimar a expressão relativa dos genes da amostra.

Dos 41 genes alvo escolhidos para a placa customizada, foram excluídos os genes que não amplificaram ou amplificaram muito tardiamente durante na análise do PCR em tempo real e, portanto, 36 genes foram utilizados nas análises seguintes.

3.6.4 Análise estatística e cálculo da assinatura de IFN

Para o desenvolvimento da assinatura de IFN, primeiramente foi analisado o comportamento de todos os genes nos três grupos (grupos controle vs. controle positivo vs. pacientes) utilizando a técnica da ANOVA quando os genes apresentavam distribuição normal (avaliada por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov) ou Kruskal-Wallis quando essa condição não era satisfeita. A partir destes testes, pôde-se perceber que, de forma geral, os grupos controle positivo e controle saudável apresentavam características similares entre si e bastante diferentes do grupo pacientes.

Como o objetivo era obter uma assinatura que permitisse grande discriminação entre os grupos paciente e controle saudável, e esses dois grupos apresentavam expressão gênica muito semelhante, optou-se por realizar a seleção dos genes para a assinatura de IFN utilizando-se apenas os grupos paciente e controle saudável.

Foram realizados os testes de hipóteses novamente (teste t ou teste de Mann-Whitney quando a normalidade não era satisfeita) com o intuito de comparar a expressão dos genes apenas nesse nos dois grupos: controle positivo e pacientes. Dos 36 genes, foi possível identificar 11 genes com capacidade clara de discriminação entre os dois grupos: DNAJA1, EIF2AK2, IFI27, IFI35, IFI44, IFI6, IFIT5, IRF7, MX1, STAT1, TYK2.

Para a definição de quais genes entrariam para o cálculo da assinatura de IFN, foi utilizada a técnica estatística de Análise de Componentes Principais (ACP) com o objetivo de criar um *score* sem que houvesse uma característica dominante em função de possíveis correlações

entre os genes. A ACP selecionou para compor a assinatura seis variáveis (genes) que representavam 95% da variância total das 11 variáveis iniciais (genes) e que permitiam a melhor discriminação entre pacientes e controles. Os seis genes selecionados pela ACP foram: DNAJA1, IFI27, IFI6, IFIT5, MX1 e TYK2.

Após a definição dos genes que comporiam a assinatura, foram calculados os z-scores com relação ao grupo controle e somados os valores de forma a gerar um *score*, denominado assinatura de interferon.

A *receiver operating curve* (curva ROC) foi utilizada para definição de um ponto de corte para a presença da assinatura de IFN, otimizando a especificidade (E) e sensibilidade (S) do ponto de corte. Foram também calculados a acurácia (AUC), sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e os intervalos de confiança.

Por fim, tentou-se entender se havia alguma associação entre as características clínicas e a presença ou ausência de assinatura de IFN nos pacientes com SAF primária. As variáveis contínuas foram expressas como média \pm desvio-padrão (DP) e as variáveis categóricas foram apresentadas em percentuais. Para variáveis contínuas foram usados os testes de Mann-Whitney ou teste T de Student e para variáveis categóricas os testes de Fisher ou Chi-quadrado, conforme apropriado.

O *software* SPSS foi utilizado para os cálculos estatísticos e o GraphPad Prism para geração dos gráficos. Todos os testes foram realizados com nível de significância de 5%.

4 RESULTADOS

4.1 Características demográficas

Do total da população primária de pacientes com SAF (n = 53), 41 pacientes (77,4%) eram mulheres. A média de idade dos pacientes na avaliação foi de $46,9 \pm 10,9$ anos e a média de idade no momento do diagnóstico da SAF foi de $31,6 \pm 9,5$. Os pacientes com SAF tiveram um tempo médio de doença de $15,6 \pm 7,1$ anos. Os pacientes, controles saudáveis e controles positivos foram comparáveis em relação à média de idade (respectivamente $46,9 \pm 10,9$ vs. $42,1 \pm 15,5$ vs. $51,7 \pm 10,1$; p = 0,08) e sexo (77,4% vs. 72,3% vs. 68,9%, p = 0,83) (Tabela 2).

Em relação à frequência dos aPL, o LA foi positivo em 49 pacientes (92,4%), a β 2GPI em 28 (52,8%) e aCL em 41 (77,3%). A frequência de positividade simples, dupla e tripla dos aPL foi respectivamente de 48,1%, 28,3% e 47,1%. Embora o FAN tenha sido positivo em 24 pacientes (45,2%), nenhum dos pacientes do presente estudo apresentava para anti-Sm ou anti-DNA positivo (Tabela 2).

Todos os pacientes com SAF selecionados tiveram pelo menos 1 evento trombótico, 38 (71,1%) apresentaram trombose venosa, 25 (47,1%) trombose arterial e 10 (18,8%) tiveram ambos. Trombose venosa profunda e acidente vascular cerebral foram os eventos mais frequentes. Eventos obstétricos estavam presentes em 23 (43,4%) pacientes. Características não

critério foram encontradas em 31 (58,4%) pacientes, sendo trombocitopenia em 12 (22,6%), microangiopatia trombótica renal em 4 (7,5%), úlceras cutâneas em 5 (9,4%), doença valvar em 2 (3,7 %), disfunção cognitiva em 10 (18,8%) e livedo em 17 (32,0%) (Tabela 2).

Todos os pacientes com SAF foram tratados com varfarina 53 (100%) e apenas um paciente também estava recebendo heparina de baixo peso molecular (HBPM) devido a um ajuste de INR. Nenhum dos pacientes do presente estudo estava tomando novos anticoagulantes orais (NOACs). Quatro pacientes (7,5%) estavam tomando aspirina concomitantemente com varfarina e nenhum desses pacientes estava usando Clopidogrel. É importante mencionar que 28 (52,8%) pacientes estavam em uso de hidroxicloroquina, mas nenhum usava prednisona ou drogas imunossupressoras (Tabela 2).

Tabela 2 - Características demográficas, clínicas e laboratoriais dos grupos

	Pacientes (n = 53)	Controles saudáveis (n = 50)	Controles positivos (n = 29)
Sexo feminino (n,%)	41 (77,4%)	36 (72,3%)	20 (68,9%)
Idade (média e DP)	46,9±10,9	42,1±15,5	51,7±10,1
Idade ao diagnóstico (média e DP)	31,6±9,5	-	-
Tempo de doença (média e DP)	15,6±7,1	-	-
Anti-β₂GPI (IgM/IgG) (n,%)	28 (52,8)	0 (0)	0 (0)
Anticardiolipina (IgM/IgG) (n,%)	41 (77,3)	0 (0)	0 (0)
Anticoagulante lúpico (n,%)	49 (92,4)	0 (0)	0 (0)
Triplo positivo (n,%)	25 (47,1)	0 (0)	0 (0)
FAN (n,%)	24 (45,2)	-	-
Anti-DNA (n,%)	0 (0)	-	-
Anti-Sm (n,%)	0 (0)	-	-
Anti-RNP (n,%)	1 (1,8)	-	-
Anti-SSA (n,%)	1 (1,8)	-	-
Anti-SSB (n,%)	0 (0)	-	-
Venous thrombosis (n,%)	38 (71,1)	-	-
Arterial thrombosis (n,%)	25 (47,1)	-	-
Tromboses arteriais e venosas (n,%)	10 (18,8)	-	-
Eventos gestacionais (n,%)	23 (43,4)	-	-
Trombocitopenia (n,%)	12 (22,6)	-	-
Microangiopatia renal (n,%)	4 (7,5)	-	-
Doença valvar (n,%)	2 (3,7)	-	-
Úlceras cutâneas (n,%)	5 (9,4)	-	-
Disfunção cognitiva (n,%)	10 (18,8)	-	-
Livedo (n,%)	17 (32,0)	-	-
Varfarina (n,%)	53 (100)	0 (0)	29 (100)
Aspirina (n,%)	4 (7,5)	0 (0)	1 (3,4)
Clopidogrel (n,%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Estatinas (n,%)	15 (28,3)	0 (0)	8 (27,5)
HBPM (n,%)	1 (1,8)	0 (0)	1 (3,4)
NOACs (n,%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Hydroxychloroquine (n,%)	28 (52,8)	0 (0)	0 (0)
Imunossupressores (n,%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

FAN: Fator antinúcleo, RNP: ribonucleoproteínas, SSA: Síndrome de Sjogren A, SSB: Síndrome de Sjogren B, HBPM: heparina de baixo peso molecular, NOACs: novos anticoagulantes orais.

4.2 Desfecho Primário

Com relação ao desfecho primário, foi possível concluir que 11 genes induzidos por IFN estavam superexpressos nos pacientes com SAF primário em comparação aos controles. Após a análise de ACP foram escolhidos 6 genes que representavam mais de 95% do comportamento da amostra para compor a assinatura de IFN: DNAJA1, IFI27, IFI6, IFIT5, MX1 e TYK2. O Cutoff encontrado pela curva ROC foi de 3,9 *olds* (AUC = 0,706, S = 0,49, E = 0,86, VPP = 0,79, VPN = 0,61) (Gráficos 1 e 2). A assinatura de IFN estava presente em 49% dos pacientes com SAF primário vs. 14% dos controles saudáveis e 17% dos controles positivos ($p = 0,001$) Tabela 3.

Gráfico 1 - Assinatura de Interferon em pacientes e controles saudáveis

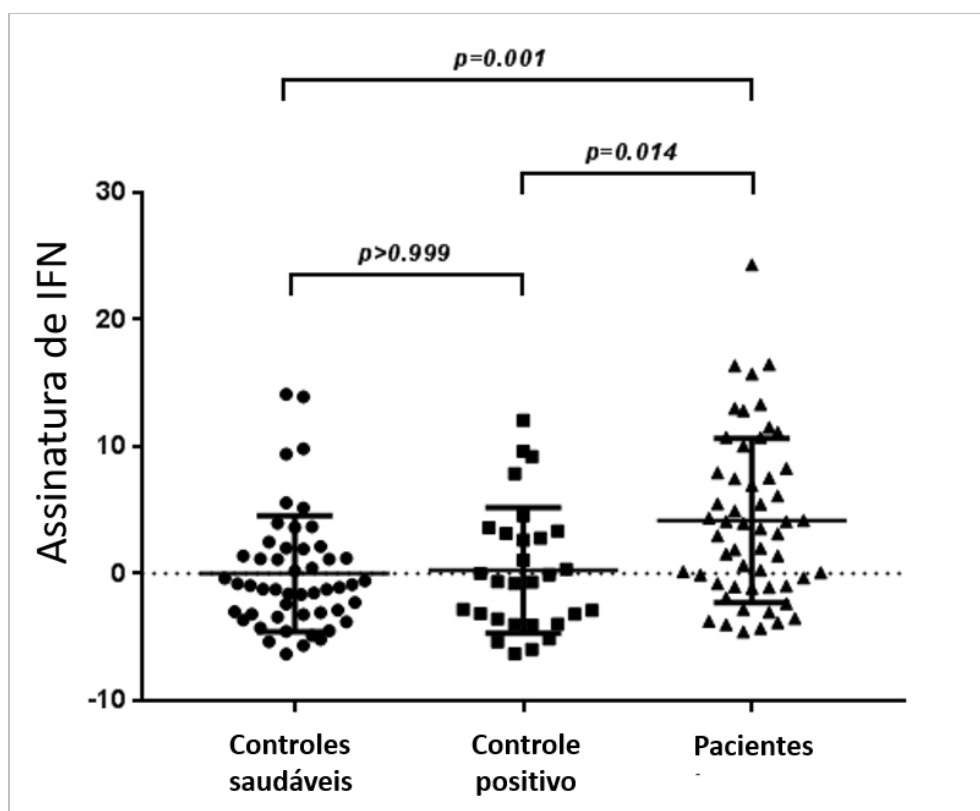


Gráfico 2 - Curva ROC da assinatura de Interferon

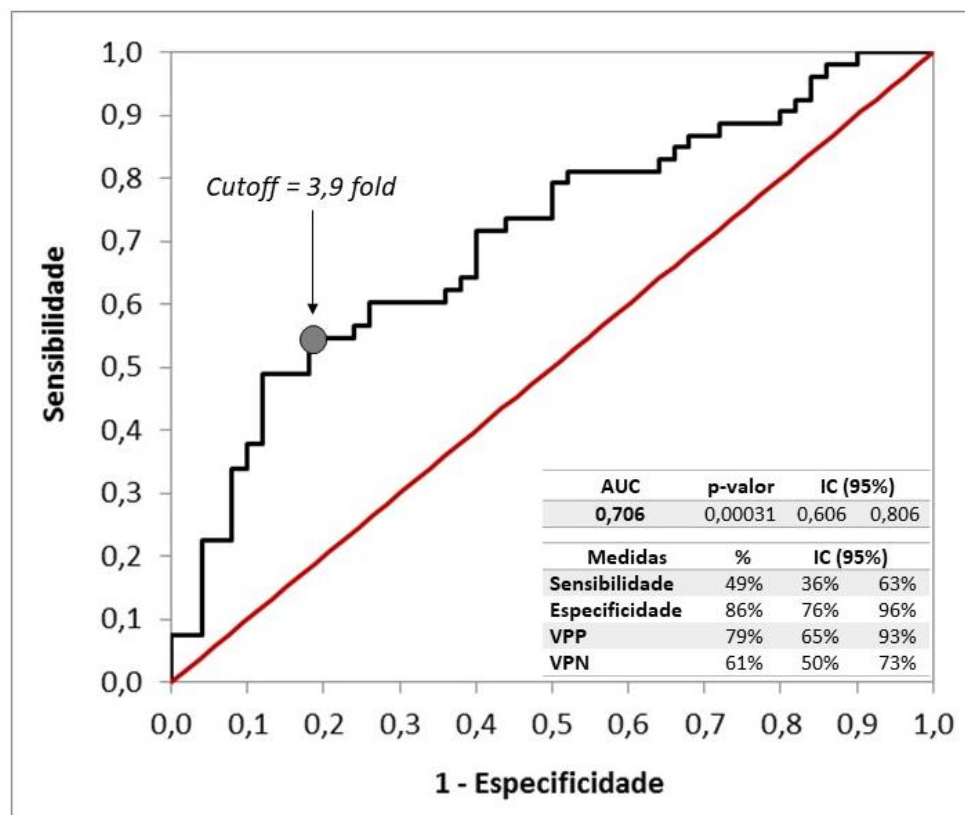


Tabela 3 - Prevalência da assinatura de IFN nos pacientes e controles

Grupo	Assinatura de IFN				Total
	Ausente		Presente		
	N	%	N	%	
Controle saudável	43	86%	7	14%	50
Controle positivo	24	83%	5	17%	29
Pacientes	27	51%	26	49%	53
Total	94	71%	38	29%	132

4.3 Desfecho Secundário

Encontrou-se associação entre a assinatura de IFN e uma ocorrência mais precoce do primeiro evento clínico ($p = 0,023$) (Tabela 4) com ocorrência de eventos obstétricos (em especial doença hipertensiva específica da gestação, $p = 0,039$) (Tabela 5). Não foi encontrada associação entre a assinatura de IFN e número de eventos trombóticos, exames laboratoriais, comorbidades, antecedentes familiares de doenças autoimunes, e escores de risco de retrombose. (Tabela 5 e 6). De todos os tratamentos em uso a única associação encontrada foi entre uma menos assinatura de IFN e o uso de estatinas.

Tabela 4 - Dados demográficos e a assinatura de IFN

Características	Assinatura de IFN				p-valor
	Ausente		Presente		
	Média	DP	Média	DP	
Idade	49,5	11,2	44,2	10,2	0,079
Idade no 1º evento	34,2	10,8	28,3	7,0	0,023
Tempo de doença	15,3	6,7	15,9	7,7	0,767
Sexo Feminino	19	70%	22	85%	0,215

Tabela 5 - Assinatura de IFN e as manifestações clínicas do critério de SAF

Características	Assinatura de IFN				p-valor
	Ausente		Presente		
	n	%	n	%	
LA	27	100%	22	85%	0,051
aB2GPI	16	59%	12	46%	0,339
ACL	20	74%	21	81%	0,560
Duplo positivo	6	22%	9	35%	0,317
Triplo positivo	15	56%	10	38%	0,213
Venoso	19	70%	19	73%	0,827
Arterial	13	48%	9	35%	0,406
Obstétrico	8	30%	15	58%	0,039
Abortamento >10sem	4	15%	8	31%	0,882
Abortamento <10sem	5	63%	7	47%	0,666
Prematuridade	1	13%	5	33%	0,862
Pré-eclâmpsia	1	13%	8	53%	0,032

Tabela 6 - Assinatura de IFN e as manifestações não-critério de SAF

Características	Assinatura de IFN				p-valor
	Ausente		Presente		
	n	%	n	%	
Renal	4	15%	2	8%	0,559
Valvopatia	3	11%	1	4%	0,610
Úlceras	0	0%	3	12%	0,111
Cognitivo	6	22%	6	23%	0,941
Livedo	7	26%	11	42%	0,208
Qualquer manifestação não-critério	15	56%	18	69%	0,305

5 DISCUSSÃO

Este estudo indica que pacientes com SAF primária bem caracterizados e sem autoanticorpos para LES apresentam uma assinatura de IFN tipo I, não observada em outras trombofilias não imunidade-mediadas ou em controles saudáveis.

Os primeiros estudos publicados na literatura a mostrarem uma superexpressão de genes induzidos por IFN na SAF primária foram realizados em coortes onde 20% a 28% dos pacientes apresentavam anticorpos anti-dsDNA positivos^{50,51}. Embora esses pacientes não apresentassem nenhuma característica clínica de lúpus, sabe-se que os anticorpos anti-dsDNA podem estar presentes no sangue muitos anos antes do diagnóstico de LES⁵⁷. Para minimizar esse possível viés, a presença de anticorpos específicos para LES foi definida como um critério de exclusão no presente estudo.

Mesmo com a exclusão dos pacientes com anticorpos específicos para LES, a prevalência da assinatura da IFN nos pacientes deste estudo foi de 49% (26/53), muito semelhante à prevalência relatada anteriormente de 46% (11/24) em outra coorte⁵¹. Até onde se sabe, esta é a maior coorte que pesquisou a assinatura de IFN em pacientes com SAF primária, com 53 pacientes em comparação com 42 e 24 em estudos anteriores^{50,51}.

Neste estudo, também foi incluído um terceiro grupo de pacientes com trombofilia não imunomediada (o grupo controle positivo), todos anticoagulados com antagonistas da vitamina K (o mesmo tratamento que os pacientes com SAF). Este terceiro grupo foi importante para verificar se o tratamento com varfarina poderia de alguma forma influenciar na assinatura de IFN tipo I. Conforme esperado, a expressão do IFN tipo I no grupo controle positivo foi comparável ao grupo controle saudável ($p = 0,94$), não mostrando nenhuma influência da varfarina ou da presença de tromboes prévias na assinatura do IFN.

Também demonstrou-se pela primeira vez na literatura que essa superexpressão de genes regulados por IFN tipo I está associada a um início mais precoce dos eventos na SAF. Isso sugere que o IFN possa ter um papel coadjuvante para o desenvolvimento da SAF. De maneira geral sabe-se que processos inflamatórios desempenhavam esse papel de segundo gatilho na SAF, mas o IFN apenas recentemente vem sendo investigado^{9,50,51}. Essa hipótese explicaria, ao menos em parte, o motivo de uma associação tão frequente entre LES (uma doença onde sabidamente a assinatura de IFN é bastante relevante) e a SAF^{6,16,27}.

Outro aspecto interessante encontrado foi a associação entre a assinatura de IFN tipo I e a ocorrência de eventos obstétricos, em especial a pré-eclâmpsia na SAF primária. De maneira análoga, em 2015 a mesma associação já havia sido destrita em pacientes com LES⁴⁵. Nesse trabalho, maiores níveis de IFN- α estavam intimamente relacionados com uma desregulação angiogênica placentária e maior ocorrência de pré-eclâmpsia⁴⁵.

Na presente coorte, a assinatura de IFN não esteve associada à presença de FAN, anticoagulante lúpico, anticorpos anticardiolipina, anti- β 2 glicoproteína I, tripla positividade, e nem ao tipo de trombose (arterial, venosa ou ambas). Da mesma maneira os estudos anteriores em SAF também não encontraram associações entre os autoanticorpos e a assinatura de IFN^{50,51}.

Diferentemente da publicação anterior que mostrou um menor escore de IFN em pacientes tratados com hidroxicloroquina e estatinas⁵¹, foi encontrada apenas associação de menores níveis de assinatura do IFN com o uso de estatinas, não sendo encontrada associação com a hidroxicloroquina. É importante ressaltar que no presente estudo uma porcentagem maior dos pacientes estava em uso de Hidroxicloroquina (HCQ) (52,8% vs. 40,0%) o que pode influenciar nas diferenças encontradas⁵¹.

O presente estudo apresenta algumas limitações. O número reduzido de pacientes incluídos (em decorrência da raridade da doença e de rigorosos critérios de inclusão) e o desenho transversal do estudo não permitiu avaliar o comportamento da assinatura de IFN ao longo do curso dos eventos clínicos. Ressalta-se que os estudos longitudinais sobre assinatura de IFN no LES não conseguiram demonstrar associação entre assinatura de IFN e atividade de doença, sendo a assinatura considerada principalmente marcador de severidade e do tipo do acometimento orgânico do LES^{54,56}.

6 CONCLUSÕES

Esse estudo indica que pacientes com SAF primária bem caracterizadas e sem autoanticorpos específicos para LES apresentam uma assinatura de IFN tipo I, não observada em outras trombofilias não imunidade-mediadas ou em controles saudáveis. Também demonstrou-se que essa superexpressão de genes regulados por IFN tipo I está associada a um início mais precoce dos eventos e pré-eclâmpsia. Mais estudos são necessários para determinar se este subgrupo de pacientes se beneficiará de intervenções terapêuticas direcionadas à via de sinalização IFN tipo I.

7 ANEXOS

Anexo A - Aprovação pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq)

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
DIRETORIA CLÍNICA
COMISSÃO DE ÉTICA PARA ANÁLISE DE PROJETOS DE PESQUISA -
CAPPesq

CADASTRO DE PROTOCOLO DE PESQUISA

Registro (uso reservado à Secretaria da CAPPesq)	
Nº do Protocolo:	Tipo: Humanos
Instituto: ICHC	
Registro on-line nº: 12563	Data de Entrada: 05/07/2014

Este projeto envolve:

Pacientes HC	Sim
Médicos ou Funcionários HC (como sujeitos de pesquisa)	Sim
Documentos HC(Prontuários e Outros)	Sim
Materiais estocados no HC	Não
Peças anatômicas de cadáveres	Não
Haverá necessidade de recrutamento de pacientes na mídia	Não

1. Título do Protocolo de Pesquisa

Assinatura de Interferon tipo I na Síndrome Antifosfolípide Primária

2. Palavras-chaves que caracterizam o assunto da Pesquisa

Síndrome Antifosfolípídica, Interferon, Patogenia

3. Resumo do Protocolo de Pesquisa:

Introdução: Interferon (IFN) tipo I é um importante elemento indutor da patogenia do lúpus eritematoso sistêmico (LES). Aproximadamente 50% dos adultos com Lupus apresentam a expressão aumentada de genes induzidos por interferon nas células mononucleares do sangue periférico (PBMC), a conhecida assinatura de interferon. O interferon possui papel central na auto-imunidade funcionando como uma ponte entre a resposta imune inata e a adaptativa. É também uma citocina com importante função anti-angiogênica, reduzindo a diferenciação de células progenitoras endoteliais e a expressão de proteínas como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Por esses motivos, estudos recentes têm apontado o INF como fator associado à progressão da placa aterosclerótica. A Síndrome Antifosfolípide é uma vasculopatia auto-imune mediada por anticorpos cuja principal manifestação clínica é a trombose. A presença de anticorpos antifosfolípidos apesar de extremamente importante, parece não ser suficiente para explicar por completo a fisiopatogenia da doença. Estudos recentes têm apontado toll like receptors e o INF como possíveis coadjuvantes, funcionando como um segundo gatilho para o desencadeamento da trombose. Hipotetiza-se que, o interferon apresente um importante papel na patogenia dessa doença assim como descrito no Lupus.

Objetivos: Investigar se os pacientes com SAF apresentam assinatura para

interferon nas células mononucleares periféricas. Casuística e Métodos: Serão estudados 50 pacientes do sexo feminino com diagnóstico de SAF primária de acordo com os critérios de Sidney, com idade igual ou maior a 18 anos, selecionados no Ambulatório de SAF da Disciplina de Reumatologia do HCFMUSP, pareados por sexo e idade com 50 controles positivos (pacientes com antecedentes de trombose decorrentes de trombofilias não imuno-mediadas) e 50 controles negativos (controles saudáveis). Células mononucleares do sangue periférico (CMSP) serão purificadas por metodologia de Ficoll. A expressão gênica das CMSPs será realizada através do TaqMan® RNA Assay em placas TLDA. Serão pesquisados 41 genes induzidos por INF (GILs).

4. Pesquisador Responsável:

Danieli Castro Oliveira de Andrade

<http://lattes.cnpq.br/6418366977320716>

Graduação: Pós-Doutora

Vínculo: HC

5. Pesquisador Executante:

Michelle Remião Ugolini Lopes

<http://lattes.cnpq.br/2526034400956121>

6. Possui co-autores?

Sim

Nome dos co-autores: Virginia Lúcia Nazário Bonoldi e Dirce Maria Carraro

7. Onde a Pesquisa será realizada?

Departamento: Clínica Médica

Disciplina: Reumatologia

LIM: LIM/17 - Lab Investigação em Reumatologia

8. Existe entidade externa envolvida?

Sim

AC Camargo Center

Nacional

9. Possui participação Estrangeira

Não

10. O projeto é multicêntrico

Não

11. Outros serviços/ divisões do HCFMUSP envolvidos na pesquisa

Não

12. Finalidade acadêmica da pesquisa e classificação

Doutorado

Outros:

Orientador: Daniele Castro Oliveira de Andrade

13. Investigação

Retrospectiva e Prospectiva (Ambos)

14. Materiais e métodos

Laboratório|

Prontuários de pacientes

Ácidos Nucleares Recombinantes

15. Gênero, classificação da Pesquisa

Clínica

16. Áreas temáticas previstas na Res. 196/96

Genética Humana

17. Patrocínio

Recursos próprios

18. Valor do financiamento

136.810,98

19. Cronograma de execução da pesquisa

Prazo: 24 meses

20. Assinaturas

Assinatura e carimbo do Pesquisador

27 / 07 / 14

Dra. Daniel Castro
CRM 5.104.403
Clínica Médica / Reumatologia


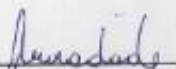
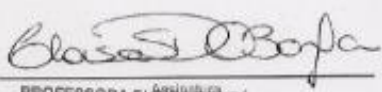

Aprovado em

Assinatura e carimbo da Chefia
com data de aprovação
pelo Conselho do Departamento

Aprovado "ad-referendum" o encaminhamento à Comissão
de Ética do Projeto de Pesquisa (DAPP) em 28/05/14



Prof. Dr. Wilson Jacob Filho
Vice Chefe do Departamento de Clínica Médica

 MINISTÉRIO DA SAÚDE - Conselho Nacional de Saúde - Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP FOLHA DE ROSTO PARA PESQUISA ENVOLVENDO SÉRIES HUMANAS			
1. Projeto de Pesquisa: Assinatura de Interferon tipo I na Síndrome Anticardiolipino Primária		2. Número de Participantes da Pesquisa: 150	
3. Área Temática: Genética Humana: (Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.)			
4. Área do Conhecimento: Grande Área 4. Ciências da Saúde			
PESQUISADOR RESPONSÁVEL			
5. Nome: Daniel Castro Oliveira de Andrade			
6. CPF: 071.240.447-31		7. Endereço (Rua, n.º): R. Sousa Ramos 320 Chacara Klabin apt 74 SAO PAULO SAO PAULO 04120080	
8. Nacionalidade: BRASILEIRO		9. Telefone: (11) 2528-2532	10. Outro Telefone: 11. E-mail: daniel.castro@yahoo.com.br
12. Cargo:			
Termo de Compromisso: Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Resolução CNS 466/12 e suas complementares. Comprometo-me a utilizar os materiais e dados coletados exclusivamente para os fins previstos no protocolo e a publicar os resultados sejam eles favoráveis ou não. Aceito as responsabilidades pela condução científica do projeto acima. Tenho ciência que essa folha será anexada ao projeto devidamente assinada por todos os responsáveis e fará parte integrante da documentação do mesmo.			
Data: <u>22</u> / <u>07</u> / <u>14</u>		 Assinatura	
INSTITUIÇÃO PROPONENTE			
13. Nome: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP		14. CNPJ: 60.448.040/0001-22	15. Unidade/Orgão:
16. Telefone: (11) 3069-6442		17. Outro Telefone:	
Termo de Compromisso (do responsável pela instituição): Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Resolução CNS 466/12 e suas complementares e como esta instituição tem condições para o desenvolvimento deste projeto, autorizo sua execução.			
Responsável: ELOÍSA SILVA DUTRA DE OLIVEIRA BONFÁ		CPF: 042.658.928-92	
Cargo/Função: Diretora Clínica do HCFMUSP			
Data: <u>04</u> / <u>08</u> / <u>14</u>		 PROFESSORA ELOÍSA BONFÁ Diretora Clínica do HCFMUSP	
PATROCINADOR PRINCIPAL			
Não se aplica.			
 Prof. Dr. Wilson Jacob Filho Vice Chefe do Departamento de Clínica Médica			

Anexo B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - Controles

1

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
Controles

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO: M F

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

.....

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

.....

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: "Assinatura de Interferon tipo I na Síndrome Antifosfolípide Primária"

PESQUISADOR: Daniell Castro Oliveira de Andrade
INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 106408
CARGO: Assistente da Disciplina de Reumatologia e Chefe do Ambulatório de Síndrome Antifosfolípide
UNIDADE DO HCFMUSP: ICHC - Reumatologia

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO RISCO MÉDIO

RISCO BAIXO RISCO MAIOR

3. DURAÇÃO DA PESQUISA: 24 meses

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável _____
Rubrica do pesquisador _____

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

Você foi admitido(a) neste hospital para o tratamento de doença. Como parte de seu tratamento, você fará exames de sangue para avaliar como está a sua doença. Você está sendo convidado(a) a fornecer a nossa equipe (doar) 20ml de sangue (6 tubos de coleta) para utilizarmos em nossa pesquisa. Antes de decidir, leia este documento que se chama Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE. Faça quantas perguntas achar necessário. Se for preciso, leve para casa e discuta com seus amigos e familiares. Tenha certeza que entendeu todo o texto.

Sobre o estudo

O objetivo do nosso estudo é pesquisar se alguns genes (genes do Interferon) conhecidos relacionados à ativação de doenças autoimunes podem também estar relacionados à ativação de uma doença rara chamada Síndrome do Anticorpo Antifosfolípido (SAF). O Interferon é uma partícula envolvida na inflamação, e pode ativar o nosso sistema imunológico causando doenças. Já estão sendo criados remédios que agem na via do Interferon e que poderão ajudar esses pacientes. A causa da Síndrome do Anticorpo Antifosfolípido (SAF) ainda é desconhecida, e não se sabe exatamente quais genes estão envolvidos. A nossa intenção é ver se esses genes do Interferon estão ativados nos pacientes com SAF. Caso o resultado seja positivo, novos tratamentos poderão ser estudados para os pacientes com essa síndrome.

Porque fornecer (doar) o material?

É importante conhecer melhor essa doença para podermos no futuro desenvolver novos tratamentos para os pacientes com SAF. Você está sendo convidado para participar do nosso grupo controle (grupo onde os pacientes não são portadores de SAF) para podermos comparar e entender melhor os resultados da pesquisa. Pesquisadores (médicos e pesquisadores de várias áreas) vão fazer vários testes com as amostras doadas. Não há nenhum benefício imediato para o participante, mas caso o resultado da pesquisa seja positivo, compreenderemos melhor a sua doença e novos tratamentos poderão ser estudados para essa doença.

Quando será o exame?

O sangue será coletado no dia da sua consulta regular no ambulatório de reumatologia, caso você queira participar do estudo. Realizaremos uma coleta única de sangue. Não haverá necessidade de múltiplas coletas para esse estudo.

Riscos de sua participação

Durante a coleta de sangue poderá ocorrer um mínimo extravasamento de sangue, com pouca dor no local após a coleta.

Proteção dos seus direitos e de sua confidencialidade

Todo o material usado para pesquisa será identificado no laboratório por um código formado por números e letras. Assim seu nome não vai ser divulgado e sua privacidade e identidade serão preservadas. Os resultados da pesquisa, quando publicados, irão manter o seu anonimato e poderão ser utilizados em pesquisas futuras. As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente individualmente.

Pagamentos, despesas e benefícios:

Se você concordar que os pesquisadores usem o material fornecido do modo explicado aqui, você não receberá pagamentos por isso. Se a pesquisa gerar resultados com este material, você também não terá direito a pagamentos por isso. Não há benefícios diretos aos participantes. Os resultados das pesquisas com seu material podem, futuramente, ajudar e beneficiar outras pessoas com a mesma

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável _____
Rubrica do pesquisador _____

doença que você, melhorando entendimento e o tratamento sua da doença. Não há despesas pessoais para o voluntário e nem ajuda de custo.

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

Autonomia

Sua decisão de fornecer o material é totalmente voluntária. Se você não concordar em permitir o uso do seu material para pesquisa, sua decisão não afetará, de nenhum modo, o seu tratamento. Você pode também decidir não participar da pesquisa a qualquer momento. Esta decisão será respeitada sem qualquer problema a você ou seu atendimento na Instituição.

Por favor, leia com atenção e assinale as opções que você concorda. Estas serão as condições que iremos tratar o material que você fornecerá.

Você concorda em fornecer a amostra de sangue para a pesquisa?

() Sim () Não

Se sim, você autoriza a utilização do material em todas as pesquisas pertinentes?

() Sim () Não

Garantia de acesso

Sempre que você quiser conversar sobre algum resultado de pesquisa de seu material, ou quiser obter informações de qualquer tipo, ou tirar qualquer dúvida, você deve procurar a um dos responsáveis pela pesquisa na área de Reumatologia. A pesquisadora responsável é a Dra Danielli Castro Oliveira Andrade responsável pela pesquisa na área de Reumatologia: Av. Dr. Arnaldo, 255 - 3º andar – Cerqueira César – São Paulo – SP – CEP: 01245-000 Telefone(s) (11) 30617176. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 2661-6442 ramais 16, 17, 18 – e-mail: cep@hcfmusp.usp.br.

E se desistir de participar do estudo?

É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "Assinatura de Interferon tipo I na Síndrome Antifosfolípide Primária".

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável _____
Rubrica do pesquisador _____

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

Eu discuti com a Dra. Daniel Castro Oliveira de Andrade sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal

Data/...../.....

Assinatura da testemunha

Data/...../.....

(para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo

Assinatura do responsável pelo estudo

Data/...../.....

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável _____
Rubrica do pesquisador _____

Anexo C - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido- Pacientes

1

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : M F

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE

CEP: TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: "Assinatura de Interferon tipo I na Síndrome Antifosfolípide Primária"

PESQUISADOR: Daniell Castro Oliveira de Andrade
INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 106408
CARGO: Assistente da Disciplina de Reumatologia e Chefe do Ambulatório de Síndrome Antifosfolípide
UNIDADE DO HCFMUSP: ICHC - Reumatologia

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO RISCO MÉDIO

RISCO BAIXO RISCO MAIOR

3. DURAÇÃO DA PESQUISA: 24 meses

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável _____
Rubrica do pesquisador _____

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

Você foi admitido(a) neste hospital para o tratamento de doença. Como parte de seu tratamento, você fará exames de sangue para avaliar como está a sua doença. Você está sendo convidado(a) a fornecer a nossa equipe (doar) 24ml de sangue (6 tubos de coleta) para utilizarmos em nossa pesquisa. Antes de decidir, leia este documento que se chama Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE. Faça quantas perguntas achar necessário. Se for preciso, leve para casa e discuta com seus amigos e familiares. Tenha certeza que entendeu todo o texto.

Sobre o estudo

O objetivo do nosso estudo é pesquisar se alguns genes (genes do Interferon) conhecidos e relacionados à ativação de doenças autoimunes podem também estar relacionados à ativação sua doença, a Síndrome do Anticorpo Antifosfolípido (SAF). O Interferon é uma partícula envolvida na inflamação, e pode ativar o nosso sistema imunológico causando doenças. Já estão sendo criados remédios que agem na via do Interferon e que poderão ajudar esses pacientes. A causa da Síndrome do Anticorpo Antifosfolípido (SAF) ainda é desconhecida, e não se sabe exatamente quais genes estão envolvidos. A nossa intenção é ver se esses genes do Interferon estão ativados nos pacientes com SAF. Caso o resultado seja positivo, novos tratamentos poderão ser estudados para essa síndrome.

Porque fornecer (doar) o material?

É importante conhecer melhor a sua doença e os pesquisadores (médicos e pesquisadores de várias áreas) vão fazer vários testes com as amostras doadas. Os resultados podem ajudar a desenvolver novas possibilidades de tratamento para a sua doença. Não há nenhum benefício imediato para o participante, mas caso o resultado da pesquisa seja positivo, compreenderemos melhor a sua doença e novos tratamentos poderão ser estudados para essa doença.

Quando será o exame?

O sangue será coletado no dia da sua consulta regular no ambulatório de reumatologia, caso você queira participar do estudo. Realizaremos uma coleta única de sangue. Não haverá necessidade de múltiplas coletas para esse estudo.

Riscos de sua participação

Durante a coleta de sangue poderá ocorrer um mínimo extravasamento de sangue, com pouca dor no local após a coleta.

Proteção dos seus direitos e de sua confidencialidade

Todo o material usado para pesquisa será identificado no laboratório por um código formado por números e letras. Assim seu nome não vai ser divulgado e sua privacidade e identidade serão preservadas. Os resultados da pesquisa, quando publicados, irão manter o seu anonimato e poderão ser utilizados em pesquisas futuras. As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente individualmente.

Pagamentos, despesas e benefícios:

Se você concordar que os pesquisadores usem o material fornecido do modo explicado aqui, você não receberá pagamentos por isso. Se a pesquisa gerar resultados com este material, você também não terá direito a pagamentos por isso. Não há benefícios diretos aos participantes. Os resultados das pesquisas com seu material podem, futuramente, ajudar e beneficiar outras pessoas com a mesma doença que você, melhorando entendimento e o tratamento sua da doença. Não há despesas pessoais para o voluntário e nem ajuda de custo.

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável _____
Rubrica do pesquisador _____

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP**Autonomia**

Sua decisão de fornecer o material é totalmente voluntária. Se você não concordar em permitir o uso do seu material para pesquisa, sua decisão não afetará, de nenhum modo, o seu tratamento. Você pode também decidir não participar da pesquisa a qualquer momento. Esta decisão será respeitada sem qualquer problema a você ou seu atendimento na Instituição.

Por favor, leia com atenção e assinale as opções que você concorda. Estas serão as condições que iremos tratar o material que você fornecerá.

Você concorda em fornecer a amostra de sangue para a pesquisa?

() Sim () Não

Se sim, você autoriza a utilização do material em todas as pesquisas pertinentes?

() Sim () Não

Garantia de acesso

Sempre que você quiser conversar sobre algum resultado de pesquisa de seu material, ou quiser obter informações de qualquer tipo, ou tirar qualquer dúvida, você deve procurar a um dos responsáveis pela pesquisa na área de Reumatologia. A pesquisadora responsável é a Dra Danielli Castro Oliveira Andrade responsável pela pesquisa na área de Reumatologia: Av. Dr. Arnaldo, 255 - 3º andar - Cerqueira César - São Paulo - SP - CEP: 01246-000 Telefone(s) (11) 30617176. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) - Rua Ovídio Pires de Campos, 225 - 5º andar - tel: 2661-6442 ramais 16, 17, 18 - e-mail: cappesq@hcfmusp.usp.br.

E se desistir de participar do estudo?

É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo a continuidade de seu tratamento na Instituição.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "Assinatura de Interferon tipo I na Síndrome Antifosfolípide Primária".

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável _____
Rubrica do pesquisador _____

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

Eu discuti com a Dra. Daniell Castro Oliveira de Andrade sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia de acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal

Data/...../.....

Assinatura da testemunha

Data/...../.....

(para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo

Assinatura do responsável pelo estudo

Data/...../.....

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável _____
Rubrica do pesquisador _____

8 REFERÊNCIAS

1. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R, Derksen RH, DE Groot PG, Koike T, Meroni PL, Reber G, Shoenfeld Y, Tincani A, Vlachoyiannopoulos PG, Krilis SA. International consensus statement on an update of classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost.* 2006;4:295-306.
2. Lopes MRU, Danowski A, Funke A, Rêgo J, Levy R, Andrade DCO. Update on antiphospholipid antibody syndrome. *Rev Assoc Med Bras.* 2017;63(11):994-9.
3. Rosa RF, Ugolini-Lopes MR, Zeinad-Valim AK, D'Amico E, Andrade D. Difficult clinical situations in the antiphospholipid syndrome. *Curr Rheumatol Rep.* 2015;17(4):29.
4. Voisin L, Derumeaux G, Borg JY, Mejjad O, Vittecoq O, Tayot J, Thomine E, Tron F, Le Loët X. Catastrophic antiphospholipid syndrome with fatal acute course in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 1995;22(8):1586-8.
5. Wielosz E, Majdan M, Koszarny A, Zychowska I. The overlap of primary Sjögren's syndrome with antiphospholipid syndrome in man: case report. *Pol Arch Med Wewn.* 2007;117(Suppl):76-8.

6. Cervera R, Boffa M-C, Khamashta MA, Hughes GRV. The Euro-Phospholipid project: epidemiology of the antiphospholipid syndrome in Europe. *Lupus*. 2009;18:889-93.
7. Ginsburg KS, Liang MH, Newcomer L, Goldhaber SZ, Schur PH, Hennekens CH, Stampfer MJ. Anticardiolipin antibodies and the risk and risk for ischemic stroke and venous thrombosis. *Ann Intern Med*. 1992;117(12):997-1002.
8. Levine JS, Branch DW, Rauch J. The antiphospholipid syndrome. *N Engl J Med*. 2002;346:752-63.
9. Shoenfeld Y, Blank M, Cervera R, Font J, Raschi E, Meroni PL. Infectious origin of the antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis*. 2006;65(1):2-6.
10. Pierangeli SS, Vega-Ostertag ME, Raschi E, Liu X, Romay-Penabad Z, De Micheli V, Galli M, Moia M, Tincani A, Borghi MO, Nguyen-Oghalai T, Meroni PL. Toll-like receptor and antiphospholipid mediated thrombosis: in vivo studies. *Ann Rheum Dis*. 2007;66(10):1327-33.
11. Zhou H, Sheng L, Wang H, Xie H, Mu Y, Wang T, Yan J. Anti- β 2GPI/ β 2GPI stimulates activation of THP-1 cells through TLR4/MD-2/MyD88 and NF- κ B signaling pathways. *Thromb Res*. 2013;132(6):742-9.
12. Raschi E, Borghi MO, Grossi C, Brogini V, Pierangeli S, Meroni PL. Toll-like receptors: another player in the pathogenesis of the antiphospholipid syndrome. *Lupus*. 2008;17(10):937-42.

13. Allen KL, Fonseca FV, Betapudi V, Willard B, Zhang J, McCrae KR. A novel pathway for human endothelial cell activation by antiphospholipid/anti- β 2 glycoprotein I antibodies. *Blood*. 2012;119(3):884-93.
14. Colasanti T, Alessandri C, Capozzi A, Sorice M, Delunardo F, Longo A, Pierdominici M, Conti F, Truglia S, Siracusano A, Valesini G, Ortona E, Margutti P. Autoantibodies specific to a peptide of β 2-glycoprotein I cross-react with TLR4, inducing a proinflammatory phenotype in endothelial cells and monocytes. *Blood*. 2012;120(16):3360-70
15. Xie H, Sheng L, Zhou H, Yan J. The role of TLR4 in pathophysiology of antiphospholipid syndrome-associated thrombosis and pregnancy morbidity. *Br J Haematol*. 2014;164(2):165-76.
16. Rönnblom L, Eloranta ML, Alm GV. The type I interferon system in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2006;54(2):408-20.
17. Weissmann C, Nagata S, Boll W, Fountoulakis M, Fujisawa A, Fujisawa JI, Haynes J, Henco K, Mantei N, Ragg H, Schein C, Schmid J, Shaw G, Streuli M, Taira H, Todokoro K, Weidle U. Structure and expression of human IFN-alpha genes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1982;299(1094):7-28.
18. Rönnblom L. The type I interferon system in the etiopathogenesis of autoimmune diseases. *Ups J Med Sci*. 2011;116:227-37.

19. Choubey D, Moudgil KD. Interferons in autoimmune and inflammatory diseases: regulation and roles. *J Interferon Cytokine Res.* 2011;31(12):857-65.
20. Samuel CE. Antiviral actions of interferon. Interferon-regulated cellular proteins and their surprisingly selective antiviral activities. *Virology.* 1991;183(1):1-11.
21. Kochi Y. Genetics of autoimmune diseases: perspectives from genome-wide association studies. *Int Immunol.* 2016;28(4):155-61.
22. Cui Y, Sheng Y, Zhang X. Genetic susceptibility to SLE: recent progress from GWAS. *J Autoimmun.* 2013;41:25-33.
23. Hooks JJ, Moutsopoulos HM, Géis SA, Decker JL, Notkins AL. Immune interferon in the circulation of patients with autoimmune disease. *N Engl J Med.* 1979;301(1):5-8.
24. Schilling PJ, Kurzrock R, Kantarjian H, Gutterman JU, Talpaz M. Development of systemic lupus erythematosus after interferon therapy for chronic myelogenous leukemia. *Cancer.* 1991;68(7):1536-7.
25. Hory B, Blanc D, Saint-Hilier Y. Systemic lupus erythematosus-like syndrome induced by alpha-interferon therapy. *Eur J Med.* 1992;1(6):379.
26. Blanco P, Palucka AK, Gill M, Pascual V, Banchereau J. Induction of dendritic cell differentiation by IFN-alpha in systemic lupus erythematosus. *Science* 2001;294(5546):1540-3.

27. Rönnblom L, Pascual V. The innate immune system in SLE: type I interferons and dendritic cells. *Lupus*. 2008;17(5):394-9.
28. Rönnblom L, Alm GV, Eloranta ML. The type I interferon system in the development of lupus. *Semin Immunol*. 2011;23(2):113-21.
29. Yang D, Arkfeld D, Fong TL. Development of anti-CCP-positive rheumatoid arthritis following pegylated interferon- α 2a treatment for chronic hepatitis C infection. *J Rheumatol*. 2010;38(8):1777.
30. Izumi Y, Komori A, Yasunaga Y, Hashimoto S, Miyashita T, Abiru S, Yatsunami H, Ishibashi H, Migita K. Rheumatoid arthritis following a treatment with IFN- α /ribavirin against HCV infection. *Intern Med*. 2011;50(9):1065-8.
31. Beretta L, Caronni M, Vanoli M, Scorza R. Systemic sclerosis after interferon- α therapy for myeloproliferative disorders. *Br J Dermatol*. 2002;147(2):385-6.
32. Solans R, Bosch JA, Esteban I, Vilardell M. Systemic sclerosis developing in association with the use of interferon α therapy for chronic viral hepatitis. *Clin Exp Rheumatol*. 2004;22(5):625-8.
33. Dionisiotis J, Zoukos Y, Thomaidis T. Development of myasthenia gravis in two patients with multiple sclerosis following interferon beta treatment. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2004;75(7):1079.
34. López-Lerma I, Iranzo P, Herrero C. New-onset psoriasis in a patient treated with interferon beta-1a. *Br J Dermatol*. 2009;160(3):716-7.

35. Meyer O. Interferons and autoimmune disorders. *Joint Bone Spine*. 2009;76(5):464-73.
36. Broder A, Chan JJ, Putterman C. Dendritic cells: an important link between antiphospholipid antibodies, endothelial dysfunction, and atherosclerosis in autoimmune and non-autoimmune diseases. *Clin Immunol*. 2013;146:197-206.
37. Levy Z, Rachmani R, Trestman S, Dvir A, Shaish A, Ravid M, Harats D. Low-dose interferon-alpha accelerates atherosclerosis in a LDL receptor-deficient mouse model. *Eur J Intern Med*. 2003;14:479-83.
38. Goossens P, Gijbels MJ, Zerneck A, Eijgelaar W, Vergouwe MN, van der Made I, Vanderlocht J, Beckers L, Buurman WA, Daemen MJ, Kalinke U, Weber C, Lutgens E, de Winther MP. Myeloid type I interferon signaling promotes atherosclerosis by stimulating macrophage recruitment to lesions. *Cell Metab*. 2010;12:142-53.
39. Niessner A, Sato K, Chaikof EL, Colmegna I, Goronzy JJ, Weyand CM. Pathogen-sensing plasmacytoid dendritic cells stimulate cytotoxic T-cell function in the atherosclerotic plaque through interferon-alpha. *Circulation*. 2006;114:2482-9.
40. Thacker SG, Berthier CC, Mattinzoli D, Rastaldi MP, Kretzler M, Kaplan MJ. The detrimental effects of IFN- α on vasculogenesis in lupus are mediated by repression of IL-1 pathways: potential role in atherogenesis and renal vascular rarefaction. *J Immunol*. 2010;185(7):4457-69.

41. Kaplan MJ, Salmon JE. How does interferon- α insult the vasculature? Let me count the ways. *Arthritis Rheum.* 2011;63(2):334-6.
42. Denny MF, Thacker S, Mehta H, Somers EC, Dodick T, Barrat FJ, McCune WJ, Kaplan MJ. Interferon- α promotes abnormal vasculogenesis in lupus: a potential pathway for premature atherosclerosis. *Blood.* 2007;110(8):2907-15.
43. Karageorgas TP, Tseronis DD, Mavragani CP. Activation of type interferon pathway in systemic lupus erythematosus: association with distinct clinical phenotypes. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:273907.
44. Denny MF, Yalavarthi S, Zhao W, Thacker SG, Anderson M, Sandy AR, McCune WJ, Kaplan MJ. A distinct subset of proinflammatory neutrophils isolated from patients with systemic lupus erythematosus induces vascular damage and synthesizes type I IFNs. *J Immunol.* 2010;184(6):3284-97.
45. Andrade D, Kim M, Blanco LP, Karumanchi SA, Koo GC, Redecha P, Kirou K, Alvarez AM, Mulla MJ, Crow MK, Abrahams VM, Kaplan MJ, Salmon JE. Interferon- α and angiogenic dysregulation in pregnant lupus patients who develop preeclampsia. *Arthritis Rheumatol.* 2015;67(4):977-87.
46. van den Hoogen LL, van Roon JAG, Radstake TRDJ, Fritsch-Stork RD, Derksen RH. Delineating the deranged immune system in the antiphospholipid syndrome. *Autoimmun Rev.* 2016;15(1):50-60.

47. Bernales I, Fullaondo A, Marín-Vidalled MJ, Ucar E, Martínez-Taboada V, López-Hoyos M, Zubiaga AM. Innate immune response gene expression profiles characterize primary antiphospholipid syndrome. *Genes Immun.* 2008;9(1):38-46.
48. Knight JS, Meng H, Coit P, Yalavarthi S, Sule G, Gandhi AA, Grenn RC, Mazza LF, Ali RA, Renauer P, Wren JD, Bockenstedt PL, Wang H, Eitzman DT, Sawalha AH. Activated signature of antiphospholipid syndrome neutrophils reveals potential therapeutic target. *JCI Insight.* 2017;2(18).
49. Perez-Sanchez C, Barbarroja N, Messineo S, Ruiz-Limon P, Rodriguez-Ariza A, Jimenez-Gomez Y, Khamashta MA, Collantes-Estevez E, Cuadrado MJ, Aguirre MA, Lopez-Pedreira C. Gene profiling reveals specific molecular pathways in the pathogenesis of atherosclerosis and cardiovascular disease in antiphospholipid syndrome, systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome with lupus. *Ann Rheum Dis.* 2015;74(7):1441-9.
50. Grenn RC, Yalavarthi S, Gandhi AA, Kazzaz NM, Núñez-Álvarez C, Hernández-Ramírez D, Cabral AR, McCune WJ, Bockenstedt PL, Knight JS. Endothelial progenitor dysfunction associates with a type I interferon signature in primary antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis.* 2017;76(2):450-7.

51. van den Hoogen LL, Fritsch-Stork RD, Versnel MA, Derksen RH, van Roon JA, Radstake TR. Monocyte type I interferon signature in antiphospholipid syndrome is related to proinflammatory monocyte subsets, hydroxychloroquine and statin use. *Ann Rheum Dis.* 2016;75(12):e81.
52. Baechler EC, Batliwalla FM, Karypis G, Gaffney PM, Ortmann WA, Espe KJ, Shark KB, Grande WJ, Hughes KM, Kapur V, Gregersen PK, Behrens TW. Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus. *Proc Natl Acad Sci.* 2003;100(5):2610-5.
53. Bauer JW, Petri M, Batliwalla FM, Koeuth T, Wilson J, Slattery C, Panoskaltzis-Mortari A, Gregersen PK, Behrens TW, Baechler EC. Interferon-alpha regulated chemokines as biomarkers of systemic lupus erythematosus disease activity: a validation study. *Arthritis Rheum.* 2009; 60:3098-3107.
54. Landolt-Marticorena C, Bonventi G, Lubovich A, Ferguson C, Unnithan T, Su J, Gladman DD, Urowitz M, Fortin PR, Wither J. Lack of association between the interferon-alpha signature and longitudinal changes in disease activity in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis.* 2009;68(9):1440-6.
55. Petri M, Singh S, Tesfayone H, Dedrick R, Fry K, Lal P, Williams G, Bauer J, Gregersen P, Behrens T, Baechler E. Longitudinal expression of type I interferon responsive genes in systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 2009;18(11):980-9.

56. Kennedy WP, Maciuca R, Wolslegel K, Tew W, Abbas AR, Chaivorapol C, Morimoto A, McBride JM, Brunetta P, Richardson BC, Davis JC Jr, Behrens TW, Townsend MJ. Association of the interferon signature metric with serological disease manifestations but not global activity scores in multiple cohorts of patients with SLE. *Lupus Sci Med*. 2015;2(1):e000080.
57. Arbuckle MR1, McClain MT, Rubertone MV, Scofield RH, Dennis GJ, James JA, Harley JB. Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med*. 2003.16;349(16):1526-33.

APÊNDICE

Apêndice A - Apresentação no ERA 2018 - Premiada como 3º melhor comunicação oral

