LÚCIA MARIA DE ARRUDA CAMPOS

ANTICORPOS ANTINUCLEOSSOMO EM PACIENTES COM
LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO JUVENIL

Tese apresentada ao Departamento de
Pediatria da Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo, para obtenção
do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Pediatria

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Helena B.Kiss

SÃO PAULO

2005

*Ao meu marido Ronaldo e nossas filhas,
Marina e Beatriz, com o desejo de
permanecermos sempre e cada vez mais
unidos.*

*Aos meus pais, Flávio e Myriam, e minhas
irmãs Silvia Helena, Maria Beatriz e Ana
Cecília, pois as distâncias em nada
diminuem o apoio recebido.*

*Aos meus sogros, Tácito e Maria Lúcia,
pela eterna disposição.*

À Profa. Dra. Maria Helena Bittencourt Kiss, pela capacidade científica excepcional e pelo prazer de, quando ao seu lado, estar sempre aprendendo.

Ao Prof. Dr. Morton Scheinberg, cuja inestimável contribuição tornou viável este estudo.

AGRADECIMENTOS:

Prof. Dr. Yassuhiko Okay

Prof. Dr. Flávio Adolfo Costa Vaz

Profa. Dra. Magda Carneiro-Sampaio

Profa. Dra. Sandra Grisi

Dr. Cristóvão Luis Pitangueira Mangueira

Patrícia Regina Barboza Araújo

Dr. Clóvis Artur Almeida Silva

Dr. Bernadete de Lourdes Liphaut

Dra. Ana Paola Lotito

Dra. Adriana Maluf Elias Sallum

Residentes e Pós Graduandos da Unidade de Reumatologia Pediátrica:

Mércia, Ana Júlia, Rosa, Elisabeth, Juliana, Ricardo, Marília, Georgiana, Aline, Nadyesda, Daniela e Adriana

Dr. Ulysses Dória Filho

Prof. Dr. Cláudio Leone

Unidade de Adolescentes, em especial Profa. Dra. Maria Ignez Saito, Dra.

Marta Miranda Leal e Dr. Luiz Eduardo Vargas da Silva

Maria José Paro Forte

Grupo de aprendizes do projeto CAMP (centro de aprendizagem e monitoramento profissional) em estágio no Instituto da Criança

Wilma Isoko Inamini

Karina Hatamoto Kawasaki

Equipe do Arquivo Médico, em especial Beatriz, Fátima, Mônica e Luis Carlos

Equipe da Biblioteca, em especial Marisa

Elaine Maria Segato Rizzo

Equipe da Informática, em especial Tailma

Aos pacientes e seus familiares

SUMÁRIO

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Summary

1.	INTRODUÇÃO	1
1.1	LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO JUVENIL	1
1.2	PATOGÊNESE DO LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO	3
1.3	ANTICORPOS ANTINUCLEOSSOMO	9
1.4	DISCORDÂNCIA ENTRE ANTICORPOS ANTINUCLEOSSOMO E ANTI-DNA	12
1.5	ANTICORPOS ANTINUCLEOSSOMO E COMPROMETIMENTO RENAL	14
1.6	ANTICORPOS ANTINUCLEOSSOMO E ATIVIDADE DO LES.....	15
1.7	ANTICORPOS ANTINUCLEOSSOMO NO LES JUVENIL	17
2.	OBJETIVOS	18
3.	MÉTODOS	19
3.1	CASUÍSTICA	19
3.2	TESTES LABORATORIAIS	20
3.3	CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E LABORATORIAL DA POPULAÇÃO ESTUDADA	21

3.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	24
4.	RESULTADOS.....	25
4.1	ANTICORPOS ANTINUCLEOSSOMO E COMPARAÇÃO COM ANTICORPOS ANTI-DNA.....	25
4.2	ANTICORPOS ANTINUCLEOSSOMO E DADOS CLÍNICOS LABORATORIAIS.....	29
4.3	ANTICORPOS ANTINUCLEOSSOMO E COMPROMETIMENTO RENAL.....	33
4.4	ANTICORPOS ANTINUCLEOSSOMO E ATIVIDADE DO LES.....	36
5.	DISCUSSÃO	42
5.1	ANTICORPOS ANTINUCLEOSSOMO.....	42
5.2	COMPARAÇÃO ENTRE ANTICORPOS ANTINUCLEOSSOMO E ANTI-DNA	45
5.3	ANTICORPOS ANTINUCLEOSSOMO E DADOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS.....	47
5.4	ANTICORPOS ANTINUCLEOSSOMO E COMPROMETIMENTO RENAL	50
5.5	ANTICORPOS ANTINUCLEOSSOMO E A ATIVIDADE DO LES.....	55
5.6	ANTICORPOS ANTINUCLESSOMO: APLICAÇÕES FUTURAS.....	57
6.	CONCLUSÕES	59

7.	ANEXOS	60
	ANEXO 1.....	60
	ANEXO 2:.....	64
	ANEXO 3:	66
	ANEXO 4:	68
	ANEXO 5:.....	70
	ANEXO 6:.....	72
8.	REFERÊNCIAS.....	74

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Representação esquemática da estrutura do nucleossomo (Modificado de LESER, ANDRADE, 2004).....	4
Figura 2:	Representação esquemática da geração de auto-anticorpos a partir do processo de apoptose (Modificado de DIEKER, van der VLAG, BERDEN, 2002).	7
Gráfico 1:	Distribuição dos anticorpos antinucleossomo e dos anticorpos anti-DNA em 74 pacientes portadores de lúpus eritematoso sistêmico juvenil.....	26
Gráfico 2:	Distribuição do título dos anticorpos antinucleossomo no grupo de 74 pacientes portadores de lúpus eritematoso sistêmico juvenil e no grupo de 64 controles saudáveis.	27
Gráfico 3:	Distribuição do título dos anticorpos anti-DNA no grupo de 74 pacientes portadores de lúpus eritematoso sistêmico juvenil e no grupo de 64 controles saudáveis.	27
Gráfico 4:	Correlação entre o título dos anticorpos antinucleossomo e o título do anticorpo anti-DNA em 74 pacientes portadores de lúpus eritematoso sistêmico juvenil.....	28
Gráfico 5:	Correlação entre o títulos dos anticorpos antinucleossomo e VHS em 74 pacientes portadores de lúpus eritematoso sistêmico juvenil.	37
Gráfico 6:	Correlação entre o títulos dos anticorpos anti-DNA e VHS em 74 pacientes portadores de lúpus eritematoso sistêmico juvenil.	38
Gráfico 7:	Correlação entre o títulos dos anticorpos antinucleossomo e escore de SLEDAI em 74 pacientes portadores de lúpus eritematoso sistêmico juvenil.....	38

Gráfico 8:	Correlação entre o títulos dos anticorpos anti-DNA e escore de SLEDAI em 74 pacientes portadores de lúpus eritematoso sistêmico juvenil.	39
Gráfico 9:	Correlação entre o nível sérico da fração C3 do complemento e o título dos anticorpos antinucleossomo em 74 pacientes portadores de lúpus eritematoso sistêmico juvenil.	40
Gráfico 10:	Correlação entre o nível sérico da fração C3 do complemento e o título dos anticorpos anti-DNA em 74 pacientes portadores de lúpus eritematoso sistêmico juvenil.....	40
Gráfico 11:	Correlação entre o nível sérico da fração C4 do complemento e o título dos anticorpos antinucleossomo em 74 pacientes portadores de lúpus eritematoso sistêmico juvenil.	41
Gráfico 12:	Correlação entre o nível sérico da fração C4 do complemento e o título dos anticorpos anti-DNA em 74 pacientes portadores de lúpus eritematoso sistêmico juvenil.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Freqüência e discordância entre os anticorpos antinucleossomo e anti-DNA em pacientes portadores de lúpus eritematoso sistêmico.	12
Tabela 2:	Correlação dos subtipos de anticorpos anticromatina com a atividade do lúpus eritematoso sistêmico.....	16
Tabela 3:	Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo dos anticorpos antinucleossomo e anti-DNA estudados em um grupo de 74 pacientes portadores de lúpus eritematoso sistêmico juvenil e 64 controles saudáveis.	28
Tabela 4:	Dados demográficos de 74 pacientes portadores de lúpus eritematoso sistêmico juvenil e positividade dos anticorpos antinucleossomo.....	29
Tabela 5:	Manifestações clínicas e alterações laboratoriais pregressas em 74 pacientes com lúpus eritematoso sistêmico juvenil e positividade dos anticorpos antinucleossomo.	30
Tabela 6:	Manifestações clínicas e alterações laboratoriais atuais em 74 pacientes com lúpus eritematoso sistêmico juvenil e positividade dos anticorpos antinucleossomo.	32
Tabela 7:	Medicamentos utilizados à época do estudo em 74 pacientes portadores de lúpus eritematoso sistêmico juvenil e positividade dos anticorpos antinucleossomo.	33
Tabela 8:	Associação dos anticorpos antinucleossomo e anti-DNA com o comprometimento renal pregresso e atividade atual em um grupo de 74 pacientes portadores de lúpus eritematoso sistêmico juvenil.....	34

Tabela 9:	Comprometimento renal prévio e atividade atual em um grupo de 74 pacientes portadores de lúpus eritematoso sistêmico juvenil em relação à presença de anticorpos antinucleossomo e anti-DNA concordantes e discordantes.....	34
Tabela 10:	Atividade renal atual e positividade dos anticorpos antinucleossomo em 74 pacientes portadores de lúpus eritematoso sistêmico.....	35
Tabela 11:	Classe histológica do comprometimento renal pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e positividade dos anticorpos antinucleossomo em 41 pacientes portadores de lúpus eritematoso sistêmico juvenil.	35
Tabela 12:	Indicadores de atividade da doença e presença de anticorpos antinucleossomo em 74 pacientes portadores de lúpus eritematoso sistêmico juvenil.	36
Tabela 13:	Sensibilidade e especificidade dos anticorpos antinucleossomo e anti-DNA em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico.	43

RESUMO

INTRODUÇÃO: O lúpus eritematoso sistêmico juvenil (LESJ) é uma doença associada à alta morbidade, sendo que seu diagnóstico precoce é de significativa importância clínica. Entre os ensaios biológicos utilizados para o diagnóstico do LES, considera-se que a detecção dos anticorpos anti-DNA é altamente específica. No entanto, este anticorpo é negativo em 20 a 40% dos pacientes. Estudos recentes revelaram o interesse potencial no uso dos anticorpos antinucleossomo (AN) no diagnóstico do LES. **OBJETIVOS:** Avaliar a positividade dos AN em pacientes com LESJ, comparando os resultados com aqueles observados para os anticorpos anti-DNA, e estudar a associação entre os AN e manifestações clínicas, laboratoriais e atividade da doença. **MÉTODOS:** Os soros de 74 pacientes portadores de LESJ seguidos no Instituto da Criança – Hospital das Clínicas – FMUSP e de 64 controles normais foram coletados. Foram utilizados ensaios imunoenzimáticos para a detecção dos AN (INOVA Diagnostics) e anti-DNA (Hemagen Diagnostics). Os registros clínicos dos pacientes elegíveis foram recuperados e estudados. A atividade da doença no momento da coleta da amostra foi avaliada através da velocidade de hemossedimentação (VHS), níveis séricos das frações C3 e C4 do complemento e pelo *Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index* (SLEDAI). A medida do dano cumulativo da doença foi detectada pelo *Systemic Lupus International Collaborating Clinics/ACR Damage Index* (SLICC/ACR-DI). **RESULTADOS:** Os dados demográficos dos 74 pacientes com LESJ foram: relação F:M de 5.2:1; média de idade no início da doença de 9,8a (1,2-15,8a); média de idade à época do estudo de 14,4a (7,9-21,3a); tempo médio de seguimento de 4a (0-11,6a). A média de idade do grupo controle foi de 14,7a (2,1-21,6a). Os AN foram encontrados em 52,7% dos pacientes (39/74) e os anticorpos anti-DNA em 54% (40/74). Discordância de 25,7% entre os dois ensaios foi observada: AN positivos e anti-DNA negativos em nove casos (12,2%) e AN negativos e anti-DNA positivos em 10 casos (13,5%). Houve concordância

em 74,3% dos casos, sendo 30 pacientes positivos para ambos os anticorpos e 25 pacientes negativos para ambos. Todos os controles, exceto um, apresentaram AN negativos e três controles foram positivos para o anticorpo anti-DNA. Os AN e anti-DNA demonstraram, respectivamente, sensibilidade de 52,7% e 54%, especificidade de 98,4% e 95,3%, valor preditivo positivo de 97,5% e 93% e valor preditivo negativo de 64,3% e 64,2%. A presença dos AN esteve associada às seguintes manifestações clínicas e laboratoriais do LESJ observadas à época do estudo: eritema malar ($p=0,003$), alterações hematológicas ($p=0,022$), anemia hemolítica ($p=0,015$), anticorpos anti-DNA positivos ($p<0,001$) e diminuição dos níveis séricos das frações do complemento ($p<0,001$). Associação entre positividade dos AN e manifestações renais (prévias ou atuais) não foi observada, assim como entre positividade dos anticorpos anti-DNA e o comprometimento renal. Não houve diferença entre os grupos de AN positivos e negativos em relação à média de SLICC/ACR DI. A presença dos AN foi associada a uma média de SLEDAI mais elevada ($p<0,001$), mas não com o valor médio da VHS. Observou-se uma correlação moderada entre os títulos dos AN e o SLEDAI ($r_s=0,504$; $p<0,001$) e uma fraca correlação entre o título destes anticorpos e a VHS ($r=0,231$; $p=0,048$). Os títulos dos AN apresentaram correlação negativa com os níveis séricos das frações C3 ($r=0,422$; $p<0,001$) e C4 ($r=0,338$; $p=0,003$) do complemento. Os títulos dos anticorpos anti-DNA foram correlacionados ao SLEDAI ($r_s=0,426$), mas não à VHS. Uma fraca correlação foi evidenciada entre os títulos dos anticorpos anti-DNA e C4 ($r=0,250$; $p=0,031$), mas não com C3. **CONCLUSÕES:** Os anticorpos antinucleossomo apresentaram frequência, sensibilidade, especificidade e valor preditivo positivo e negativo semelhantes aos encontrados para os anticorpos anti-DNA. No entanto a discordância de 25,7% observada entre os dois anticorpos sugere que os dois testes possam ser complementares em termos diagnósticos. O AN apresentou associação com diversos indicadores de atividade da doença (manifestações clínicas, laboratoriais e escore do SLEDAI).

SUMMARY

INTRODUCTION: Juvenile systemic lupus erythematosus (JSLE) is associated with significant morbidity and its early diagnosis is of significant clinical importance. Among the biological assays used for the diagnosis of SLE, the detection of anti double stranded DNA antibodies (anti-DNA) is regarded as highly specific. However anti-DNA testing is negative in 20 to 40% of patients. Recent studies have revealed potential interest in the use of antinucleosome antibodies (AN) in the diagnosis of lupus. **OBJECTIVES:** To evaluate the positivity of AN in SLE children, comparing the results with those observed for anti-DNA, and to correlate the presence of AN with clinical manifestations and disease activity. **METHODS:** The sera from 74 JSLE patients followed at Instituto da Criança – Clinical Hospital – University of São Paulo Medical School and 64 normal children and adolescent controls were collected. Enzymeimmunoassay was used for detection of AN (INOVA Diagnostics) and anti-DNA antibodies (Hemagen Diagnostics). The clinical records of eligible patients were retrieved and studied. Disease activity at the moment of sample collect was assessed using erythrocyte sedimentation rate (ESR), serum complement levels (C3 and C4) and the Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index (SLEDAI). The measure of accumulate organ damage was provided by the Systemic Lupus International Collaborating Clinics/ACR Damage Index (SLICC/ACR DI). **RESULTS:** The demographic data from 74 JSLE patients were: sex ratio F:M of 5.2:1; mean age at disease onset of 9.8y (1.2-15.8y); mean age at study of 14.4y (7.9-21.3y); mean follow up of 4y (0-11.6y). The mean age of control group was 14.7y (2.1-21.6y). Antinucleosome antibodies were found in 52.7% of the patients (39/74) and anti-DNA antibodies in 54% (40/74). Discordance between the two assays was found in 25.7% of the cases: antinucleosome positive and anti-DNA negative in 9 cases (12.2%) and anti-DNA positive and antinucleosome negative in 10 cases (13.5%). Agreement was found in

74.3%: both antibodies positive in 30 and negative in 25 cases. All but one controlled sera were negative for AN and three controls were positive for anti-DNA. AN and anti-DNA antibodies showed sensitivity of 52.7% and 54%, specificity of 98.4% and 95.3%, positive predictive value of 97.5% and 93% and negative predictive value of 64.3% and 64.2%, respectively. The presence of AN was associated to the follow clinical and laboratorial manifestations present at the moment of the study: malar eritema ($p=0.003$), hematologic abnormalities ($p=0.022$), hemolytic anemia ($p=0.015$), positive anti-DNA antibodies ($p<0.001$) and decreased serum complement levels ($p<0.001$). No association was observed between positivity of either AN or anti-DNA antibodies and renal manifestations (previous or recent). There was no difference between the groups of positive and negative AN and SLICC/ACR DI median. The presence of AN was associated to higher SLEDAI median ($p<0.001$), but not with higher ESR median. It was observed a moderate correlation between AN titers and SLEDAI ($r=0.504$; $p<0.001$) and a weak correlation between these antibodies and ESR ($r=0.231$; $p=0.048$). There was a negative correlation between AN titers and C3 ($r=0.422$; $p<0.001$) and C4 ($r=0.338$; $p=0.003$) complement serum levels. The anti-DNA antibodies titers were correlated to SLEDAI ($r=0.426$), but not to ESR. It was noted negative weak correlation between anti-DNA antibodies titers and C4 ($r=0.250$; $p=0.031$), but not with C3 complement levels.

CONCLUSIONS: The frequency, sensitivity, specificity and positive and negative predictive values were similar between antinucleosome and anti-DNA antibodies. Nevertheless, the 25.7% of discordance between the two assays suggests that both antibodies may have a complementary diagnosis role. AN antibodies were associated to several activity disease indicators (clinical, laboratorial and SLEDAI score).

1. INTRODUÇÃO

1.1 LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO JUVENIL

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) juvenil é uma doença rara, com incidência anual nos Estados Unidos estimada em 0,6 casos/100.000 crianças, com pico entre 11 e 15 anos de idade, sendo rara antes dos cinco anos (CASSIDY, PETTY, 2001; HILÁRIO et al, 2002). A proporção entre meninas e meninos varia de 2 a 3:1 em pré-púberes a 8:1 na fase pós-puberal (CAEIRO et al, 1981; LEHMAN et al, 1989). Na Unidade de Reumatologia Pediátrica do Instituto da Criança, o LES juvenil é uma das principais patologias reumáticas em seguimento (CANOVA et al 2002; LIPHAUS et al, 2002; SILVA et al 2002a; SILVA et al 2002b).

A sua etiopatogenia permanece desconhecida. No entanto, hoje é sabido que a combinação de vários fatores, incluindo auto-imunidade, infecções virais, drogas, fatores hormonais e ambientais, em pacientes geneticamente predispostos, propiciam as alterações nos mecanismos imunorreguladores responsáveis pelas manifestações da doença (LEHMAN, 1997; CASSIDY, PETTY, 2001; LIPHAUS et al, 2002).

A principal característica do LES é o acometimento inflamatório generalizado do tecido conjuntivo e vasos sanguíneos e a produção de múltiplos auto-anticorpos. A doença é crônica, intercalando períodos de exacerbação e remissão, com diversas manifestações clínicas e laboratoriais próprias da doença, tais como fadiga, febre, fotossensibilidade, alopecia, alterações cutâneas, artrites, serosites, distúrbios do sistema nervoso central, comprometimento renal, entre outros. O início pode ser abrupto ou insidioso, sendo que o tempo médio entre o início dos sintomas e o diagnóstico do LES juvenil é de seis meses (CASSIDY, SULLIVAN, PETTY, 1977; CASSIDY, PETTY, 1995).

O prognóstico do LES está relacionado aos órgãos/sistemas envolvidos (WARD, PYUN, STUDENSKI, 1996), sendo, em geral, considerado mais reservado em crianças e adolescentes do que em adultos, pela maior freqüência de acometimento renal e neurológico (LEHMAN, 1997). Alguns fatores são associados com pior prognóstico e óbitos no LES. A hipertensão arterial é achado freqüente em pacientes em uso de corticoesteróides em altas doses ou com nefrite lúpica grave, graus III, IV ou V pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (CHURG, BERNSTEIN, GLASSOCK, 1995; WEENING et al, 2004). Estes pacientes evoluem mais freqüentemente para insuficiência renal (BRUNNER et al 2001). Atualmente, a taxa de sobrevida da nefrite lúpica, em cinco anos, é de 85-88% e, em 10 anos, entre 60-65% (Mc CURDY et al, 1992; LEHMAN, 1997).

Em relação às causas de óbitos no LES, UROWITZ et al, em 1976, descreveram um padrão bi-modal de mortalidade, onde nos primeiros anos da doença predominam os óbitos decorrentes de infecções e da atividade da doença, principalmente pelo comprometimento renal, enquanto que após este período predominam as mortes conseqüentes a doenças cardiovasculares (aterosclerose e infarto agudo do miocárdio). Este padrão bi-modal de mortalidade do LES foi comprovado por vários autores (KARSH et al, 1979; WALLACE et al, 1981; RUBIN, UROWITZ, GLADMAN, 1985; ABU-SHAKRA et al, 1995).

Nas últimas duas décadas ocorreu evidente melhora no prognóstico da doença, em especial no LES juvenil. Estima-se que a sobrevida em 10 anos passou de menos de 50%, observado até a década de 70, para cerca de 85%, mais recentemente (ABU-SHAKRA et al, 1995; GLADMAN, UROWITZ, 1997). Isso se deve a diversos fatores. Por um lado, houve o desenvolvimento de novas opções terapêuticas para tratar a doença e suas complicações, como agentes imunossupressores e biológicos, novas técnicas de diálise e transplante renal e ainda pelo maior arsenal de antibióticos e anti-hipertensivos disponíveis. Por outro lado, o diagnóstico do LES tem sido estabelecido mais precocemente, em virtude do melhor conhecimento clínico da doença e pelo desenvolvimento, pelo *American*

College of Rheumatology (ACR), de critérios de classificação para o LES (TAN et al, 1982).

No decorrer dos anos, esses critérios passaram por revisões com o objetivo de aumentar sua sensibilidade e especificidade, através, por exemplo, da introdução de testes laboratoriais mais específicos para esta doença (WARD, PYUN, STUDENSKI, 1996). A principal modificação da última revisão, de 1997, foi em relação ao diagnóstico sorológico da doença (HOCHBERG, 1997). A presença de anticorpos antifosfolípides (anticardiolipina e anticoagulante lúpico) passou a ser valorizada como critério diagnóstico, em substituição à presença de células LE. Isto contribuiu para o diagnóstico mais precoce da doença, assim como na identificação dos pacientes com maior risco de apresentarem complicações trombóticas (CAMPOS et al, 2003a; CAMPOS et al, 2003b), tendo, portanto, interesse diagnóstico e prognóstico. Foi na busca incessante por novos exames laboratoriais cada vez mais específicos que auxiliassem no diagnóstico do LES que surgiu o interesse pelo estudo dos anticorpos antinucleossomo.

1.2 PATOGÊNESE DO LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO

Atualmente, muito se tem estudado a respeito dos mecanismos desencadeantes da auto-imunidade observada em pacientes com LES. Especial atenção vem sendo dada à apoptose (mecanismo de morte celular) e sua relação com a produção de auto-anticorpos.

No processo de morte celular, ocorre a liberação de diversos antígenos intra-nucleares, entre eles a cromatina. A cromatina caracteriza-se por uma molécula composta de várias unidades denominadas nucleossomos, ligadas entre si, externamente, por histonas H1 e por proteínas não histonas. Cada nucleossomo é formado por aproximadamente 146 pares de bases de DNA enrolados ao redor de um octâmero de histonas (duas H2a, duas H2b, duas H3 e duas H4) (BURLINGAME, CERVERA, 2002; BENUCCI et al, 2003) (Figura 1).

Figura 1: Representação esquemática da estrutura do nucleossomo (Modificado de LESER, ANDRADE, 2004).

Sendo os nucleossomos estruturas intra-celulares, a única forma de expô-los ao sistema imunológico é através do processo de apoptose. Durante a apoptose, diversas enzimas, como as endonucleases, degradam o material nucleico, formando antígenos como a cromatina e seus componentes: nucleossomos, DNA e histonas. Esses antígenos passam a ser expostos na superfície da célula apoptótica. Esta célula passa a emitir sinais que ativam os macrófagos, que, por sua vez, fagocitam tais células antes que elas sejam capazes de liberar os antígenos na circulação (Licht et al, 2001).

Diferentes anormalidades envolvendo a apoptose ou a degradação de seus resíduos antigênicos podem interferir na auto-imunidade. A interação entre as proteínas de superfícies celulares Fas (CD95) e Fas ligante (FasL) são importantes no desencadeamento do processo apoptótico. Em modelos

animais, a inibição deste mecanismo por mutações nos genes *lpr* (Fas) e *gld* (FasL) pode resultar na eliminação insatisfatória de, por exemplo, linfócitos T e B auto-reativos e predispor ao aparecimento de auto-anticorpos. Também a expressão exacerbada de Bcl-2, um importante inibidor da apoptose, foi observada como fator desencadeante de auto-imunidade em camundongos. Porém, em indivíduos com LES, tais alterações não puderam ser comprovadas (DIEKER, van der VLAG, BERDEN, 2002; BERDEN et al, 2002; KEWALRAMANI, SINGH, 2002; KOUTOUZOV et al, 2004).

Por outro lado, a eliminação insatisfatória dos elementos formados no processo apoptótico pode propiciar o acúmulo de auto-antígenos. Isto pode ser resultado de uma exacerbação do mecanismo de apoptose no LES. Existem relatos de que pacientes lúpicos contêm níveis séricos elevados de monócitos e neutrófilos apoptóticos. Esta maior quantidade de células em apoptose pode ser responsável por uma concentração elevada de nucleossomos (auto-antígenos) circulantes (DIEKER, van der VLAG, BERDEN, 2002; KOUTOUZOV et al, 2004). O excesso de auto-antígenos também pode ser explicado pela fagocitose ineficiente destes elementos. Existem vários estudos que descrevem a diminuição de diferentes mediadores de reconhecimento de células apoptóticas pelos macrófagos, tais como: C1q, proteína amiloide P, proteína C reativa, β 2 glicoproteína 1, entre outros. A fração C1q do complemento pode se ligar diretamente aos aglomerados antigênicos da superfície das células apoptóticas, facilitando sua fagocitose. Relata-se que a presença de anticorpos anti-C1q e a deficiência de C1q em ratos e humanos está associada ao LES ativo e à glomerulonefrite. A proteína amiloide P sérica tem a capacidade de se ligar às células em apoptose, às suas vesículas de superfície e à cromatina liberada, mascarando-as e prevenindo o reconhecimento destes auto-antígenos pelo sistema imune e facilitando sua opsonização pelos leucócitos polimorfonucleares. A deficiência desta proteína em camundongos já foi associada à presença de auto-anticorpos e glomerulonefrite. A deficiência de Dnase 1 (principal nuclease sérica) pode prejudicar a degradação dos antígenos liberados pelas células em apoptose, levando ao acúmulo de nucleossomos, o que também está associado ao

desenvolvimento de glomerulonefrite em modelos animais (DIEKER, van der VLAG, BERDEN, 2002; KOUTOUZOV et al, 2004).

Deste modo, sugere-se que no LES exista um desequilíbrio entre a velocidade de apoptose celular e a capacidade dos macrófagos em fagocitá-las, resultando num acúmulo de auto-antígenos. Os próprios auto-antígenos podem sofrer modificações durante o processo de morte celular e se tornarem mais imunogênicos. Os antígenos modificados liberados pelo processo apoptótico são fagocitados por células dendríticas, que os apresentam a células T específicas pré-ativadas e estas, por sua vez, estimulam a produção de auto-anticorpos pelos linfócitos B auto-reativos, tais como anticorpos anticromatina, antinucleossomo, anti-histona e anti-DNA. O fato destes antígenos terem sido modificados durante a apoptose pode ser uma possível explicação para a perda de tolerância por parte dos linfócitos. A quebra da auto-tolerância também pode ser atribuída à presença de infecções virais. Antígenos virais podem se unir aos antígenos presentes na superfície das células apoptóticas tornando-os ainda mais imunogênicos (DIEKER, van der VLAG, BERDEN, 2002; BERDEN et al, 2002; REKVIG, NOSSENT, 2003; GAIPL et al, 2004; STICHWEN, ARCE, PASCUAL, 2004; KOUTOUZOV et al, 2004) (Figura 2).

A existência de células T e B auto-imunes é uma propriedade do sistema imune normal, sendo a ativação destas células inibida por uma série de fatores. Sugere-se que a perda da tolerância imunológica, em pacientes geneticamente predispostos, está associada à pressão antigênica exercida pelo material apoptótico, à apresentação de auto-antígenos alterados e a um contexto pró-inflamatório observados nestes pacientes, ampliando e perpetuando a resposta auto-imune patogênica observada no LES (KOUTOUZOV et al, 2004).

Figura 2: Representação esquemática da geração de auto-anticorpos a partir do processo de apoptose (Modificado de DIEKER, van der VLAG, BERDEN, 2002).

A estimulação de células T específicas para nucleossomos é capaz de promover a produção específica de auto-anticorpos antinucleossomo, mas também capaz de estimular a produção de auto-anticorpos contra outras estruturas dos nucleossomos, como anti-histona e anti-DNA, e mesmo anticromatina. Este fenômeno é conhecido como *epitope spreading*. É possível que epítomos nucleossomais estejam presentes nas moléculas de DNA e histonas que compõem os nucleossomos, justificando a estimulação de vários clones de células B (KOUTOUZOV et al, 2004). Modelos experimentais com ratos lúpicos demonstraram que a expressão de anticorpos antinucleossomo precede o aparecimento de anticorpos anti-DNA e anti-histona, argumentando-se que o aparecimento mais tardio destes anticorpos seria consequência do fenômeno de *epitope spreading*. De fato, nestes animais, a reatividade das células T específicas para nucleossomos pode ser demonstrada bem antes do aparecimento de qualquer outra manifestação sorológica ou clínica da doença.

Esses achados sugerem que os nucleossomos, e não o DNA, sejam os antígenos desencadeantes da patogênese do LES (BRUNS et al, 2000; BERDEN et al, 2002).

Por muitas décadas considerou-se que o anticorpo anti-DNA seria o responsável pela nefrite lúpica. Porém os estudos falharam em demonstrar a presença de DNA livre na circulação, dificilmente se identifica complexos de anticorpos anti-DNA/DNA e após a injeção endovenosa destes imunocomplexos não se observou depósitos glomerulares (KEWALRAMANI, SINGH, 2002).

Por sua vez, os nucleossomos também vêm sendo apontados como os antígenos precursores responsáveis pelo processo de glomerulonefrite. Isto porque os nucleossomos liberados no processo de morte celular apresentam carga elétrica positiva na porção N terminal de suas proteínas histonas, permitindo que os imunocomplexos formados com estes nucleossomos possam se depositar em estruturas de carga elétrica negativa da membrana basal glomerular (MBG), como o heparan sulfato e a laminina. Os imunocomplexos também podem se ligar às células endoteliais e mesangiais do rim. Uma vez depositados, o processo inflamatório local é desencadeado, resultando na glomerulonefrite. Esses imunocomplexos são decorrentes da ligação de nucleossomos com anticorpos antinucleossomo específicos. Os anticorpos anti-DNA podem se ligar aos nucleossomos circulantes ou depositados no rim, propiciando a formação de imunocomplexos locais com anticorpos não específicos, por reação cruzada. Deste modo, a ligação dos anticorpos anti-DNA no rim parece ser mediada pela presença dos nucleossomos (AMOURA et al, 1994; KRAMERS et al, 1994; van BRUGGEN et al, 1997b; AMOURA, KOUTOUZOV, PIETTE, 2000; LICHT et al, 2001; KEWALRAMANI, SINGH, 2002; BERDEN et al, 2002).

Já a ligação dos anticorpos anti-histona com os nucleossomos se dá na porção N-terminal das histonas, o que neutraliza a carga catiônica destas e inibe o depósito destes imunocomplexos no heparan sulfato. De fato, estudos demonstraram a presença de nucleossomos e de anticorpos antinucleossomo

no rim de pacientes e animais portadores de LES, principalmente em casos de glomerulonefrite classe IV da OMS, precedendo o aparecimento de anticorpos anti-DNA. Por sua vez, a presença de anticorpos anti-histona é pequena e não se eleva com a progressão da nefrite (van BRUGGEN et al, 1997a; BERDEN et al, 2002).

Em estudo com camundongos lúpicos expostos à cromatina, observou-se a formação de epítomos H1'₂₂₋₄₂ (provenientes de histonas externas à molécula de nucleossomo) pelas células apresentadoras de antígenos. Estes epítomos foram capazes de estimular vários clones de células T e conseqüentemente induzir a formação de vários anticorpos antinucleares pelas células B, que por sua vez se mostraram potentes desencadeantes da glomerulonefrite. Por outro lado, os anticorpos específicos anti- H1'₂₂₋₄₂, com o início da nefrite, se tornaram reativos contra outros auto-antígenos nucleares. A reatividade cruzada entre os antígenos e anticorpos parece ser uma característica relacionada aos epítomos da própria cromatina e de seus elementos: nucleossomos, histonas e DNA (*epitope spreading*), conferindo-lhes uma maior patogenicidade e predispondo ao desenvolvimento acelerado da glomerulonefrite lúpica (KALIYAPEMURAL, MICHAELS, DATTA, 2002).

1.3 ANTICORPOS ANTINUCLEOSSOMO

Devido às recentes evidências de que os anticorpos antinucleossomo estão relacionados à patogênese do LES, em especial da nefrite lúpica, observou-se um crescente interesse no estudo do comportamento destes anticorpos no soro de pacientes portadores de LES. Nos últimos anos foram publicadas diversas pesquisas estudando a frequência, a sensibilidade e a especificidade destes anticorpos no LES, assim como sua relação com a atividade da doença e com o risco de comprometimento renal, na busca de novos marcadores biológicos e indicadores de atividade, particularmente úteis nos casos de pacientes anti-DNA negativos (GOETZ, 2002; SCHETT et al, 2002; LEPERS et al, 2002; MIN et al, 2002; CAIRNS et al, 2003).

Pode-se notar que se tratam de anticorpos altamente sensíveis e específicos para o LES, raramente observados em indivíduos normais ou portadores de outras doenças do colágeno.

A sensibilidade e a especificidade dos anticorpos antinucleossomo foram, por muitos autores, comparadas à sensibilidade e especificidade dos anticorpos anti-DNA, tidos até então, como os mais fidedignos marcadores da doença e de sua atividade (CAIRNS et al, 2003; LESER, ANDRADE, 2004; SIMÓN et al, 2004a; GHIRARDELLO et al, 2004). Os estudos muitas vezes demonstraram a superioridade dos primeiros, especialmente em relação à sensibilidade do teste.

Observa-se, porém, na literatura, que existe uma grande variabilidade entre o resultado obtido quanto à sensibilidade do teste nos diferentes estudos apresentados, oscilando de 43% a 100% (em média 71,9%). Acredita-se que diferenças técnicas entre os estudos, como por exemplo o grau de precisão na purificação do antígeno, justifiquem em parte esta variação. Outro aspecto bastante discutido diz respeito ao valor considerado como positivo para o teste nos diferentes experimentos. Alguns autores estabelecem como valor de corte aquele recomendado pelo fabricante do teste comercial. Outros desenvolveram suas próprias curvas de normalidade baseadas em soros de indivíduos normais e a partir daí consideraram positivos soros com títulos com dois a três desvios padrões acima da curva (KOUTOUZOV et al, 2004).

Em relação à especificidade do anticorpo antinucleossomo, observa-se que ela é bastante elevada, especialmente quando comparados pacientes lúpicos e indivíduos normais. BRUNS et al, 2000, observaram elevada especificidade para os anticorpos antinucleossomo (97%), mesmo quando o grupo controle era formado por indivíduos portadores de nove diferentes doenças reumáticas ou infecciosas.

Porém existe polêmica em relação à positividade deste teste em outras doenças auto-imunes, como a esclerodermia sistêmica (SS) e a doença mista do tecido conectivo (DMTC). GHILLANI-DALBIN et al, 2003, estudaram a positividade dos anticorpos antinucleossomo em 1696 pacientes com doenças

auto-imunes (suspeitas ou confirmadas). Destes, 350 eram positivos para os anticorpos antinucleossomo: 78% da população lúpica, 7% dos casos de DMTC e 2% dos casos de SS, sendo muito rara nas outras patologias testadas (síndrome antifosfolípide primária, artrite reumatóide, síndrome de Sjogren, sarcoidose, entre outras). Outro estudo detectou a presença de anticorpos antinucleossomo em 70% de 50 pacientes portadores de DMTC, sendo muito rara em outras doenças do tecido conectivo, com exceção do LES (SIMÓN et al, 2004a). A capacidade dos anticorpos antinucleossomo de diferenciar pacientes lúpicos de pacientes com DMTC foi de 30%, não sendo útil, portanto, para este propósito. Também AMOURA et al, 2000, testaram a positividade destes anticorpos em 496 pacientes com 13 diferentes doenças do tecido conectivo, tendo encontrado o isotipo IgG em 71,7% dos pacientes lúpicos, 45,9% dos casos de SS e em 45% dos casos de DMTC, enquanto que o isotipo IgM foi observado em diversas doenças. Quando os autores testaram as subclasses de IgG, observaram que a atividade da subclasse IgG3 esteve significativamente elevada nos pacientes com LES, quando comparados aos pacientes com SS ou DMTC.

Outro estudo publicado em 2004 por GHIRARDELLO et al, encontrou anticorpos antinucleossomo em 86,1% dos pacientes lúpicos e em 22,8% dos casos de SS, mas observaram que, enquanto a média dos títulos para estes anticorpos era de 57,2U/ml nos casos de LES, nos casos de SS era de 11,5U/ml, para um *cut-off* de 10U/ml ($p < 0,0001$). Utilizando-se, para o mesmo teste, o *cut-off* de 20Ua, conforme recomendado pelo fabricante do teste comercial, HMIDA et al, 2002, encontraram anticorpos antinucleossomo em apenas 1,8% de pacientes com SS, mesmo assim em baixos títulos.

Discute-se ainda que a conhecida ligação observada entre os anticorpos antitopoisomerase (anti-Scl-70) e a cromatina ou nucleossomos utilizados em testes com antígenos menos purificados, poderia justificar a reatividade cruzada entre os anticorpos e o encontro de falsos positivos para os anticorpos antinucleossomo em pacientes com SS (KOUTOUZOV et al, 2004).

1.4 DISCORDÂNCIA ENTRE ANTICORPOS ANTINUCLEOSSOMO E ANTI-DNA

Outro aspecto interessante a se destacar é a existência de casos discordantes entre os anticorpos antinucleossomo e anti-DNA dentro da população lúpica, como observado na Tabela 1.

Nesta tabela, podemos observar que uma parcela dos pacientes com LES é positiva apenas para o anticorpo antinucleossomo, enquanto que outros pacientes são positivos apenas para o anticorpo anti-DNA. Assim, partindo do princípio que os dois anticorpos são extremamente específicos para o LES, a realização de ambos os testes eleva a sensibilidade laboratorial para a pesquisa da doença em 7% a 52%, de acordo com as diferentes séries (GOETZ, 2002).

Tabela 1: Frequência e discordância entre os anticorpos antinucleossomo e anti-DNA em pacientes portadores de lúpus eritematoso sistêmico.

Autores (nº de casos)	Anti-Ncs (%)	Anti-DNA (%)	anti-Ncs isolado (%)	anti-DNA isolado (%)
Burlingame et al, 1994 (40)	87,5	35	52,5	0
Wallace et al, 1994 (100)	31	21	10	12
Chabre et al, 1995 (40)	47,5	40	7,5	0
Amoura et al, 2000 (120)	71,7	21,7	50	0
Jerônimo et al (71)*	70,4	43,7	7	4,2
Mohan et al, 2001 (40)	72,5	52,5	25	nr
Min et al, 2002 (129)	76	80,6	11,6	nr
Ghillani-Dalbin et al, 2003 (240)	100	82	18	nr
Cairos et al, 2003 (95)	64	52	21	8
Cervera et al, 2003 (100)	69	55	20	6
Média dos estudos anteriores	69	48,3	22,2	4,3

Ncs= nucleossomo; nr= não realizado

* Jerônimo AL. (Departamento de Medicina Interna, Hospital General César Cals, Fortaleza, Brasil).
Dados não publicados; 2004

Alguns estudos merecem destaque. SCHETT et al, em 2002, estudaram 73 pacientes lúpicos e verificaram que 15 deles (20,5%) eram negativos para os anticorpos anti-DNA. Destes, 33% eram positivos para anticorpos anticromatina, 33% para anticorpos antinucleossomo e 20% para anticorpos anti-histona H1, demonstrando a utilidade diagnóstica dos novos anticorpos antinucleares.

Estudo semelhante publicado por LEPERS et al, 2002, observou que dos pacientes lúpicos positivos para o anticorpo anti-DNA, 51% apresentavam também anticorpos antinucleossomo, e dos pacientes anti-DNA negativos, 23% apresentavam anticorpos antinucleossomo. CAIRNS et al, 2003, estudando uma população de 95 pacientes lúpicos, verificaram que 43% eram positivos para ambos os anticorpos, 21% eram positivos apenas para anticorpos antinucleossomo, 8% eram positivos apenas para anticorpos anti-DNA e 27% eram negativos para os dois anticorpos, mais uma vez salientando a importância diagnóstica destes novos anticorpos. Neste estudo os anticorpos antinucleossomo demonstraram correlação com o comprometimento renal da doença, mas não com a atividade da mesma avaliada pelo *Systemic Lupus Erythematosus Activity Measure* (SLAM) (LIANG et al, 1989).

MIN et al, 2002, estudaram 129 pacientes com LES, dos quais 19% eram negativos para os anticorpos anti-DNA. Destes, 60% apresentavam anticorpos antinucleossomo positivos. Dos pacientes anti-DNA negativos, 32% apresentavam comprometimento renal e destes, todos eram positivos para os anticorpos antinucleossomo. Nenhum paciente negativo para ambos os anticorpos manifestava alterações renais. Além da associação com o quadro renal, os títulos dos anticorpos antinucleossomo estiveram fortemente associados à atividade da doença pelo *Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index* (SLEDAI) (BOMBARDIER et al. 1992) e inversamente correlacionados aos níveis séricos das frações do complemento.

1.5 ANTICORPOS ANTINUCLEOSSOMO E COMPROMETIMENTO RENAL

Paralelamente à importância diagnóstica conferida aos anticorpos antinucleossomo, muitos autores passaram a ressaltar a importância prognóstica dos mesmos, tanto em relação a sua associação com o comprometimento renal quanto sua correlação com a atividade da doença.

Diversos estudos demonstraram a associação entre anticorpos antinucleossomo e comprometimento renal, principalmente hematúria e proteinúria (BRUNS et al, 2000; BURLINGAME, CERVERA, 2002; SCHETT et al, 2002; MIN et al, 2002; BENUCCI et al, 2003; CAIRNS et al, 2003; SIMÓN et al, 2003; SIMÓN et al, 2004a).

CERVERA et al, em 2003 relataram uma maior prevalência (58% versus 29%) e títulos mais elevados (68U versus 42U) de anticorpos anticromatina no grupo de pacientes com nefropatia por LES, quando comparados ao grupo sem comprometimento renal.

Em estudo publicado por SIMÓN et al, 2004b, os autores acompanharam 71 pacientes lúpicos por 15 meses. Inicialmente 69% dos casos eram positivos para os anticorpos antinucleossomo, 67% para anti-DNA e 10% para anti-histona. Apenas os dois primeiros estiveram associados ao comprometimento renal. Dos pacientes anti-nucleossomo positivos, 45% evoluíram com nefrite, enquanto apenas 5% dos casos negativos para o mesmo anticorpo apresentaram tal evolução. Em relação aos anticorpos anti-DNA, dos casos positivos, 40% evoluíram com nefrite, assim como 10% dos casos negativos para o mesmo anticorpo. Apenas os títulos dos anticorpos antinucleossomo estiveram fortemente associados à nefrite lúpica, valorizando a pesquisa deste anticorpo como preditor do comprometimento renal. Em um estudo com pacientes lúpicos brasileiros, ainda não publicado (JERONIMO et al*), o anticorpo anti-DNA esteve associado à atividade da doença, com ou sem nefrite. O anticorpo antinucleossomo, por sua vez, esteve associado à

* Jerônimo AL. (Departamento de Medicina Interna, Hospital General César Cals, Fortaleza, Brasil).
Dados não publicados; 2004.

nefrite ativa, mas não demonstrou diferença entre os grupos de pacientes sem nefrite, com doença ativa ou inativa. Novamente os dados apontam para o papel dos anticorpos antinucleossomo como preditores do comprometimento renal do LES.

No entanto, não existe um consenso na literatura. Alguns autores falharam em relacionar a presença destes anticorpos com o envolvimento renal. CORTÉS-HERNÁNDEZ et al, 2004, estudaram a presença de anticorpos anticromatina em 199 pacientes lúpicos e observaram a associação dos anticorpos anti-DNA e anti-histona, mas não dos anticorpos antinucleossomo, com o comprometimento renal e com a atividade da doença. GHIRARDELLO et al, 2004, utilizando o *cut-off* de 10U/ml no teste imunoenzimático para a detecção dos anticorpos antinucleossomo, não conseguiram correlacioná-los ao envolvimento renal ou à atividade da doença.

Para AMOURA et al, 2000, apenas a subclasse IgG3 dos anticorpos antinucleossomo estiveram correlacionados à nefrite ativa. A mesma correlação não foi evidenciada entre IgG3 e pacientes com nefrite lúpica inativa. Portanto, a subclasse de IgG dosada poderia estar influenciando nos resultados aparentemente conflitantes observados nos diferentes estudos. RAVIRAJAN et al, 2001, por sua vez, falharam em correlacionar as diferentes subclasses de IgG com a nefrite lúpica e com a atividade da doença.

1.6 ANTICORPOS ANTINUCLEOSSOMO E ATIVIDADE DO LES

Também em relação à correlação entre os anticorpos antinucleossomo e a atividade do LES, encontramos na literatura resultados por vezes conflitantes. Incluindo os fatores previamente citados, o uso de diferentes critérios de atividade da doença certamente interfere nos resultados, por exemplo, a escolha entre os vários escores de atividade disponíveis: ECLAM (European Consensus Lupus Activity Measure) (BENCIVELLI et al, 1992), LACC (Lupus Activity Criteria Count) (UROWITZ et al, 1984), BILAC (British Isles Lupus Assessment Group index) (HAY et al, 1993), SLAM ou SLEDAI.

Enquanto a maior parte dos estudos publicados correlaciona os anticorpos antinucleossomo com a atividade da doença (BRUNS et al, 2000; HORÁK et al, 2001; SCHETT et al, 2002; MIN et al, 2002; BENUCCI et al, 2003; CORTÉS-HERNÁNDEZ et al, 2004; SIMÓN et al, 2004a) outros não observaram esta correlação (RAVIRAJAN et al, 2001; CAIRNS et al, 2003; GHIRARDELLO et al, 2004).

Para o grupo de BENUCCI et al, 2003, os anticorpos antinucleossomo estiveram correlacionados à atividade da doença pelo ECLAM e apresentaram correlação negativa com os níveis séricos das frações do complemento, outro parâmetro habitualmente utilizado para mensurar a atividade da doença, em especial a atividade renal.

Dois estudos pesquisaram a correlação do título dos anticorpos anticromatina (anti-DNA, antinucleossomo e anti-histona) com a atividade do LES, utilizando diferentes escores de atividade. Apesar de ambos os estudos demonstrarem correlação dos auto-anticorpos com a atividade da doença, SIMÓN et al, 2004a, observaram correlação mais forte com os anticorpos antinucleossomo, enquanto que para o grupo de SCHETT et al, 2002, a maior correlação foi evidenciada com o anticorpo anti-histona H1 (Tabela 2).

Tabela 2: Correlação dos subtipos de anticorpos anticromatina com a atividade do lúpus eritematoso sistêmico.

Estudo / Anticorpos	Anti-DNA (%)	Antinucleossomo (%)	Anti-histona (%)
SIMÓN et al, 2004a (SLEDAI modificado)*	rs=0,25 p=0,03	rs=0,45 p<0,0001	rs=0,28 p=0,01
SCHETT et al, 2002 (ECLAM)*	rs=0,54 p<0,001	rs=0,54 p<0,001	rs=0,67** p<0,001

*coeficiente de correlação de Spearman; **especificamente histona H1

AMOURA et al, 2000, estudando as subclasses de IgG dos anticorpos antinucleossomo notaram que apenas a subclasse IgG3 esteve correlacionada a atividade do LES medida pelo SLEDAI, enquanto que a subclasse IgG1

apresentou tendência à correlação inversa com a atividade da doença, demonstrando mais uma vez a importância do estudo das subclasses do anticorpo.

1.7 ANTICORPOS ANTINUCLEOSSOMO NO LES JUVENIL

A avaliação dos anticorpos anticromatina (anti-DNA, anti-histona e antinucleossomo) em crianças e adolescentes portadores de LES foi realizada em uma única pesquisa em 1994. Numa casuística de apenas 22 pacientes foi demonstrada a associação destes anticorpos com a atividade da doença, baseada nos índices LACC e SLAM. Neste estudo, apenas os anticorpos anti-DNA estiveram associados ao quadro renal. Entretanto, as técnicas laboratoriais utilizadas não foram padronizadas, o critério utilizado para a determinação do *cut-off* é bastante questionável e a casuística estudada muito pequena, não permitindo afirmações conclusivas (MASSA et al, 1994).

É portando, de grande interesse estudar a presença dos anticorpos antinucleossomo numa casuística ampla de pacientes portadores de LES juvenil, avaliando seu comportamento e sua associação com a atividade da doença e o comprometimento renal, com possíveis implicações diagnósticas e prognósticas.

2. OBJETIVOS

Em pacientes portadores de lúpus eritematoso sistêmico (LES) juvenil, determinar:

1. A frequência dos anticorpos antinucleossomo, assim como sua sensibilidade, especificidade e valor preditivo positivo e negativo.
2. Relacionar sua presença às manifestações clínico-laboratoriais da doença, em especial: comprometimento renal, atividade e dano acumulativo do LES.
3. Comparar o comportamento dos anticorpos antinucleossomo em relação aos anticorpos anti-DNA, na mesma população.

3. MÉTODOS

3.1 CASUÍSTICA

Durante os meses de março a outubro de 2004, foi avaliada uma população de 74 crianças e adolescentes com diagnóstico estabelecido de LES juvenil, segundo os critérios revisados pelo ACR (HOCHBERG, 1997), atendidos consecutivamente na Unidade de Reumatologia Pediátrica do Instituto da Criança (ICr) – Hospital das Clínicas (HC) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). A admissão no estudo foi realizada após a assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para pacientes (Anexo 1). Foram excluídos pacientes sem diagnóstico definido de LES ou em vigência de processos infecciosos graves. A média de idade na apresentação da doença foi de 9,8 anos, a média de tempo de seguimento foi de 4 anos e a média de idade à época do estudo foi de 14,4 anos. A relação feminino: masculino encontrada foi de 5,2:1.

Um estudo de corte transversal foi realizado. As amostras de sangue coletadas para a pesquisa dos anticorpos antinucleossomo e anti-DNA foram realizadas por ocasião das consultas rotineiras dos pacientes no ambulatório de reumatologia pediátrica ou durante suas internações hospitalares.

Os resultados desta casuística foram comparados à frequência dos anticorpos antinucleossomo e dos anticorpos anti-DNA em uma população de 64 crianças e adolescentes saudáveis, com média de idade de 14,7 anos e relação feminino:masculino de 2:1. Os controles foram provenientes do ambulatório de adolescentes do ICr – HC – FMUSP, do grupo de aprendizes do projeto CAMP (centro de aprendizagem e monitoramento profissional) em estágio no ICr e por parentes dos funcionários do mesmo Instituto. Para a participação no estudo, houve a necessidade de se assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para casos controles (Anexo 2). Foram excluídas aquelas crianças e adolescentes portadores de doenças auto-

imunes, infecções ou gestação atuais.

3.2 TESTES LABORATORIAIS

O material coletado foi enviado para o Laboratório de Pesquisa Experimental do Instituto de Ensino e Pesquisa Albert Einstein e o método utilizado para a pesquisa destes anticorpos foi o ensaio imunoenzimático - ELISA (BURLINGAME et al, 1994).

O ensaio imunoenzimático para a detecção dos anticorpos antinucleossomo (INOVA[®]) utiliza como substrato antígenos de nucleossomo purificado recobrando cada cavidade da placa. São utilizados 100µl dos controles positivos e negativos pré-diluídos e 100µl dos soros testados, estes últimos diluídos na proporção de 1:101 (5µl do soro acrescido de 500µl do diluente). Os soros são testados em duplicata, sendo a placa incubada por 30 minutos à temperatura ambiente. Após a aspiração do conteúdo, cada cavidade da placa é lavada com 200 a 300µl da solução de lavagem HRP, diluída com água destilada na proporção de 1:40. O procedimento é repetido três vezes, secando a placa ao final. São então acrescentados 100µl do conjugado IgG HRP (IgG de cabra anti-IgG humana) a cada cavidade e são repetidos os passos de incubação e lavagem. Ao final, são adicionados 100µl do cromógeno TMB e a placa é incubada por mais 30 minutos à temperatura ambiente, protegida da luz, quando a reação é interrompida com 100µl da solução de parada HRP (ácido sulfúrico 0.344M), agitando-se a placa. A leitura da densidade óptica (OD) é feita imediatamente a 450nm, sendo calculada a média de cada duplicata. A transformação de OD para unidades arbitrárias (Ua) é calculada dividindo-se a OD da amostra testada pela OD do controle positivo baixo e então se multiplica o resultado pelo valor do controle positivo baixo, estabelecido no teste comercial, que é de 25 unidades. O teste é considerado positivo quando igual ou maior que 20Ua.

Os mesmos soros foram encaminhados para o Laboratório de

Imunologia do Instituto Central do Hospital das Clínicas – FMUSP para serem submetidos à pesquisa do anticorpo anti-DNA, através do ensaio imunoenzimático - ELISA (BURLINGAME et al, 1994).

O teste para a detecção dos anticorpos anti-DNA (Hemagen[®]) utiliza, como substrato, o antígeno DNA nativo purificado, aderido à superfície interna de cada cavidade da placa. São utilizados 100µl dos controles positivos e negativos e dos soros testados diluídos na proporção de 1:26 (10µl do soro acrescidos de 250µl do diluente), em duplicata, sendo a placa incubada por 45 minutos à temperatura ambiente. O conteúdo de cada cavidade é desprezado e lavado quatro vezes com 250 a 350µl da solução de lavagem PBS diluída em água destilada, secando-se a placa ao final. São então acrescentados 100µl do conjugado HRP (IgG de cabra anti-IgG humana) a cada cavidade. A placa é incubada por 30 minutos à temperatura ambiente e então são repetidos os passos da lavagem. Ao final são adicionados 100µl do cromógeno TMB e a placa é incubada por mais 10 minutos à temperatura ambiente, quando a reação é interrompida com 50µl da solução de parada (ácido sulfúrico 1N), agitando-se a placa. A leitura da OD é feita imediatamente a 450nm. O teste é considerado positivo quando igual ou maior que 50 unidades internacionais (UI). Para transformar as OD em UI, é estabelecido um fator comum. Este é obtido dividindo-se a UI dos três calibradores fornecidos pelo teste comercial pela OD dos respectivos calibradores e calculando-se a média.

3.3 CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E LABORATORIAL DA POPULAÇÃO ESTUDADA

A avaliação das características clínicas e laboratoriais da doença foi feita com base na análise retrospectiva dos prontuários de cada paciente lúpico, desde a admissão no serviço até o momento do estudo (Anexos 3 e 4). A avaliação incluiu a presença de:

- 1) Características demográficas: sexo, idade no início da doença, tempo de seguimento e idade no momento do estudo.
- 2) Comprometimento renal:
- 3) Parâmetros laboratoriais: sedimento urinário com hematúria maior que 3.000/ml, leucocitúria maior que 7.000/ml, presença de cilindros granulosos ou hemáticos, proteinúria maior que 4mg/kg/dia ou maior que 200mg/dia, alteração da função renal com uréia maior que 42 mg/dl ou creatinina maior que 0,9 mg/dl e presença de insuficiência renal aguda ou crônica estabelecida por clearance de creatinina menor que 70 ml/min/1,73m², calculado através da fórmula de Schwartz.
- 4) Parâmetros histológicos: biópsia renal, utilizando-se a classificação estabelecida pela OMS.
- 5) Comprometimento do sistema retículo-endotelial: adenomegalia difusa e/ou hepatoesplenomegalia.
- 6) Envolvimento mucocutâneo: eritema malar, fotossensibilidade, lúpus discóide, lúpus subagudo, eritema palmo-plantar, púrpuras, úlceras e outras vasculites, livedo reticular, alopecia e úlceras de mucosa oral, nasal ou genital.
- 7) Comprometimento músculo-esquelético: artrites, miosites, osteonecrose, osteoporose e presença de fraturas patológicas.
- 8) Envolvimento cardíaco: pericardite, miocardite, valvulite, disfunção ventricular, insuficiência cardíaca congestiva, angina ou infarto agudo do miocárdio.
- 9) Comprometimento pulmonar: pleurite, pneumonite intersticial ou hemorragia pulmonar.
- 10) Comprometimento neurológico: neurite periférica, parestesia, cefaléia persistente, distúrbio de comportamento, psicose, coréia, mielite transversa, acidente vascular cerebral isquêmico, isquêmico transitório ou hemorrágico.

- 11) Envolvimento ocular: hemorragia retiniana, uveíte, episclerite, neurite óptica, catarata, glaucoma ou pigmentação retiniana.
- 12) Envolvimento gastrintestinal: vasculite, hemorragia, gastrite.
- 13) Comprometimento hematológico evidenciado em pelo menos duas ocasiões: anemia hemolítica confirmada por reticulocitose maior que 1,5%, elevação dos níveis séricos de DHL (maior que 645U/l), elevação de bilirrubina indireta (maior que 0,6mg/dl) ou coombs positivo; leucopenia menor que 4.000/mm³; linfopenia menor que 1.500/mm³; plaquetopenia menor que 100.000/mm³.
- 14) Diminuição dos níveis séricos das frações C3 e C4 do complemento (menores que 0,5 g/l e 0,1 g/l, respectivamente).
- 15) Presença de fator anti-núcleo (técnica de Hep-2), anti-DNA, anti-ENA (ELISA), anticardiolipina IgM ou IgG (ELISA) e anticoagulante lúpico (dRVVT).

O dano cumulativo foi também avaliado pela análise retrospectiva dos prontuários, utilizando-se o instrumento intitulado *Systemic Lupus International Collaborating Clinics/ACR Damage Index* (SLICC/ACR-DI) (GLADMAN et al. 1996) (anexo 5). Este é um escore validado para o LES Juvenil e foi realizado apenas nos pacientes que apresentavam duração da doença acima de seis meses. Valor do SLICC/ACR-DI maior ou igual a “um” foi considerado como dano cumulativo do LESJ. O Dano cumulativo corresponde à mudança irreversível, não relacionada com inflamação ativa, proporcionada pela doença, medicamentos utilizados, etc.

A atividade do LES e o tratamento medicamentoso recebido foram aferidos por ocasião da dosagem laboratorial para a pesquisa dos anticorpos antinucleossomo. Para a quantificação da atividade da doença, foram utilizados o valor da velocidade de hemossedimentação (VHS) pelo método de Wintrobe (em mm/1ªhora), o nível sérico das frações C3 e C4 do complemento e o escore de atividade denominado *Systemic Lupus*

Erythematosus Disease Activity Index (SLEDAI) (BOMBARDIER et al. 1992) (anexo 6). Este índice, validado para a faixa etária pediátrica (BRUNNER et al, 1999), avalia manifestações clínicas e laboratoriais de início recente (últimos 10 dias). Valores de SLEDAI maiores ou iguais a dez foram considerados, arbitrariamente, como doença intensamente ativa.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A avaliação da concordância entre a positividade dos testes antinucleossomo e anti-DNA foi realizada através dos testes de Kappa e McNemar. As médias de idade no início da doença, tempo de seguimento, idade atual nos grupos com anticorpo antinucleossomo positivo e negativo foram comparadas através do teste t para grupos não emparelhados. A associação da positividade do anticorpo antinucleossomo com manifestações clínico-laboratoriais foi avaliada através do teste de Fisher. O teste de Kolmogorov Smirnov foi utilizado para avaliar a normalidade da distribuição dos resultados de VHS. A comparação entre as medianas de VHS, SLEDAI e SLICC/ACR-DI nos grupos com anticorpos antinucleossomo positivos e negativos foi estudada através do teste de Mann-Whitney.

As correlações entre os indicadores de atividade da doença (VHS e frações C3 e C4 do complemento) e o título dos anticorpos antinucleossomo foram avaliadas utilizando-se o coeficiente de correlação de Pearson. Para a correlação entre o escore de SLEDAI e o título dos anticorpos antinucleossomo foi utilizado o coeficiente de correlação de Spearman. A correlação entre o escore de dano cumulativo (SLICC/ACR-DI) e o título destes anticorpos também foi realizada através do coeficiente de correlação de Spearman. Estas correlações também foram estudadas em relação ao título dos anticorpos anti-DNA. Em todos os testes estatísticos se utilizou o nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

4. RESULTADOS

4.1 ANTICORPOS ANTINUCLEOSSOMO E COMPARAÇÃO COM ANTICORPOS ANTI-DNA

Foram estudados 74 pacientes lúpicos. A média de idade na apresentação da doença foi de 9,8 anos (variação de 1,2 a 15,8 anos) e a média de tempo de seguimento foi de 4 anos (variação de 0 a 11,6 anos). A média de idade à época do estudo foi de 14,4 anos (variação de 7,9 a 21,3 anos) e a relação feminino: masculino encontrada foi de 5,2:1.

No corte transversal realizado nesta população, os anticorpos anti-DNA foram encontrados em 54% dos pacientes (40/74) e os anticorpos antinucleossomo em 52,7% (39/74). A distribuição destes anticorpos na casuística estudada está representada no Gráfico 1. A discordância encontrada entre os dois testes foi de 25,7%: anticorpos antinucleossomo positivos e anti-DNA negativos em 9 casos (12,2%) e anticorpos anti-DNA positivos e antinucleossomo negativos em 10 casos (13,5%). A concordância entre os dois ensaios foi observada em 74,3% dos casos, sendo 30 pacientes positivos para os dois exames e 25 pacientes negativos para ambos. O teste Kappa verificou concordância de moderada intensidade entre os dois testes (0,484), estatisticamente significativa ($p < 0,001$). Comparando os resultados através dos pares discordantes (teste de McNemar) verificou-se que a discordância entre os testes não foi estatisticamente significativa.

Gráfico 1: Distribuição dos anticorpos antinucleossomo e dos anticorpos anti-DNA em 74 pacientes portadores de lúpus eritematoso sistêmico juvenil.

O grupo controle foi formado por 64 indivíduos saudáveis. A média de idade à época do estudo foi de 14,7 anos (variação de 2,1 a 21,6 anos) e a relação feminino: masculino encontrada foi de 2:1. O anticorpo antinucleossomo foi encontrado em um dos controles estudados (1,56%), conferindo ao teste sensibilidade de 52,7%, especificidade de 98,4%, valor preditivo positivo de 97,5% e valor preditivo negativo de 64,3%. Neste controle com resultado positivo, o título do anticorpo antinucleossomo foi de 20,6Ua. A média do título dos anticorpos antinucleossomo foi de 32Ua nos pacientes lúpicos e de 9,7Ua nos controles. A distribuição do título dos anticorpos antinucleossomo nos grupos de casos e de controles está representada no Gráfico 2. O anticorpo anti-DNA foi encontrado em 3 dos 64 controles saudáveis estudados. A distribuição do título dos anticorpos anti-DNA nos grupos de casos e de controles está representada no Gráfico 3.

Gráfico 2: Distribuição do título dos anticorpos antinucleossomo no grupo de 74 pacientes portadores de lúpus eritematoso sistêmico juvenil e no grupo de 64 controles saudáveis.

Gráfico 3: Distribuição do título dos anticorpos anti-DNA no grupo de 74 pacientes portadores de lúpus eritematoso sistêmico juvenil e no grupo de 64 controles saudáveis.

Os anticorpos antinucleossomo e anti-DNA apresentaram resultados semelhantes em relação à sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo (Tabela 3).

Tabela 3: Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo dos anticorpos antinucleossomo e anti-DNA estudados em um grupo de 74 pacientes portadores de lúpus eritematoso sistêmico juvenil e 64 controles saudáveis.

Característica	Anticorpo antinucleossomo (%)	Anticorpo anti-DNA (%)
Sensibilidade	52,7	54
Especificidade	98,4	95,3
Valor preditivo positivo	97,5	93
Valor preditivo negativo	64,3	64,2

Uma correlação moderada ($r=0,406$) estatisticamente significativa ($p<0,001$) entre os títulos dos anticorpos antinucleossomo e os títulos dos anticorpos anti-DNA foi também observada (Gráfico 4).

Gráfico 4: Correlação entre o título dos anticorpos antinucleossomo e o título do anticorpo anti-DNA em 74 pacientes portadores de lúpus eritematoso sistêmico juvenil.

4.2 ANTICORPOS ANTINUCLEOSSOMO E DADOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS

O grupo de pacientes com LES juvenil foi dividido em relação a positividade dos anticorpos antinucleossomo, sendo encontrados 39 pacientes positivos para o teste e 35 pacientes negativos. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre as médias de idade de início da doença, tempo de seguimento, idade atual e relação feminino:masculino (Tabela 4).

Tabela 4: Dados demográficos de 74 pacientes portadores de lúpus eritematoso sistêmico juvenil e positividade dos anticorpos antinucleossomo.

Variável analisada	Anticorpos antinucleossomo		Teste t p
	positivos (n=39)	negativos (n=35)	
Idade de início em anos (média)	9,9	9,7	ns
Tempo seguimento em anos (média)	3,7	4,3	ns
Idade atual em anos (média)	14,2	14,7	ns
Relação F:M	5,5:1	4,8:1	ns*

ns= não significante; * teste de Fisher

Não foi observada associação da presença de anticorpos antinucleossomo com manifestações clínicas e alterações laboratoriais pregressas da doença, ou seja, desde o início do acompanhamento ambulatorial dos pacientes (Tabela 5), exceto em relação à presença prévia do anticorpo anti-DNA ($p=0,047$), que foi mais freqüentemente evidenciado no grupo de pacientes positivos para os anticorpos antinucleossomo.

Tabela 5: Manifestações clínicas e alterações laboratoriais pregressas em 74 pacientes com lúpus eritematoso sistêmico juvenil e positividade dos anticorpos antinucleossomo.

Manifestação clínica ou alteração laboratorial	Anticorpos antinucleossomo		Fisher p
	positivos (n=39) n (%)	negativos (n=35) n (%)	
Cutâneo	39 (100)	34 (97)	ns
Eritema malar	36 (92)	26 (74,3)	0,056
Fotossensibilidade	30 (77)	26 (74,3)	ns
Lúpus discóide	3 (7,7)	2 (5,7)	ns
Úlceras mucosas	31 (79)	21 (60)	ns
Neurológico	12 (30,7)	8 (22,8)	ns
Psicose	1 (2,5)	4 (11,4)	ns
Convulsão	2 (5)	5 (14,3)	ns
Serosas	16 (41)	14 (40)	ns
Pleurite	13 (33,3)	6 (17)	ns
Pericardite	13 (33,3)	9 (25,7)	ns
Artrite	31 (79)	27 (77)	ns
Renal	29 (74)	27 (77)	ns
Cilindrúria	15 (38,5)	11 (31,5)	ns
Proteinúria	28 (72)	22 (63)	ns
Hematológico	37 (95)	29 (83)	ns
Anemia hemolítica	21 (54)	15 (43)	ns
Leucopenia	20 (51)	14 (40)	ns
Linfopenia	32 (82)	25 (71,4)	ns
Plaquetopenia	10 (25,6)	12 (34,3)	ns
FAN positivo	39 (100)	35 (100)	ns
Anti-DNA positivo	38 (97)	29 (83)	0,047
Anti-Sm positivo	19 (48,7)	12 (34,3)	ns
Anticorpos antifosfolípidos	25 (64)	22 (63)	ns

FAN= fator anti-núcleo; ns= não significante

Em relação ao dano cumulativo (SLICC/ACR-DI), este foi calculado para 68 casos desta casuística, uma vez que seis pacientes estavam em seguimento há menos de seis meses. Não existiu associação entre a positividade dos anticorpos antinucleossomo e a mediana do SLICC/ACR-DI ($p=0,394$) ou entre positividade dos anticorpos antinucleossomo e SLICC/ACR-DI maior que 1 (Fisher, $p=0,235$). Também não se observou correlação entre o título dos anticorpos antinucleossomo e o escore de SLICC/ACR DI.

Em relação às manifestações clínicas e alterações laboratoriais da doença presentes à época da realização do presente estudo (Tabela 6), observou-se associação da presença dos anticorpos antinucleossomo com eritema malar ($p=0,003$), comprometimento hematológico ($p=0,022$), anemia hemolítica ($p=0,015$), presença de anticorpo anti-DNA ($p<0,001$) e diminuição dos níveis séricos das frações C3 e C4 do complemento ($p<0,001$).

Tabela 6: Manifestações clínicas e alterações laboratoriais atuais em 74 pacientes com lúpus eritematoso sistêmico juvenil e positividade dos anticorpos antinucleossomo.

Manifestação clínica ou alteração laboratorial	Anticorpos antinucleossomo		Fisher p
	positivos (n=39) n (%)	negativos (n=35) n (%)	
Febre	2 (5)	0 (0)	ns
Cutâneo	28 (72)	18 (51,4)	ns
Eritema malar	15 (38,5)	3 (8,6)	0,003
Fotossensibilidade	9 (23)	7 (20)	ns
Outras vasculites	5 (13)	0 (0)	0,056
Alopécia	6 (15,4)	3 (8,6)	ns
Úlceras mucosas	5 (13)	1 (2,8)	ns
Neurológico	1 (2,5)	0 (0)	ns
Psicose	1 (2,5)	0 (0)	ns
Pleurite e pericardite	1 (2,5)	0 (0)	ns
Artrite	1 (2,5)	2 (5,7)	ns
Miosite	1 (2,5)	2 (5,7)	ns
Renal	20 (51,3)	14 (40)	ns
Hematológico	24 (61,5)	12 (34,3)	0,022
Anemia hemolítica	9 (23)	1 (2,8)	0,015
Leucopenia	3 (7,7)	2 (5,7)	ns
Linfopenia	16 (41)	9 (25,7)	ns
Plaquetopenia	0 (0)	0 (0)	ns
Anti-DNA positivo	30 (77)	10 (28,5)	0,000
Anti-Sm positivo	13 (33,3)	5 (14,3)	ns
Anticorpos antifosfolípidos	11 (28,2)	4 (11,4)	ns
Complemento baixo	30 (77)	11 (31,4)	0,000

ns= não significante

A presença de anticorpos antinucleossomo não esteve associada a nenhum dos medicamentos utilizados pelos pacientes no momento do estudo, incluindo a prednisona (Tabela 7). Cada um dos medicamentos

micofenolato mofetil, dapsona e talidomida estavam sendo usados por apenas um paciente.

Tabela 7: Medicamentos utilizados à época do estudo em 74 pacientes portadores de lúpus eritematoso sistêmico juvenil e positividade dos anticorpos antinucleossomo.

Medicamento	Anticorpos antinucleossomo		Fisher p
	positivos (n=39) n (%)	negativos (n=35) n (%)	
Prednisona	37 (95)	33 (94,3)	ns
Anti-maláricos	33 (84,6)	28 (80)	ns
Azatioprina	4 (10,2)	4 (11,4)	ns
Metotrexato	3 (7,7)	3 (8,6)	ns
Ciclofosfamida (pulso)	6 (15,4)	1 (2,8)	ns
Ciclosporina	2 (5)	3 (8,6)	ns

ns= não significante

4.3 ANTICORPOS ANTINUCLEOSSOMO E COMPROMETIMENTO RENAL

Não foi evidenciada associação dos anticorpos antinucleossomo e dos anticorpos anti-DNA com manifestações renais pregressas ou atividade atual. Quando os pacientes foram divididos em grupos de anticorpos antinucleossomo e anti-DNA concordantes e discordantes, também não se observou associação com o comprometimento renal pregresso ou atividade atual (Tabelas 8 e 9).

Tabela 8: Associação dos anticorpos antinucleossomo e anti-DNA com o comprometimento renal pregresso e atividade atual em um grupo de 74 pacientes portadores de lúpus eritematoso sistêmico juvenil.

	Anticorpos antinucleossomo			Anticorpos anti-DNA		
	positivos (n=39)	Negativos (n=35)	Fisher p	Positivos (n=40)	negativos (n=34)	Fisher p
	n (%)	n (%)		n (%)	n (%)	
Comprometimento renal prévio	29 (74,3)	27 (77,1)	ns	30 (75)	26 (76,5)	ns
Atividade renal atual	20 (51,3)	14 (40)	ns	19 (47,5)	15 (44,1)	ns

ns = não significante

Tabela 9: Comprometimento renal prévio e atividade atual em um grupo de 74 pacientes portadores de lúpus eritematoso sistêmico juvenil em relação à presença de anticorpos antinucleossomo e anti-DNA concordantes e discordantes.

	Ambos anticorpos positivos (n=30) n (%)	Ambos anticorpos negativos (n=25) n (%)	Apenas anti-Ncs positivo (n=9) n (%)	Apenas anti-DNA positivo (n=10) n (%)	χ^2 p
Comprometimento renal prévio	23 (76,6)	20 (80)	6 (66,6)	7 (70)	ns
Atividade renal atual	15 (50)	10 (40)	5 (55,5)	4 (40)	ns

Ncs= nucleossomo; ns = não significante

Em relação às manifestações específicas da atividade renal atual, foi observada uma associação entre a positividade dos anticorpos antinucleossomo e a presença de leucocitúria ($p=0,014$), conforme demonstrado na Tabela 10. Os anticorpos anti-DNA não se associaram a nenhuma manifestação específica da atividade renal atual.

Tabela 10: Atividade renal atual e positividade dos anticorpos antinucleossomo em 74 pacientes portadores de lúpus eritematoso sistêmico juvenil.

Comprometimento renal	Anticorpos antinucleossomo		Fisher p
	positivos (n=39) n (%)	negativos (n=35) n (%)	
Hematúria	16 (41)	11 (31,4)	ns
Leucocitúria	11 (28,2)	2 (5,7)	0,014
Cilindrúria	4 (10,2)	0 (0)	ns
Proteinúria	7 (18)	4 (11,4)	ns
Elevação dos níveis de U/C	3 (7,7)	2 (5,7)	ns
Insuficiência renal aguda	0 (0)	0 (0)	ns

U= uréia; C= creatinina; ns= não significante

A biópsia renal foi realizada em 41 dos 74 pacientes lúpicos. Destes, 23 eram positivos para os anticorpos antinucleossomo e 18 negativos para o mesmo teste. Os pacientes foram classificados conforme a classe renal da OMS (Tabela 11). Observou-se associação inversa entre a presença deste anticorpo e a classe renal IV da OMS ($p=0,028$). Os anticorpos anti-DNA não apresentaram associação com a histologia renal.

Tabela 11: Classe histológica do comprometimento renal pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e positividade dos anticorpos antinucleossomo em 41 pacientes portadores de lúpus eritematoso sistêmico juvenil.

Classe histológica (OMS)	Anticorpos antinucleossomo		Fisher p
	positivos (n=23) n (%)	negativos (n=18) n (%)	
I	0 (0)	1 (5,5)	ns
II	6 (26)	2 (11)	ns
III	5 (21,7)	1 (5,5)	ns
IV	2 (8,7)	7 (38,8)	0,028
V	8 (34,8)	7 (38,8)	ns
VI	2 (8,7)	0 (0)	ns

ns= não significante

4.4 ANTICORPOS ANTINUCLEOSSOMO E ATIVIDADE DO LES

Indicadores de atividade da doença nos grupos com anticorpos antinucleossomo positivos e negativos foram comparados (Tabela 12). Analisando-se as distribuições dos dados de VHS nos dois grupos através do teste de Kolmogorov Smirnov verificou-se que elas não passaram no teste de normalidade e, portanto, precisaram ser comparadas através de suas medianas. Não houve diferença entre as medianas de VHS nos grupos com anticorpos antinucleossomo positivos e negativos ($p=0,5$), porém a mediana do escore de SLEDAI demonstrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos, sendo maior no grupo de pacientes com LES juvenil positivos para os anticorpos antinucleossomo ($p<0,001$). Existiu também uma associação estatisticamente significativa entre positividade dos anticorpos antinucleossomo e pontuação do SLEDAI acima de 10 (Fisher, $p<0,001$).

Tabela 12: Indicadores de atividade da doença e presença de anticorpos antinucleossomo em 74 pacientes portadores de lúpus eritematoso sistêmico juvenil.

Indicador de atividade	Anticorpos antinucleossomo		Mann-Whitney p
	positivos (n=39)	negativos (n=35)	
VHS (mediana)	17,5	19,9	ns
SLEDAI (mediana)	6,5	2	0,000
SLEDAI >10 (n / %)	13 / 33,3	0 / 0	0,000*

SLEDAI= *Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index*, ns = não significante;

*teste de Fisher

Ainda em relação à atividade da doença, pesquisou-se a correlação entre os níveis de VHS, escore de SLEDAI e níveis séricos das frações C3 e C4 do complemento com os títulos dos anticorpos antinucleossomo e anti-DNA. Observou-se uma fraca correlação ($r=0,231$) estatisticamente significativa ($p=0,048$) entre o valor de VHS e o título dos anticorpos

antinucleossomo (Gráfico 5). Não foi encontrada correlação estatisticamente significativa entre nível de VHS e o título dos anticorpos anti-DNA ($p=0,065$) (Gráfico 6). Foram encontradas correlações moderadas estatisticamente significantes ($p<0,001$) entre escore de SLEDAI e título dos anticorpos antinucleossomo e anti-DNA ($r_s=0,504$ e $r_s=0,426$, respectivamente) (Gráficos 7 e 8).

Gráfico 5: Correlação entre o títulos dos anticorpos antinucleossomo e VHS em 74 pacientes portadores de lúpus eritematoso sistêmico juvenil.

Gráfico 6: Correlação entre o títulos dos anticorpos anti-DNA e VHS em 74 pacientes portadores de lúpus eritematoso sistêmico juvenil.

Gráfico 7: Correlação entre o títulos dos anticorpos antinucleossomo e escore de SLEDAI em 74 pacientes portadores de lúpus eritematoso sistêmico juvenil.

Gráfico 8: Correlação entre o títulos dos anticorpos anti-DNA e escore de SLEDAI em 74 pacientes portadores de lúpus eritematoso sistêmico juvenil.

Notou-se uma correlação negativa moderada ($r=-0,422$) estatisticamente significativa ($p<0,001$) entre o nível sérico da fração C3 do complemento e o título dos anticorpos antinucleossomo (Gráfico 9). Não foi encontrada correlação estatisticamente significativa entre o nível sérico da fração C3 do complemento e o título dos anticorpos anti-DNA ($p=0,133$) (Gráfico 10). Observou-se correlação negativa de moderada a fraca intensidade entre o nível sérico da fração C4 do complemento e o título dos anticorpos antinucleossomo ($r=-0,338$; $p=0,003$) e de fraca intensidade em relação ao título dos anticorpos anti-DNA ($r=-0,250$; $p=0,031$) (Gráficos 11 e 12).

Gráfico 9: Correlação entre o nível sérico da fração C3 do complemento e o título dos anticorpos antinucleossomo em 74 pacientes portadores de lúpus eritematoso sistêmico juvenil.

Gráfico 10: Correlação entre o nível sérico da fração C3 do complemento e o título dos anticorpos anti-DNA em 74 pacientes portadores de lúpus eritematoso sistêmico juvenil.

Gráfico 11: Correlação entre o nível sérico da fração C4 do complemento e o título dos anticorpos antinucleossomo em 74 pacientes portadores de lúpus eritematoso sistêmico juvenil.

Gráfico 12: Correlação entre o nível sérico da fração C4 do complemento e o título dos anticorpos anti-DNA em 74 pacientes portadores de lúpus eritematoso sistêmico juvenil.

5 DISCUSSÃO

5.1 ANTICORPOS ANTINUCLEOSSOMO

Os critérios de classificação para o LES, desenvolvidos pelo ACR, em muito auxiliaram no diagnóstico mais precoce da doença. Porém, os critérios clínicos são inespecíficos, podendo ser encontrados em diversas outras patologias, inflamatórias ou não, possibilitando falsos diagnósticos. As revisões pelas quais os critérios passaram nos últimos anos, visaram aumentar sua precisão, através da introdução de testes laboratoriais mais específicos. É o caso da inserção dos anticorpos antifosfolípides (anticardiolipina e anticoagulante lúpico) dentro dos critérios sorológicos da doença, que contribuem tanto para o diagnóstico, quanto para o prognóstico do LES, uma vez que seleciona o grupo de pacientes com maior risco de desenvolver fenômenos trombóticos (HOCHBERG, 1997; CAMPOS et al, 2003a)

Existe, portanto, uma constante busca por novos exames laboratoriais cada vez mais específicos para o diagnóstico do LES. A partir deste ponto, o estudo dos anticorpos antinucleossomo surgiu como uma linha promissora. As evidências de que estes anticorpos estão relacionados à apoptose e à patogênese do LES, em especial da nefrite lúpica, sinaliza para sua utilidade diagnóstica e prognóstica (LICHT et al, 2001; BRUNS et al, 2000; DIEKER, van der VLAG, BERDEN, 2002; KEWALRAMANI, SINGH, 2002; KOUTOUZOV et al, 2004).

Nos últimos anos foram publicadas diversas pesquisas estudando a frequência, a sensibilidade e a especificidade desses anticorpos no LES e comparando estes dados em relação aos encontrados para os anticorpos anti-DNA, uma vez que estes últimos são, até o momento, considerados como os marcadores mais específicos da doença e de sua atividade (Tabela 13).

Tabela 13: Sensibilidade e especificidade dos anticorpos antinucleossomo e anti-DNA em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico.

Autores (n° de casos)	Antinucleossomo		Anti-DNA	
	Sens (%)	Espec (%)	Sens (%)	Espec (%)
Bruns et al, 2000 (136)	56	97	70	79
Schett et al, 2002 (73)	43	85	35	99
Min et al, 2002 (129)	76	98	80,6	nr
Cairns et al, 2003 (95)	64,2	98,8	51,6	98,2
Leser, Andrade, 2004 (54)	78	95	39	nr
Simón et al, 2004a (73)	100	97	63	95
Ghirardello et al, 2004 (101)	86,1	95,3	69,3	96
Média dos estudos anteriores	71,9	95,1	58,3	93,4
Campos LMA (este estudo)	52,7	98,4	54	95,3

Sens= sensibilidade; Espec= especificidade; nr= não realizado

Na literatura, observamos que os resultados referentes à sensibilidade dos anticorpos antinucleossomo variam de 43 a 100% (em média 71,9%), freqüentemente superior à encontrada para os anticorpos anti-DNA. Nesta casuística, os anticorpos antinucleossomo apresentaram sensibilidade de 52,7%, semelhante à encontrada para o anticorpo anti-DNA (54%).

As divergências entre os diferentes estudos são atribuídas a questões técnicas, como a qualidade do antígeno empregado no teste e o *cut-off* adotado (KOUTOUZOV et al, 2004). Por exemplo, Bruns et al, 2000 observaram sensibilidade de 56%, adotando um *cut-off* de 122Ua, aplicado a um teste de ELISA desenvolvido pelos próprios autores, enquanto que Ghirardello et al, 2004, encontraram 86,1% de sensibilidade, utilizando *cut-off* de 10U/ml em teste comercial comercial (ELISA). No presente estudo foi utilizado o *cut-off* de 20Ua, conforme sugerido pelo fabricante do teste comercial. Estas variações tornam difícil a comparação entre as publicações.

A especificidade encontrada para o anticorpo antinucleossomo foi bastante elevada (98,4%), a exemplo do observado na literatura (em média

95,1%) (Tabela 13). Apenas um dos casos controles foi positivo para o anticorpo antinucleossomo, com título de 20,6Ua, muito próximo ao valor de corte adotado (20Ua), demonstrando que, se por um lado este *cut-off* perde em sensibilidade, ganha em especificidade. O grupo controle adotado foi constituído de crianças e adolescentes normais e, portanto, esta especificidade diz respeito à comparação entre pacientes lúpicos e indivíduos sem qualquer patologia. Neste estudo, a especificidade do anticorpo não foi testada em relação a outras doenças auto-imunes. No entanto, BRUNS et al, 2000, observaram elevada especificidade para os anticorpos antinucleossomo (97%), mesmo quando o grupo controle era formado por indivíduos portadores de nove diferentes doenças reumáticas ou infecciosas.

Observa-se que a presença de anticorpos antinucleossomo em pacientes com SS ou DMTC também sofre influência de questões metodológicas, como o *cut-off* adotado para o teste ou de acordo com os isotipos ou subclasses pesquisados. GHIRARDELLO et al, 2004, utilizando *cut-off* de 10U/ml, encontraram anticorpos antinucleossomo em 22,8% dos casos de SS, porém a média dos títulos para estes anticorpos era de 11,5U/ml, muito inferior àquela observada nos pacientes lúpicos (57,2U/ml). Com o mesmo teste comercial, HMIDA et al, 2002, encontraram apenas 1,8% dos pacientes com SS positivos para os anticorpos antinucleossomo, ao adotar *cut-off* de 20Ua, como sugerido pelo fabricante. SATO et al, 2004 observaram que 82% dos pacientes com esclerodermia localizada (ScL) apresentavam anticorpos antinucleossomo IgG e/ou IgM. No entanto, os pacientes lúpicos foram positivos apenas para o isotipo IgG, em títulos muito superiores (média 94,8U/ml) aos encontrados nos pacientes portadores de ScL (média 28,5U/ml). Já AMOURA et al, 2000, encontraram o isotipo IgG em 71,7% dos pacientes lúpicos, 45,9% dos casos de SS e em 45% dos casos de DMTC, enquanto que o isotipo IgM foi observado em diversas doenças. Porém a subclasse IgG3 mostrou-se significativamente elevada nos pacientes com LES, quando comparada à observada nos pacientes com SS ou DMTC.

Apesar da polêmica existente em relação à positividade deste teste em outras doenças auto-imunes, discute-se que isto não comprometa sua utilidade

diagnóstica (GOETZ, 2002). Isso porque, na prática clínica, dificilmente a SS faz parte do diagnóstico diferencial do LES e, em relação à DMTC, o anticorpo antinucleossomo pode ser considerado como um marcador precoce do grupo de pacientes que desenvolverá sintomas da doença (LES).

5.2 COMPARAÇÃO ENTRE ANTICORPOS ANTINUCLEOSSOMO E ANTI-DNA

Entre os ensaios biológicos utilizados para o diagnóstico do LES, considera-se que a detecção dos anticorpos anti-DNA é altamente específica da doença, sendo usada como padrão ouro. No entanto, este anticorpo é negativo em 20 a 40% dos pacientes. Ao se estudar o comportamento dos anticorpos antinucleossomo no LES, torna-se importante comparar seus resultados em relação aqueles encontrados com anticorpos anti-DNA.

Neste estudo, os anticorpos antinucleossomo e os anticorpos anti-DNA apresentaram resultados semelhantes em relação a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo (Tabela 3). Apenas um controle apresentou anticorpo antinucleossomo positivo, próximo ao valor de corte (20,6Ua), enquanto três dos 64 controles saudáveis apresentaram resultados positivos para o anticorpo anti-DNA, sendo dois deles também bastante próximos ao *cut-off* (valores de 51 e 52U/ml).

A discordância de 25,7% observada entre os anticorpos antinucleossomo e anti-DNA (12,2% dos casos foram positivos apenas para o anticorpo antinucleossomo e 13,5% foram positivos apenas para o anticorpo anti-DNA) está de acordo com o observado na literatura (em média 26,5%). No entanto, nos estudos publicados, existe uma predominância de pacientes positivos apenas para anticorpos antinucleossomo em relação a pacientes positivos apenas para o anticorpo anti-DNA (Tabela 1).

Podemos citar diversos exemplos que salientam a discordância entre os anticorpos antinucleossomo e anti-DNA. CAIRNS et al, 2003, em uma população de 95 pacientes lúpicos, encontraram que 21% dos casos eram

positivos apenas para anticorpos antinucleossomo; MIN et al, 2002, estudaram 129 pacientes com LES, 19% negativos para os anticorpos anti-DNA e destes últimos, 60% apresentavam anticorpos antinucleossomo positivos.

Partindo de uma população de 1696 pacientes portadores de doenças auto-imunes (suspeitas ou confirmadas), os autores selecionaram 350 pacientes com anticorpos antinucleossomo positivos. Destes, 240 eram portadores confirmados de LES. Dos pacientes lúpicos, 17,9% eram negativos para o anticorpo anti-DNA (GHILLANI-DALBIN et al, 2003). Resultado semelhante foi observado neste estudo, uma vez que dos 39 pacientes lúpicos positivos para os anticorpos antinucleossomo, nove eram negativos para o anticorpo anti-DNA (23,1%).

Esta discordância é particularmente interessante, pois, em virtude da alta especificidade destes anticorpos para o LES, a detecção do anticorpo antinucleossomo em um paciente com suspeita da doença, especialmente se for um caso negativo para o anticorpo anti-DNA, poderia auxiliar na precocidade do diagnóstico. De acordo com as diferentes séries, a realização do teste para anticorpos antinucleossomo poderia elevar a sensibilidade laboratorial para a pesquisa da doença entre 7% e 52% (GOETZ, 2002; KOUTOUZOV et al, 2004).

A literatura também tem salientado que os anticorpos antinucleossomo apresentam comportamento semelhante ao anticorpo anti-DNA no que diz respeito à associação com o comprometimento renal e com a atividade da doença. Neste estudo, ambos os anticorpos estiveram associados à atividade da doença, mas nenhum dos dois se associou às manifestações renais, como será comentado em itens específicos mais adiante.

Tantas semelhanças em relação ao comportamento de ambos os anticorpos (sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo, associação com o comprometimento renal e correlação com a atividade da doença) podem ser interpretadas com bases fisiopatológicas. Os estudos sugerem que os nucleossomos provenientes do processo apoptótico poderiam estimular a ativação de células T e B específicas para

nucleossomos e também, pelo processo de *epitope spreading*, outras linhagens capazes de produzir diferentes auto-anticorpos, como o anti-DNA. As pesquisas indicam que, cronologicamente, os anticorpos antinucleossomo seriam os primeiros a serem formados, seguidos da formação dos demais auto-anticorpos contra outros antígenos da cromatina. Também sugerem que o depósito renal de nucleossomos permitiria a formação de imunocomplexos locais, através da ligação destes antígenos com outros auto-anticorpos, como o anti-DNA, por reação cruzada (BERDEN et al, 2002; KOUTOUZOV et al, 2004).

Uma vez que a formação destes anticorpos está relacionada entre si e, fisiopatologicamente, sua produção está correlacionada a maior atividade da doença, seria de se supor que estes anticorpos apresentassem forte correlação, como de fato foi evidenciado neste estudo. Os títulos dos dois anticorpos apresentaram correlação positiva estatisticamente significativa ($r=0,406$; $p<0,001$). Outros estudos já haviam observado esta correlação, de modo muito semelhante (BRUNS et al, 2000; MIN et al, 2002; CAIRNS et al, 2003; GHIRARDELLO et al, 2004), demonstrando que a expressão dos dois anticorpos está interligada (GHILLANI-DALBIN et al, 2003).

5.3 ANTICORPOS ANTINUCLEOSSOMO E DADOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS

Em relação aos dados demográficos, não houve diferença entre o grupo de pacientes positivos e negativos para os anticorpos antinucleossomo, no que diz respeito à idade de início da doença, idade no momento do estudo, relação feminino:masculino ou tempo de seguimento. SIMÓN et al, 2004a, demonstraram presença dos anticorpos antinucleossomo em 100% dos 73 pacientes lúpicos com diagnóstico recente (menos de um ano de seguimento). É provável que este achado se deva ao fato da população estudada apresentar elevados índices de atividade da doença e não ao tempo de seguimento.

A presença dos anticorpos antinucleossomo não foi associada a qualquer manifestação clínica ou laboratorial pregressa (observada desde o início do acompanhamento dos pacientes até a realização do presente estudo), exceto pela associação com a positividade de anticorpos anti-DNA ($p=0,047$). Em se tratando de um estudo de corte, e não de um estudo longitudinal, essa ausência de associação com manifestações prévias à dosagem do anticorpo poderia ser esperada. Já a associação com a positividade do anti-DNA pode ser explicada, uma vez que ambos os anticorpos ligam-se a epítomos da cromatina. Como citado anteriormente, a estimulação de células T específicas para nucleossomos é capaz de promover a produção de auto-anticorpos antinucleossomo, mas também estimular vários clones de células B, promovendo, na evolução do processo, a formação de outros auto-anticorpos, como anti-histona e anti-DNA, fenômeno conhecido como *epitope spreading* (KALIYAPEMURAL, MICHAELS, DATTA, 2002; KOUTOUZOV et al, 2004). De fato, MIN et al, 2002, correlacionaram os títulos dos anticorpos antinucleossomo e anti-DNA coletados ao longo do seguimento de 129 pacientes lúpicos ($r=0,773$; $p<0,001$).

Também não foi observada associação e correlação entre a presença e o título dos anticorpos antinucleossomo e o dano cumulativo da doença (SLICC/ACR DI), conforme já relatado por GHIRARDELLO et al, 2004.

No entanto, quando foi estudada a associação dos anticorpos antinucleossomo com as manifestações clínicas e laboratoriais presentes no momento da coleta do soro, observou-se que estes anticorpos estiveram associados a diversas delas.

Do ponto de vista clínico, os anticorpos antinucleossomo estiveram associados ao eritema malar ($p=0,003$) e pode-se observar uma tendência de associação com vasculites cutâneas em outras localizações ($p=0,056$). Em estudo publicado em 2003, foi evidenciada, pela primeira vez, a deposição de antígenos nucleossomais na membrana basal da epiderme de pacientes lúpicos com nefrite ativa, demonstrando que a ligação de auto-anticorpos mediada por nucleossomos ao heparan sulfato da membrana basal ocorre em

outros locais do organismo, além dos glomérulos. O processo inflamatório decorrente da deposição de imunocomplexos locais, resultou em lesões de descontinuidade no heparan sulfato, evidenciadas à biópsia de pele (GROOTSCHOLTEN et al, 2003). A publicação de SIMÓN et al, 2004a, demonstrou a associação dos anticorpos antinucleossomo não apenas a manifestações renais, mas também ao eritema malar, úlceras orais e artrites.

Foi observada também a associação dos anticorpos antinucleossomo com o comprometimento hematológico ($p=0,022$), em especial com anemia hemolítica ($p=0,015$). Nos últimos anos, outros autores fizeram esta mesma constatação com o comprometimento hematológico. BENUCCI et al, 2003, observaram a associação destes anticorpos a baixos níveis de hemoglobina ($p<0,02$), além da associação com outros indicadores de atividade da doença (ECLAM, comprometimento renal e diminuição dos níveis séricos das frações do complemento). Em outra publicação com 95 casos de LES, os títulos dos anticorpos antinucleossomo estiveram correlacionados aos títulos de anti-DNA, comprometimento renal e hematológico ($p=0,003$), em especial à linfopenia ($p<0,001$) (CAIRNS et al, 2003). Por fim, GHIRARDELLO et al, 2004, seguiram 101 pacientes lúpicos por dois anos e não constataram correlação dos títulos de anticorpos antinucleossomo com atividade da doença, dano cumulativo ou manifestações clínicas, incluindo o envolvimento renal, exceto pela correlação observada com o comprometimento hematológico ($p=0,03$).

Na literatura, a associação destes anticorpos com o comprometimento neurológico foi também relatada (BRUNS et al, 2000). Os autores observaram uma associação estatisticamente significativa entre anticorpos antinucleossomo e psicose lúpica ($p<0,02$). No presente estudo esta associação não foi observada.

Do ponto de vista laboratorial, vale ressaltar a associação observada entre anticorpos antinucleossomo e anti-DNA dosados concomitantemente ($p<0,001$), mais intensa do que aquela encontrada entre os mesmos anticorpos em relação aos dados pregressos (0,047). Ainda em relação às manifestações laboratoriais, os anticorpos antinucleossomo estiveram

associados à diminuição dos níveis séricos das frações C3 e C4 do complemento ($p < 0,001$). Estes dados sugerem a associação destes anticorpos à atividade da doença, uma vez que o anti-DNA e o nível sérico do complemento são parâmetros classicamente usados como indicadores de atividade do LES.

O tipo de tratamento recebido à época do estudo não interferiu na positividade do anticorpo, apesar de MASSA et al, 1994, em estudo com 22 crianças lúpicas, terem observado que o uso de corticosteróides e imunossupressores diminuiu o título dos anticorpos antinucleossomo, tornando-os comparáveis ao encontrado no grupo controle.

5.4 ANTICORPOS ANTINUCLEOSSOMO E COMPROMETIMENTO RENAL

Apesar da presença dos anticorpos anti-DNA ter sido apontada, nas últimas décadas, como o principal fator responsável pela nefrite lúpica, nos últimos anos surgiram dúvidas em relação ao seu papel patogênico (KEWALRAMANI, SINGH, 2002).

Por outro lado, evidências vêm sendo publicadas nos últimos anos a respeito da provável atuação dos nucleossomos, provenientes das células apoptóticas, como antígenos promordiais da nefrite lúpica. Os nucleossomos apresentam carga elétrica positiva, permitindo que os imunocomplexos formados com estes antígenos possam se depositar em estruturas da membrana basal glomerular com carga elétrica negativa, como o heparan sulfato. A ligação dos anticorpos anti-DNA no rim parece ser mediada pela presença de nucleossomos, por reação cruzada. (AMOURA, KOUTOUZOV, PIETTE, 2000; BERDEN et al, 2002; KOUTOUZOV et al, 2004). Estudos demonstraram a presença de nucleossomos e de anticorpos antinucleossomo no rim de pacientes e animais portadores de LES, antes do aparecimento de anticorpos anti-DNA, principalmente em casos de glomerulonefrite classe IV da OMS (van BRUGGEN et al, 1997a; BERDEN et al, 2002).

Essas pesquisas estimularam o estudo da associação dos anticorpos antinucleossomo com o comprometimento renal em pacientes portadores de LES. Desde 2000, diversas publicações confirmaram esta associação (BRUNS et al, 2000; SCHETT et al, 2002; MIN et al, 2002; BENUCCI et al, 2003; CAIRNS et al, 2003; CERVERA et al, 2003; SIMÓN et al, 2003 ; SIMÓN et al, 2004a ; SIMÓN et al, 2004b).

O estudo publicado por SCHETT et al, 2002, analisando o comportamento dos anticorpos anticromatina em pacientes lúpicos, demonstrou a correlação entre os anticorpos anti-DNA, anti-histona, antinucleossomo e anticromatina e proteinúria. SIMÓN et al, em 2004a, relataram a associação de altos títulos dos anticorpos antinucleossomo com hematúria e proteinúria. O mesmo grupo de autores, em outra publicação (SIMÓN et al, 2003), já haviam relatado a associação dos anticorpos antinucleossomo com o dano renal ($p < 0,0001$), assim como observaram que pacientes com nefropatia ($n=30$) apresentavam títulos de anticorpos mais elevados, quando comparados ao grupo sem nefropatia ($n=147$) ($p < 0,0001$). CAIRNS et al, 2003, também observaram que pacientes portadores de LES com comprometimento renal ($n=20$) apresentavam títulos mais elevados destes anticorpos quando comparados aos pacientes sem nefrite ($n=74$) (80,5U/ml versus 33U/ml, $p=0,012$).

No estudo publicado por MIN et al, 2002, o título dos anticorpos antinucleossomo foi maior no grupo com nefrite ($n=57$) do que no grupo sem nefrite ($n=72$), porém não apresentou diferença estatística. Estes autores observaram que dentre os pacientes negativos para o anticorpo anti-DNA, 32% apresentavam comprometimento renal, sendo todos positivos para os anticorpos antinucleossomo. Dos pacientes que eram negativos para ambos os anticorpos, nenhum evoluiu com nefrite, demonstrando, de um outro modo, a associação do anticorpo antinucleossomo com o quadro renal. No presente estudo, não foi observada diferença no título dos anticorpos antinucleossomo entre os grupos com e sem nefrite ativa ($n=34$ e $n=40$, respectivamente).

Neste estudo, não ocorreu associação dos anticorpos antinucleossomo e anti-DNA com o comprometimento renal prévio (desde o início do acompanhamento ambulatorial dos pacientes) ou com a atividade renal atual (à época do estudo), quando avaliado de modo geral. Quando analisadas as manifestações renais específicas atuais (hematúria, proteinúria, leucocitúria, cilindrúria, alteração da função renal ou insuficiência renal) foi observada a associação entre presença de anticorpos antinucleossomo e leucocitúria ($p=0,014$). Esta associação deve ser pouco valorizada, uma vez que não faz parte dos critérios diagnósticos da nefrite lúpica (HOCHBERG, 1997) e também porque a coleta de exame de urina em meninas (relação feminino:masculino no estudo foi de 5,2:1) nem sempre é realizada com a assepsia adequada, sendo frequentemente sujeita à contaminação por resíduos da pele ao redor da uretra.

Na tentativa de observar se a presença concomitante de ambos os anticorpos predisporia ao comprometimento renal, ou se algum deles, isoladamente, estaria mais associado a esta manifestação, foi estudada a associação dos anticorpos antinucleossomo e anti-DNA, concordantes e discordantes, com o envolvimento renal (Tabela 9), que, mais uma vez, não foi evidenciada.

Na literatura, um menor número de publicações falhou em relacionar a presença destes anticorpos com o envolvimento renal, como, por exemplo, no estudo de RAVIRAJAN et al, 2001, que analisou uma pequena casuística de 33 casos de LES. Estudo a respeito da presença de anticorpos anticromatina em 199 pacientes lúpicos observou a associação dos anticorpos anti-DNA e anti-histona, mas não dos anticorpos antinucleossomo, com o comprometimento renal (CORTÉS-HERNÁNDEZ et al, 2004). GHIRARDELLO et al, 2004, não conseguiram correlacionar a presença dos anticorpos antinucleossomo (valor de corte adotado de 10U/ml), nem dos anticorpos anti-DNA, ao envolvimento renal ou à atividade da doença. Também não observaram flutuação do título dos anticorpos durante o seguimento (média de três anos) dos 101 pacientes estudados.

Apesar das críticas já comentadas a respeito da única publicação pesquisando anticorpos anticromatina em crianças portadoras de LES (n=22), no referido estudo apenas os anticorpos anti-DNA estiveram associados ao comprometimento renal, mas não os anticorpos antinucleossomo ou anti-histona, (MASSA et al, 1994).

A associação entre anticorpos antinucleossomo e classe histológica renal da OMS também não apresenta um consenso na literatura. MIN et al, 2002, não observaram diferença entre a positividade ou o título destes anticorpos e a histologia renal. Por outro lado, já foi descrita a associação dos anticorpos antinucleossomo predominantemente com a forma ativa da glomerulonefrite proliferativa classe IV da OMS (CORTÉS-HERNÁNDEZ et al, 2004).

No presente estudo, a biópsia renal foi realizada em 41 dos 74 pacientes lúpicos, sendo que os anticorpos antinucleossomo e anti-DNA não apresentaram associação com a classe histológica, exceto pela associação negativa da presença dos anticorpos antinucleossomo com a classe IV da OMS ($p=0,028$). Neste ponto, deve ser salientado o aspecto retrospectivo da análise em relação à histologia renal. As biópsias foram realizadas em épocas diferentes, utilizando-se diferentes critérios de classificação, à medida que estes foram sendo revistos. É provável que diversos casos com formas membrano-proliferativas tenham sido classificados como classe V, o que possivelmente justifica a elevada frequência desta classe em nossa casuística (15/41 biópsias), quando comparada à literatura.

Vários fatores poderiam interferir no resultado dos diferentes estudos, como as técnicas laboratoriais utilizadas (purificação de antígenos), o valor de corte adotado, a população analisada (número de pacientes, atividade da doença, estudos de corte versus estudos longitudinais) e os critérios de comprometimento renal estabelecidos.

Estudos publicados a respeito das subclasses de anticorpos indicaram mais uma possibilidade para a aparente contradição, observada na literatura, em relação à associação dos anticorpos antinucleossomo e o

comprometimento renal. AMOURA et al, 2000, evidenciaram que apenas a subclasse IgG3 dos anticorpos antinucleossomo esteve correlacionada à nefrite lúpica ativa e à atividade da doença (SLEDAI), além de ser a única subclasse a apresentar elevação de seus títulos nos períodos de recidiva. Por outro lado, a subclasse IgG1 demonstrou um comportamento inverso ao da subclasse IgG3, pois apresentou tendência de correlação negativa com o escore de SLEDAI e seus títulos tenderam a diminuir nos momentos de ativação do LES. Já as subclasses de anti-DNA não demonstraram as mesmas características. O fato da maioria dos estudos dosar os anticorpos antinucleossomo da classe IgG, incluindo indiscriminadamente todas as suas subclasses, poderia estar influenciando nos resultados.

Tendo em vista que a maior parte da literatura associa os anticorpos antinucleossomo à patogênese e à atividade da nefrite lúpica, os argumentos utilizados para tentar compreender a ausência de associação no presente estudo poderiam ser divididos em duas etapas:

Em primeiro lugar, o melhor parâmetro para avaliar o comprometimento renal prévio é a biópsia. Para relacionar a presença destes anticorpos à classe histológica, seria necessário dosá-los à época da realização da biópsia renal. Uma vez que as duas análises foram realizadas em épocas distintas, o grande intervalo de tempo entre elas, a ampla terapia imunossupressora empregada no período e as mudanças na atividade da doença poderiam estar interferindo nos resultados.

Em segundo lugar, os parâmetros adotados para avaliar a atividade renal são, essencialmente, presenças de hematúria e proteinúria. Esses parâmetros são de fato muito expressivos quando analisados no início do acompanhamento dos pacientes. No caso deste estudo, onde os pacientes apresentavam seguimento há intervalos variáveis de tempo (em média 4 anos), a hematúria e a proteinúria poderiam estar se comportando como indicadores residuais de um comprometimento renal prévio, mais uma vez interferindo na análise dos resultados.

5.5 ANTICORPOS ANTINUCLEOSSOMO E A ATIVIDADE DO LES

Em relação à atividade do LES, pesquisou-se a associação e a correlação entre a presença e o título dos anticorpos antinucleossomo com: níveis de VHS, score de SLEDAI e níveis séricos das frações C3 e C4 do complemento. Esses resultados foram comparados aos encontrados em relação aos anticorpos anti-DNA.

A mediana de VHS não apresentou diferença entre os grupos com anticorpos antinucleossomo positivos e negativos. Apesar da VHS não ser considerada um bom parâmetro de avaliação da atividade da doença, observou-se uma fraca correlação ($r=0,231$) estatisticamente significativa ($p=0,048$) entre nível de VHS e título dos anticorpos antinucleossomo. Tal correlação não foi demonstrada em relação aos anticorpos anti-DNA ($p=0,065$).

Neste estudo, a presença dos anticorpos antinucleossomo foi associada à atividade da doença medida pelo escore de SLEDAI. Este escore foi escolhido para esta avaliação por estar validado para a faixa etária pediátrica (BRUNNER et al, 1999). O grupo de pacientes positivos para os anticorpos antinucleossomo apresentou mediana de SLEDAI bem superior àquela observada no grupo de pacientes com anticorpos negativos (6,5 e 2, respectivamente) ($p<0,001$). Quando foram selecionados os pacientes com SLEDAI superior a 10 pontos, indicativo de atividade mais intensa, pode-se observar que apenas o grupo com anticorpos positivos apresentou pacientes nestas condições (33,3%), diferença mais uma vez estatisticamente significativa ($p<0,001$).

Avaliando a correlação entre título de anticorpos antinucleossomo e SLEDAI, observou-se que os dois parâmetros apresentaram correlação moderada ($rs=0,504$), estatisticamente significativa ($p<0,001$), levemente superior à encontrada em relação aos anticorpos anti-DNA ($rs=0,426$).

Quanto às frações do complemento, parâmetro habitualmente utilizado como indicador de atividade no LES, os anticorpos antinucleossomo apresentaram correlação negativa moderada ($r=-0,422$) estatisticamente

significante ($p < 0,001$) com a fração C3 do complemento. O mesmo não foi observado em relação ao anticorpo anti-DNA ($p = 0,133$). Também foi demonstrada correlação negativa, de moderada à fraca intensidade, entre o nível sérico da fração C4 do complemento e o título dos anticorpos antinucleossomo ($r = -0,338$; $p = 0,003$) e de fraca intensidade em relação aos anticorpos anti-DNA ($r = -0,250$; $p = 0,031$).

De fato, a maior parte dos estudos publicados correlaciona os anticorpos antinucleossomo com a atividade da doença (MASSA et al, 1994; CHABRE et al, 1995; BRUNS et al, 2000; HORÁK et al, 2001; SCHETT et al, 2002; MIN et al, 2002; BENUCCI et al, 2003; CORTÉS-HERNÁNDEZ et al, 2004; SIMÓN et al, 2004a), analisada por diferentes parâmetros.

Para BRUNS et al, 2000, o título dos anticorpos antinucleossomo apresentou forte correlação, tanto com o escore de ECLAM, quanto com o escore de SLEDAI ($r = 0,7$). SCHETT et al, 2002 pesquisaram a correlação do título dos anticorpos anticromatina (anti-DNA, antinucleossomo e anti-histona) com a atividade do LES, utilizando o escore de ECLAM. Os três anticorpos estiveram correlacionados à atividade da doença, sendo mais intensa para o anticorpo anti-histona H1 ($r = 0,67$). Estudo semelhante observou maior correlação dos anticorpos antinucleossomo com o escore de SLEDAI ($r_s = 0,45$; $p < 0,0001$), quando comparados aos outros dois anticorpos (SIMÓN et al, 2004a).

Para o grupo de BENUCCI et al, 2003, os anticorpos antinucleossomo estiveram correlacionados com a atividade da doença pelo ECLAM e, como no presente estudo, apresentaram correlação negativa com os níveis séricos das frações do complemento. MIN et al, 2002 também observaram correlação destes anticorpos com o escore de SLEDAI ($r = 0,347$; $p < 0,001$) e correlação inversa com o nível sérico das frações do complemento (C3, $r = -0,471$, $p < 0,001$; C4, $r = -0,364$, $p < 0,001$). Os autores, que estudaram 129 casos de LES, também observaram essas correlações em relação ao anticorpo anti-DNA, com intensidade levemente menor, à semelhança do presente estudo.

Um menor número de estudos não conseguiu estabelecer a correlação entre anticorpos antinucleossomo e a atividade da doença (RAVIRAJAN et al, 2001; CAIRNS et al, 2003; GHIRARDELLO et al, 2004). Mais uma vez, vale ressaltar que a grande variação metodológica entre os diferentes estudos pode justificar essas disparidades, neste caso, em especial ao escore de atividade da doença adotado.

GHIRARDELLO et al, 2004 estudaram longitudinalmente 101 pacientes lúpicos e não observaram correlação entre os títulos dos anticorpos antinucleossomo (*cut-off* adotado 10U/ml), nem dos anticorpos anti-DNA, com a atividade da doença medida pelo escore de ECLAM. CAIRNS et al, 2003, avaliaram 95 casos da doença e também não observaram correlação entre o título dos anticorpos antinucleossomo (*cut-off* de 20U/ml) e a atividade da doença medida pelo SLAM e pelo valor de VHS.

Por fim, AMOURA et al, 2000, estudando as subclasses de IgG dos anticorpos antinucleossomo, notaram que apenas a subclasse IgG3 esteve correlacionada à atividade do LES medida pelo SLEDAI, enquanto que a subclasse IgG1 apresentou tendência à correlação inversa com a atividade da doença, demonstrando mais uma vez a importância do estudo das subclasses deste anticorpo.

5.6 ANTICORPOS ANTINUCLESSOMO: APLICAÇÕES FUTURAS

Em primeiro lugar, torna-se importante consolidar, na prática médica, a posição dos anticorpos antinucleossomo como um teste imunológico de grande valor no diagnóstico e no controle da atividade da doença. Como já foi observado em relação a outros testes laboratoriais de elevada especificidade, como os anticorpos antifosfolípides (HOCHBERG, 1997), é possível que também os anticorpos antinucleossomo sejam inseridos nos critérios de classificação do ACR.

As evidências, em modelos experimentais, de que os anticorpos antinucleossomo são os primeiros anticorpos a se formarem durante a patogênese do LES, antes mesmo aparecimento de qualquer outra manifestação sorológica ou clínica da doença (FISHER, EISENBERG, COHEN, 1988; MOHAN et al, 1993; AMOURA et al, 1994; BERDEN et al, 2002; KOUTOUZOV et al, 2004) foram reforçadas por estudos clínicos em pacientes lúpicos (BURLINGAME et al, 1994; CHABRE et al, 1995). SIMÓN et al, 2004c observaram que os anticorpos antinucleossomo estavam presentes em nove dos 18 pacientes com síndrome antifosfolípide (SAF) primária, na época do início da doença. Seis destes casos (67%) evoluíram para o diagnóstico de LES, após, em média, nove anos de seguimento. Os anticorpos anti-DNA foram detectados, nestes mesmos pacientes, apenas 2,7 anos antes do diagnóstico definitivo da doença (LES). Nenhum paciente antinucleossomo negativo desenvolveu LES. Estes fatos chamam a atenção para o possível valor preditivo dos anticorpos antinucleossomo, podendo ter utilidade diagnóstica em pacientes com suspeita de LES e em portadores de outras doenças auto-imunes, como púrpura trombocitopênica idiopática, anemia hemolítica auto-imune, SAF primária e DMTC.

Tendo em vista as relações destes anticorpos com a fisiopatologia da doença, alguns autores sugerem que o maior conhecimento a respeito dos nucleossomos e respectivos anticorpos abrirá caminho para futuras intervenções terapêuticas, como por exemplo, a possibilidade de modular, especificamente, a produção destes auto-anticorpos. A localização dos genes responsáveis pela produção destes anticorpos vem sendo pesquisada em camundongos. Também em modelos experimentais, vem se tentando restaurar a tolerância em relação aos nucleossomos, pela infusão endovenosa de peptídeos nucleossomais, com melhora no prognóstico renal. Por fim, a neutralização das cargas positivas dos imunocomplexos poderia ser um meio de impedir a deposição destes na membrana basal glomerular (SOBEL et al, 1999; KALIYAPERUMAL, MICHAELS, DATTA, 1999; AMOURA, KOUTOUZOV, PIETTE, 2000; KALIYAPERUMAL, MICHAELS, DATTA, 2002; KOUTOUZOV et al, 2004).

6. CONCLUSÕES

- 1) A frequência, sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo dos anticorpos antinucleossomo foram semelhantes aos encontrados para os anticorpos anti-DNA. No entanto, a discordância de 25,7% observada entre os dois anticorpos sugere que os dois testes possam ser complementares em termos diagnósticos.
- 2) Os anticorpos antinucleossomo estiveram associados a manifestações clínicas, como eritema malar e comprometimento hematológico, especialmente em relação à anemia hemolítica, e não estiveram associados ao comprometimento renal.
- 3) Em relação à atividade da doença, os anticorpos antinucleossomo correlacionaram-se ao escore de SLEDAI e apresentaram correlação negativa com o nível sérico das frações C3 e C4 do complemento, comparável ao observado em relação aos anticorpos anti-DNA.
- 4) Os resultados deste estudo sugerem que os anticorpos antinucleossomo desempenham papel importante no diagnóstico e na avaliação da atividade do LES juvenil, assumindo especial relevância no grupo de pacientes negativos para os anticorpos anti-DNA.

7. ANEXOS

ANEXO 1

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PACIENTES
(Instruções para preenchimento no verso)

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE :.....
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.)
DOCUMENTO DE IDENTIDADE :SEXO: M F
DATA NASCIMENTO.:/...../.....
ENDEREÇO:Nº APTO:
BAIRRO:CIDADE:
CEP: TELEFONE: DDD (.....).....

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Anticorpos antinucleossomo em
pacientes com lupus eritematoso sistêmico juvenil
2. PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Profa. Dra. Maria Helena B. Kiss
CARGO/FUNÇÃO: Professora da Pós Graduação

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº .15.707

UNIDADE DO HCFMUSP: Departamento de Pediatria – Instituto da Criança

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO	RISCO MÍNIMO X	RISCO MÉDIO
RISCO BAIXO	RISCO MAIOR	

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

4.DURAÇÃO DA PESQUISA : .1 ano

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA, CONSIGNANDO:

1. Como já lhe foi falado, seu filho(a) tem uma doença chamada lúpus eritematoso sistêmico, que faz com que seu organismo produza vários anticorpos. Estamos estudando a presença de um anticorpo nestes pacientes, chamado anticorpo antinucleossomo. Acredita-se que este anticorpo esteja presente apenas em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico. Caso isto seja comprovado, a pesquisa deste anticorpo ajudará muito no diagnóstico de novos casos da doença. Acredita-se ainda que, nos pacientes lúpicos, a presença deste anticorpo ajuda a identificar os pacientes com maior risco de comprometimento renal da doença, auxiliando, portanto, na identificação dos casos mais graves.
2. Por ocasião de uma consulta de rotina de seu filho(a) no ambulatório de reumatologia pediátrica, será coletada uma amostra de sangue para a pesquisa do anticorpo antinucleossomo.
3. O procedimento de coleta de sangue é igual ao da coleta dos exames de rotina periodicamente realizados em seu filho(a) durante o seguimento de sua doença. O sangue é coletado com seringas e agulhas que são utilizadas apenas uma vez (descartáveis), de uma veia sob a pele e em pequena quantidade. No local da picada da agulha, ele(a) poderá sentir um pouco de dor (pequena) e às vezes pode aparecer uma mancha roxa que sumirá sozinha após alguns dias.
4. Benefícios que poderão ser obtidos – A comprovação de que os anticorpos antinucleossomo são específicos para pacientes lúpicos e de que está associado ao envolvimento renal, ajudará no diagnóstico de novos casos de lúpus eritematoso sistêmico e na determinação da gravidade da doença.

5. Procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo.- Não se aplica

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA:

1. O paciente e seus pais ou representantes legais terão acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para elucidar eventuais dúvidas.
 2. O senhor(a) tem a liberdade de não deixar que seu filho(a) participe da pesquisa ou de retirar seu consentimento a qualquer momento. Ele(a), assim mesmo, receberá o tratamento mais adequado para sua doença, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.
 3. Apenas a equipe médica envolvida neste estudo terá acesso aos dados relativos à pesquisa, mantendo-os em sigilo. Os pais ou responsáveis legais tem o direito de serem informados dos resultados relativos ao seu filho(a) sempre que desejarem.
 4. Disponibilidade de assistência no HCFMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa -

Não se aplica.
 5. Viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa.-
Não se aplica.
-

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Dra Lúcia Maria Mattei de Arruda Campos

Unidade de Reumatologia do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Rua Enéas de Carvalho Aguiar, 647. Cerqueira Cesar, São Paulo - SP

CEP: 05403-900

Telefone: (011) 3069-8510 ou 30698675

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa

São Paulo, de de 2.....

assinatura do sujeito da pesquisa
ou responsável legal

assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome Legível)

ANEXO 2:**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA CASOS
CONTROLES**

1. NOME DO PACIENTE :.....
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.).....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M F
DATA NASCIMENTO.:/...../.....
ENDEREÇO: Nº APTO:
BAIRRO:CIDADE:
CEP: TELEFONE: DDD (.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Anticorpos antinucleossomo em
pacientes com lúpus eritematoso sistêmico juvenil

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Profa. Dra. Maria Helena B. Kiss

CARGO/FUNÇÃO: Professora da Pós Graduação

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº .15.707

UNIDADE DO HCFMUSP: Departamento de Pediatria – Instituto da Criança

O lúpus eritematoso sistêmico é uma doença reumática que também pode afetar crianças e adolescentes e faz com que o organismo produza vários anticorpos. Estamos estudando a presença de um anticorpo nestes pacientes, chamado anticorpo antinucleossomo. Acredita-se que este anticorpo esteja presente apenas em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico, sendo negativo em crianças e adolescentes normais. Caso isto seja comprovado, a dosagem deste anticorpo ajudará a tornar mais precoce o diagnóstico de novos casos desta grave doença, melhorando seu prognóstico.

Para tal, solicitaremos a vocês a coleta de uma amostra de 5 ml de sangue para a pesquisa do anticorpo antinucleossomo. O procedimento de coleta de sangue é igual ao da coleta dos exames de rotina periodicamente realizados por vocês. O sangue é coletado com seringas e agulhas que são utilizadas apenas uma vez (descartáveis), de uma veia sob a pele e em pequena quantidade. No local da picada da agulha, pode-se sentir um pouco de dor (pequena) e às vezes pode aparecer uma mancha roxa (hematoma) que desaparece sozinha após alguns dias.

Vocês, seus pais ou representantes legais serão informados do resultado deste exame e em caso positivo serão avaliados pelo reumatologista responsável pela pesquisa. Apenas a equipe médica envolvida neste estudo terá acesso aos dados relativos à pesquisa, mantendo-os em sigilo.

Vocês têm a liberdade de participar ou não deste estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade de seu atendimento neste serviço.

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa

São Paulo, de de 2.....

assinatura do sujeito da pesquisa
ou responsável legal

assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome Legível)

ANEXO 3:

**AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E LABORATORIAIS DA
DOENÇA FEITA COM BASE NA ANÁLISE RETROSPECTIVA DOS
PRONTUÁRIOS**

DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

Nome:

Registro:

Data 1º atendimento:

Idade de início:

Idade no 1º atendimento:

Tempo de seguimento:

COMPROMETIMENTOS CLÍNICO-LABORATORIAIS:

Febre:	sim () não ()	
Perda de peso:	sim () não ()	
Alterações cutâneas:	sim () não ()	Quais:
Alopécia:	sim () não ()	
Eritema malar:	sim () não ()	
Fotossensibilidade:	sim () não ()	
Raynaud:	sim () não ()	
Lúpus discóide:	sim () não ()	
Úlceras de mucosas:	sim () não ()	
Alteração cardíaca:	sim () não ()	
Pericardite:	sim () não ()	
Alteração pulmonar:	sim () não ()	
Pleurite:	sim () não ()	
Hepatoesplenomegalia:	sim () não ()	
Linfoadenopatia:	sim () não ()	
Alteração ocular:	sim () não ()	
Artrites:	sim () não ()	
Miosite:	sim () não ()	
SNC:	sim () não ()	
Convulsão:	sim () não ()	
AVC:	sim () não ()	Tipo:

Distúrbio comportamento: sim () não ()
 Psicose: sim () não ()
 Coréia: sim () não ()
 Comprometimento renal: sim () não ()
 IRA: sim () não ()
 IRC: sim () não ()
 HAS: sim () não ()
 Edema: sim () não ()
 ↑ U/C: sim () não ()
 ↓ clearance: sim () não ()
 Leucocitúria: sim () não ()
 Hematúria: sim () não ()
 Cilindrúria: sim () não ()
 Proteinúria: sim () não ()
 Biópsia renal: sim () não ()
 Classe (Data):
 Tromboses: sim () não ()
 Anticardiolipina (IgM): sim () não ()
 Anticardiolipina (IgG): sim () não ()
 Anticoagulante lúpico: sim () não ()
 Síndrome antifosfolípide: sim () não ()
 FAN: sim () não ()
 Anti-DNA: sim () não ()
 SM/RNP/Ro/La: / / /
 C3/C4 (↓): sim () não ()
 Compr. hematológico: sim () não ()
 Anemia hemolítica: sim () não ()
 Leucopenia: sim () não ()
 Linfopenia: sim () não ()
 Plaquetopenia: sim () não ()
 Alteração tireoidiana: sim () não ()
 Alteração colest./triglic.: sim () não ()
 Outros:

SLICC/ACR DI: _____

ANEXO 4:**AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E LABORATORIAIS ATUAIS****DADOS EPIDEMIOLÓGICOS**

Data:

Nome:

Registro:

Idade atual:

Pressão arterial:

Peso/altura:

Medicamentos em uso / dose:

MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

Febre:	sim () não ()	
Perda de peso:	sim () não ()	
Alopécia:	sim () não ()	
Eritema malar:	sim () não ()	
Fotossensibilidade:	sim () não ()	
Vasculites:	sim () não ()	
Úlceras de mucosas:	sim () não ()	
Pericardite:	sim () não ()	
Pleurite:	sim () não ()	
Alteração ocular:	sim () não ()	
Hepatoesplenomegalia:	sim () não ()	
Linfoadenopatia:	sim () não ()	
Edema:	sim () não ()	
Artrites:	sim () não ()	
Miosite:	sim () não ()	
Convulsão:	sim () não ()	
AVC:	sim () não ()	Tipo:
Distúrbio comportamento:	sim () não ()	
Psicose:	sim () não ()	
Coréia:	sim () não ()	
Infecção atual:	sim () não ()	
Outros:		

MANIFESTAÇÕES LABORATORIAIS

HEMOGRAMA

Hb: Ht:

Leucócitos:

Diferencial (N/L):

Plaquetas:

Reticulócitos:

VHS: PCR:

EFP (alb/ α 2/ γ):

TGO/TGP:

U/C:

URINA TIPO 1

Leucócitos:

Hemáceas:

Cilíndros:

Proteinúria de 24hs/volume:

Clearance (altura):

FAN:

Anti-DNA:

SM/RNP/Ro/La: / / /

Anticardiolipina (IgM):

Anticardiolipina (IgG):

Anticoagulante lúpico:

Síndrome antifosfolípide:

C3/C4 ($\downarrow$):

SLEDAI:_____

ANEXO 5:

COLLABORATING CLINICS/ACR DAMAGE INDEX (SLICC/ACR-DI)

(GLADMAN et al. 1996)

Nome:.....

Data: __/__/____

Tempo de seguimento: _____

Pontuação	Item
	Ocular (qualquer olho, por avaliação clínica)
1 ()	Catarata em qualquer época
1 ()	Alteração retiniana <u>ou</u> atrofia óptica
	Neuropsiquiátrico
1 ()	Prejuízo cognitivo (p. ex. deficiência de memória, dificuldade com cálculo, dificuldade de concentração, dificuldade com linguagem escrita ou falada, prejuízo no nível de execução) <u>ou</u> Psicose
1 ()	Convulsões requerendo tratamento por 6 meses
1 () 2 ()	AVC em qualquer época (pontuar 2 se >1)
1 ()	Neuropatia craniana <u>ou</u> periférica (excluir óptica)
1 ()	Mielite transversa
	Renal
1 ()	Taxa de filtração glomerular medida ou estimada < 50%
1 ()	Proteinúria $\geq 3,5$ g/24h
	<u>ou</u>
3 ()	Insuficiência renal terminal (a despeito de diálise ou transplante)
	Pulmonar
1 ()	Hipertensão pulmonar (aumento de VD ou hiperfonese de B2)
1 ()	Fibrose pulmonar (ex. físico e radiográfico)
1 ()	Pulmão retraído (radiográfico)
1 ()	Fibrose pleural (radiográfico)
1 ()	Infarto pulmonar (radiográfico)
	Cardiovascular
1 ()	Angina <u>ou</u> ponte coronariana

- 1 () 2 () IAM em qualquer época (pontuar 2 se >1)
 1 () Miocardiopatia (disfunção ventricular)
 1 () Doença valvular (sopro diastólico ou sistólico > 3+/6+)
 1 () Pericardite por 6 meses ou pericardectomia

Vascular periférico

- 1 () Claudicação por 6 meses
 1 () Perda tecidual menor (polpa digital)
 1 () 2 () Perda tecidual significativa em qualquer época (p. ex. dedo ou membro) (pontuar 2 se > 1 local)
 1 () Trombose venosa com edema, ulceração ou estase venosa

Gastrintestinal

- 1 () 2 () Infarto ou ressecção de intestino (abaixo do duodeno), baço, fígado ou vesícula, em qualquer época e por qualquer causa (pontuar 2 se >1 local)
 1 () Insuficiência mesentérica
 1 () Peritonite crônica
 1 () Estenose ou cirurgia em TGI superior em qualquer época

Músculo-esquelético

- 1 () Atrofia muscular ou fraqueza
 1 () Artrite erosiva ou deformante (inclui formas redutíveis e exclui necrose avascular)
 1 () Osteoporose com fratura ou colapso vertebral (exclui necrose avascular)
 1 () 2 () Necrose avascular (pontuar 2 se >1)
 1 () Osteomielite

Pele

- 1 () Alopecia crônica cicatricial
 1 () Cicatriz cutânea ou panicular extensa que não em polpa ou couro cabeludo
 1 () Úlcera cutânea (excluindo trombose) por > 6 meses

Outros

- 1 () Falência gonadal prematura
 1 () Diabetes (a despeito de tratamento)
 1 () 2 () Malignidade (exclui displasia) (pontuar 2 se >1 local)

Total: _____

ANEXO 6:

**SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS DISEASE ACTIVITY INDEX
(SLEDAI)**

(BOMBARDIER et al. 1992)

MANIFESTAÇÃO	DEFINIÇÃO	PESO
CONVULSÃO	Excluir causas metabólicas, infecciosas ou drogas.	8
PSICOSE	Alteração da percepção da realidade, incluindo-se alucinações, incoerências, pensamento desorganizado, catatonia. Excluir drogas e uremia.	8
SÍNDROME ORGÂNICO-CEREBRAL	Alteração mental com déficit de orientação, memória, julgamento e atenção, com dois de: fala incoerente, insônia, sonolência, hipo/hiperatividade motora. Excluir causas metabólicas, infecciosas ou drogas.	8
ALTERAÇÕES VISUAIS	Corpos cetóides ou hemorragias retinianas, exsudatos ou hemorragias de coróide, neurite óptica. Excluir causas infecciosas, drogas ou hipertensão .	8
ALTERAÇÕES DE NERVOS CRANIANOS	Neuropatia motora ou sensorial.	8
CEFALÉIA	Persistente, intensa, tipo enxaqueca, não responsiva aos analgésicos narcóticos.	8
ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL	Excluir aterosclerose.	8
VASCULITES	Úlceras, gangrena, nódulos dolorosos, infarto sub ou periungueal, biópsia ou angiografia compatível.	8
ARTRITES	Duas ou mais articulações.	4
MIOSITES	Fraqueza ou dor muscular proximal com elevação de enzimas musculares, eletromiografia ou biópsia compatíveis.	4
CILINDROS URINÁRIOS	Granulosos ou hemáticos.	4
HEMATÚRIA	Maior que 5 hemácias por campo. Excluir cálculos ou infecções.	4
PROTEINÚRIA	Maior que 0,5g/dia de início recente ou aumento maior que 0,5g/dia em relação aos valores anteriores.	4
LEUCOCITÚRIA	Maior que 5 leucócitos por campo. Excluir infecções.	4
ERITEMA MALAR	Presente	2

ALOPÉCIA	Perda anormal de cabelos, de forma localizada ou difusa.	2
ÚLCERAS DE MUCOSAS	Úlceras orais ou nasais.	2
PLEURITE	Dor pleurítica, com atrito ou derrame pleural, ou espessamento pleural.	2
PERICARDITE	Dor pericárdica com atrito, derrame ou eletrocardiograma ou ecocardiograma compatíveis.	2
DIMINUIÇÃO DE COMPLEMENTO	Diminuição de C3, C4 ou CH50.	2
ANTI-DNA	Positivo.	2
FEBRE	Temperatura maior que 38°C. Excluir infecções.	1
PLAQUETOPENIA	Menor que 100.000/mm ³ . Excluir drogas.	1
LEUCOPENIA	Menor que 3.000/mm ³ . Excluir drogas.	1
<hr/>		
TOTAL		

Obs: válido para manifestações de início recente (dez dias anteriores à avaliação)

8. REFERÊNCIAS

Abu-Shakra M, Urowitz Mb, Gladman DD, Gough J. Mortality studies in systemic lupus erythematosus. Results from a single centre. I. Causes of death. *J Rheumatol*. 1995;22:1259-64.

Amoura Z, Koutouzov S, Piette JC. The role of nucleosomes in lupus. *Curr Opin Rheumatol*. 2000;12:369-73.

Amoura Z, Chabre H, Koutouzov S, Lotton C, Cabrespines A, Bach JF, Jacob L. Nucleosome-restricted antibodies are detected before anti-dsDNA and/or antihistone antibodies in serum of MRL-Mp lpr/lpr and +/- mice, and are present in kidney eluates of lupus mice with proteinuria. *Arthritis Rheum*. 1994;37:1684-8.

Amoura Z, Koutouzov S, Chabre H, Cacoub P, Amoura I, Musset L, Bach JF, Piette JC. Presence of antinucleosome autoantibodies in a restricted set of connective tissue diseases: antinucleosome antibodies of the IgG3 subclass are markers of renal pathogenicity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2000;43:76-84.

Bencivelli W, Vitali C, Isenberg DA, Smolen JS, Snaith ML, Sciuto M, Bombardieri S. Disease activity in systemic lupus erythematosus: report of the Consensus Study Group of the European Workshop for Rheumatology Research. III. Development of a computerised clinical chart and its application to the comparison of different indices of

disease activity. The European Consensus Study Group for Disease Activity in SLE. *Clin Exp Rheumatol*. 1992;10:549-54.

Benucci M, Gobbi FL, Del Rosso A, Cesaretti S, Niccoli L, Cantini F. Disease activity and antinucleosome antibodies in systemic lupus erythematosus. *Scand J Rheumatol*. 2003;32:42-5

Berden JHM, Grootsholten C, Dieker JWC, van der Vlag J. Lupus Nephritis: a nucleosome waste disposal defect? *J Nephrol*. 2002;15:S1-10.

Bombardier C, Gladman DD, Urowitz MB, Caron D, Chang CH. Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE. *Arthritis Rheum*. 1992;35:630-40.

Brunner HI, Feldman BM, Bombardier C, Silverman ED. Sensitivity of the Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index, British Isles Lupus Assessment Group Index, and Systemic Lupus Activity Measure in the evaluation of clinical change in childhood-onset systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1999;42:1354-60.

Brunner HI, Silverman ED, To T, Bombardier C, Feldman BM. Risk factors for damage in childhood-onset systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2001;46:436-444.

Bruns A, Blass S, Hausdorf G, Burmester GR, Hiepe F. Nucleosomes are major T and B cell autoantigens in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2000;43:2307-15.

Burlingame RW, Cervera R. Anti-chromatin (anti-nucleosome) antibodies. *Autoimmun Rev.* 2002;1:321-8.

Burlingame RW, Boey ML, Starkebaum G, Rubin RL. The central role of chromatin in autoimmune responses to histones and DNA in systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest.* 1994;94:184-92.

Caeiro F, Michielson FM, Bernstein R, Hughes GR, Ansell BM. Systemic lupus erythematosus in childhood. *Ann Rheum Dis.* 1981;40:325-31.

Cairns AP, Mcmillan SA, Crockard AD, Meenagh GK, Duffy EM, Armstrong DJ, Bell AL. Antinucleosome antibodies in the diagnosis of systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis.* 2003;62:272-3.

Campos LM, Kiss MH, D'Amico EA, Silva CA. Antiphospholipid antibodies and antiphospholipid syndrome in 57 children and adolescents with systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 2003a;12:820-6.

Campos LM, Kiss MH, D'Amico EA, Silva CA. Antiphospholipid antibodies in 57 children and adolescents with systemic lupus erythematosus. *Rev Hosp Clin Fac Med S Paulo.* 2003b;58:157-62.

Canova EG; Rosa DC; Vallada MG; Silva CA. Invasive aspergillosis in juvenile systemic lupus erythematosus. a clinicopathologic case. *Clin Exp Rheumatol*. 2002;20:736.

Cassidy JT; Petty RE. Systemic lupus erythematosus, In: Cassidy JT, Petty RE. Textbook Of Pediatric Rheumatology. 2ed. Philadelphia: Wb Saunders Company; 1995. p.260.

Cassidy JT, Petty RE. Systemic lupus erythematosus, In: Cassidy JT, Petty RE. Textbook Of Pediatric Rheumatology. 4th ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 2001. p.396-449.

Cassidy JT; Sullivan DB; Petty RE; Ragsdale C. Lupus nephritis and encephalopathy. Prognosis in 58 children. *Arthritis rheum*. 1977;20: 315-22.

Cervera R, Vinas O, Ramos-Casals M, Font J, Garcia-Carrasco M, Siso A, Ramirez F, Machuca Y, Vives J, Ingelmo M, Burlingame RW. Anti-chromatin antibodies in systemic lupus erythematosus: a useful marker for lupus nephropathy. *Ann Rheum Dis*. 2003;62:431-4.

Chabre H, Amoura Z, Piette JC, Godeau P, Bach JF, Koutouzov S. Presence of nucleosome-restricted antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1995;38:1485-91.

Churg J, Bernstein J, Glassock RJ. Renal disease: classification and atlas of glomerular diseases, 2nd ed., New York, Tokyo: Igakyo-Shoin; 1995.

Cortés-Hernández J, Ordi-Ros J, Labrador M, Bujan S, Balada E, Segarra A, Vilardell-Tarres M. Antihistone and anti-double-stranded deoxyribonucleic acid antibodies are associated with renal disease in systemic lupus erythematosus. *Am J Med.* 2004;116:165-73.

Dieker JWC, van der Vlag J, Berden JHM. Triggers for anti-chromatin autoantibody production in SLE. *Lupus.* 2002;11:856-64.

Fisher CL, Eisenberg RA, Cohen PL. Quantitation and IgG subclass distribution of antichromatin autoantibodies in SLE mice. *Clin Immunol Immunopathol.* 1988;46:205-13.

Gaipi US, Voll RE, Beyer TD, Kladen JR, Hermann M. Complement and Dnase I co-operate in the effective clearance of dying cells. *Arthritis Rheum.* 2004;50:640-9.

Ghillani-Dalbin P, Amoura Z, Cacoub P, Charuel JL, Diemert MC, Piette JC, Musset L. Testing for anti-nucleosome antibodies in daily practice: a monocentric evaluation in 1696 patients. *Lupus.* 2003;12:833-7.

Ghirardello A, Doria A, Zampieri S, Tarricone E, Tozzoli R, Villalta D, Bizzaro N, Piccoli A, Gambari PF. Antinucleosome antibodies in SLE: a two-year follow-up study of 101 patients. *J Autoimmun.* 2004;22:235-40.

Gladman DD, Urowitz MB. Prognostic subsets and mortality in systemic lupus erythematosus. In: WALLACE DJ, HAHN BH.

Dubois' lupus erythematosus. 5th ed. Baltimore: Williams and Wilkins; 1997. p. 1213-27.

Gladman DD, Ginzler E, Goldsmith CH, Fortin P, Liang M, Urowitz MB, Bacon P, Bombardieri S, Hanly JG, Hay E, Isenberg DA, Jones J, Kalunian K, Madison P, Nived O, Petri M, Richter M, Sanchez-Guerrero J, Snaith M, Sturfelt G, Symmons D, Zoma A. The development and initial validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology Damage Index for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1996;39:363-9.

Goetz J. Nucleosome-specific antibodies in systemic lupus erythematosus. *Pathol Biol.* 2002;50:581-3.

Grootscholten C, van Bruggen MC, van der Pijl JW, de Jong EM, Ligtenberg G, Derksen RH, Berden JH; Dutch Working Party on Systemic Lupus Erythematosus. Deposition of nucleosomal antigens (histones and DNA) in the epidermal basement membrane in human lupus nephritis. *Arthritis Rheum.* 2003;48:1355-62.

Hay EM, Bacon PA, Gordon C, Isenberg DA, Maddison P, Snaith ML, Symmons DP, Viner N, Zoma A. The BILAG index: a reliable and valid instrument for measuring clinical disease activity in systemic lupus erythematosus. *Q J Med.* 1993;86:447-58.

Hilário MOE, Len CA, Sato EI, Terreri MT, Sacchetti S, Okuda EM et al. Lúpus eritematoso sistêmico juvenil: resultados do estudo multicêntrico nacional. *Rev Bras Reumatol.* 2002;42:85-89.

Hmida Y, Schmit P, Gilson G, Humbel RL. Failure to detect antinucleosome antibodies in scleroderma: comment on the article by Amoura et al. *Arthritis Rheum.* 2002;46:280-2.

Hochberg MC. Updating the american college of rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1997;40:1725.

Horak P, Scudla V, Hermanovo Z, Pospisil Z, Faltynek L, Budikova M, Kusa L. Clinical utility of selected disease activity markers in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol.* 2001;20:337-44.

Kaliyaperumal A, Michaels MA, Datta SK. Antigen-specific therapy of murine lupus nephritis using nucleosomal peptides: tolerance spreading impairs pathogenic function of autoimmune T and B cells. *J Immunol.* 1999;162:5775-83.

Kaliyaperumal A, Michaels MA, Datta SK. Naturally processed chromatin peptides reveal a major autoepitope that primes pathogenic T and B cells of lupus. *J Immunol.* 2002;168:2530-7.

Karsh J, Klippel JH, Balow JE, Decker JL. Mortality in lupus nephritis. *Arthritis Rheum.* 1979;22:764-9

Kewalramani R, Singh AK. Immunopathogenesis of lupus and lupus nephritis: recent insights. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2002;11:273-7.

Koutouzov S, Jeronimo AL, Campos H, Amoura Z. Nucleosomes in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Rheum Dis Clin North Am*. 2004;30:529-58.

Kramers C, Hylkema MN, van Bruggen MC, van de Lagemaat R, Dijkman HB, Assmann KJ, Smeenk RJ, Berden JH. Anti-nucleosome antibodies complexed to nucleosomal antigens show anti-DNA reactivity and bind to rat glomerular basement membrane in vivo. *J Clin Invest* 1994;94:568-77.

Lehman TJA. Systemic lupus erythematosus in childhood and adolescence. In: Wallace DJ, Hahn BH. 5th ed. Dubois' Lupus Erythematosus. Baltimore: Williams and Williams; 1997. p.851-70.

Lehman TJ, McCurdy DK, Bernstein BH, King KK, Hanson V. Systemic lupus erythematosus in the first decade of life. *Pediatrics*. 1989;83:235-9.

Lepers S, Hachulla E, Leleux E, Hatron PY, Prin L, Dubucquoi S. Relevance of anti-nucleosome antibodies detected by enzyme-based immunoassays in lupus diagnosis. Comparative analysis of four commercial tests. *Pathol Biol*. 2002;50:584-90.

Leser PG, Andrade LE. Anticorpos antinucleossomo como marcador para diagnóstico e monitoração do lúpus eritematoso sistêmico. *Rev Paul Reumatol*. 2004;3:5-6.

Liang MH, Socher SA, Larson MG, Schur PH. Reliability and validity of six systems for the clinical assessment of disease activity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1989;32:1107-18.

Licht R, van Bruggen MC, Oppers-Walgreen B, Rijke TP, Berden JH. Plasma levels of nucleosomes and nucleosome-autoantibody complexes in murine lupus: effects of disease progression and lipopolyssacharide administration. *Arthritis Rheum.* 2001;44:1320-30.

Liphaus BL; Goldeberg AC; Kiss MH; Silva CA. Analysis of human leukocyte antigens of class ii-dr in brazilian children and adolescents with systemic lupus erythematosus. *Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. S. Paulo.* 2002;57:277-82.

Massa M, De Benedetti F, Pignatti P, Albani S, Di Fuccia G, Monestier M, Martini A. Anti-double stranded DNA, anti-histone, and anti-nucleosome igg reactivities in children with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol.* 1994;12:219-25.

Mc Curdy DK, Lehman TJA, Bernstein B et al. Lupus nephritis: prognostic factors in children. *Pediatrics.* 1992;89:240-6.

Min DJ, Kim SJ, Park SH, Seo YI, Kang HJ, Kim WU, Cho CS, Kim HY. Anti-nucleosome antibody: significance in lupus patients lacking anti-double-stranded DNA antibody. *Clin Exp Rheumatol.* 2002;20:13-8.

Mohan C, Adams S, Stanik V, Datta SK. Nucleosome: a major immunogen for pathogenic autoantibody-inducing T cells of lupus. *J Exp Med* 1993;177:1367-81.

Mohan C, Liu F, Xie C, Williams RC Jr. Anti-subnucleosome reactivities in systemic lupus erythematosus (SLE) patients and their first-degree relatives. *Clin Exp Immunol*. 2001;123:119-26.

Ravirajan CT, Rowse L, MacGowan JR, Isenberg DA. An analysis of clinical disease activity and nephritis-associated serum autoantibody profiles in patients with systemic lupus erythematosus: a cross-sectional study. *Rheumatology (Oxford)*. 2001 Dec;40:1405-12.

Rekvig OP, Nossent JC. Anti-double-stranded DNA antibodies, nucleosomes, and systemic lupus erythematosus: a time for new paradigms? *Arthritis Rheum*. 2003;48:300-12.

Rubin LA, Urowitz MB, Gladman DD. Mortality in systemic lupus erythematosus: the bimodal pattern revisited. *Q J Med*. 1985; 55:87-98.

Sato S, Koder M, Hasegawa M, Fujimoto M, Takehara K. Antinucleosome antibody is a major autoantibody in localized scleroderma. *Br J Dermatol*. 2004;151:1182-8.

Schett G, Smole J, Zimmermann C, Hiesberger H, Hoefler E, Fournel S, Muller S, Rubin RL, Steiner G. The autoimmune response to chromatin antigens in systemic lupus erythematosus: autoantibodies

against histone H1 are a highly specific marker for SLE associated with increased disease activity. *Lupus*. 2002;11:704-15.

Silva CA; Hallak J; Pasqualotto FF; Barba MF; Saito MI; Kiss MH. Gonadal function in male adolescents and young males with juvenile systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*. 2002a;29:2000-5.

Silva CA; Leal MM; Simone VP; Leone C; Takiuti AD; Saito MI; Kiss MH. Gonadal function in adolescents and young female with systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2002b;11:419-25.

Simón JA, Cabiedes J, Ghillani P, Musset L, Piette JC, Amoura Z. Anti-chromatin antibodies and nephropathy in patients with systemic lupus erythematosus. Case control study [abstract]. *Arthritis Rheum*. 2003;48:S571. P1471. In: American College of Rheumatology. 67th Annual Scientific Meeting;2003;Orlando;USA.

Simón JA, Cabiedes J, Ortiz E, Alcocer-Varela J, Sanchez-Guerrero J. Anti-nucleosome antibodies in patients with systemic lupus erythematosus of recent onset. Potential utility as a diagnostic tool and disease activity marker. *Rheumatology (Oxford)*. 2004a;43:220-4.

Simón JA, Rojas-Serrano J, Cabiedes J, Alcocer-Varela J. Anti-chromatin antibodies as a predictor of nephritis development in patients with systemic lupus erythematosus [abstract]. In: Abstract book of 7th International Congress on Lupus and Allied Disorders;2004b;New York;USA. pW24B.

Simón JA, Rojas-Serrano J, Cabiedes J, Alcocer-Varela J. Antinucleosome antibodies may help predict development of systemic lupus erythematosus in patients with primary antiphospholipid syndrome. *Lupus*. 2004c;13:177-81.

Sobel ES, Mohan C, Morel L, Schiffenbauer J, Wakeland EK. Genetic dissection of SLE pathogenesis: adoptive transfer of Sle1 mediates the loss of tolerance by bone marrow-derived B cells. *J Immunol*. 1999;162:2415-21.

Stichweh D, Arce E, Pascual V. Update on pediatric systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol*. 2004;16:577-87.

Tan EM, Cohen AS, Fries JF et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1982;25:1271-7.

Urowitz MB, Bookman AAM, Koehler BE, Gordon DA, Smythe HA, Ogryzlo MA. The bimodal pattern of systemic lupus erythematosus. *Am J Med*. 1976;60:221-5.

Urowitz MB, Gladman DD, Tozman EC, Goldsmith CH. The lupus activity criteria count (LACC). *J Rheumatol*. 1984;11:783-7.

Van Bruggen MC, Kramers C, Walgreen B, Elema JD, Kallenberg CG, van der Born J, Smeenk RJ, Assmann KJ, Muller S, Monestier M, Berden JH. Nucleosomes and histones are present in glomerular deposits in human lupus nephritis. *Nephrol Dial Transplant*. 1997a;12:57-66.

Van Bruggen MC, Walgreen B, Rijke GP, Kramers C, Smeenk RJ, Monestier M, Fournié GJ, Berden JH. Antigen specificity of antinuclear antibodies complexed to nucleosomes determines glomerular basement membrane binding in vivo. *Eur J Immunol.* 1997b;27:1564-9.

Wallace DJ, Lin HC, Shen GQ, Peter JB. Antibodies to histone (H2A-H2B)-DNA complexes in the absence of antibodies to double-stranded DNA or to (H2A-H2B) complexes are more sensitive and specific for scleroderma-related disorders than for lupus. *Arthritis Rheum.* 1994;37:1795-7.

Wallace DJ, Podell T, Weiner J, Klinenberg JR, Forouzes S, Dubois EL. Systemic lupus erythematosus – survival patterns. Experience with 609 patients. *JAMA.* 1981; 245: 934-8

Ward MM, Pyun E, Studenski S. Mortality risks associated with specific clinical manifestations of systemic lupus erythematosus. *Arch Intern Med.* 1996;156: 1337-44.

Weening JJ, D'Agati VD, Schwartz MM, Seshan SV, Alpers CE, Appel GB, Balow JE, Bruijn JA, Cook T, Ferrario F, Fogo AB, Ginzler EM, Hebert L, Hill G, Hill P, Jennette JC, Kong NC, Lesavre P, Lockshin M, Looi LM, Makino H, Moura LA, Nagata M; International Society of Nephrology Working Group on the Classification of Lupus Nephritis; Renal Pathology Society Working Group on the Classification of Lupus Nephritis. The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited. *Kidney Int.* 2004;65:521-30.