ANA PATRÍCIA DO NASCIMENTO

**Anticorpos anti-proteína p ribossômica: um potencial marcador
sorológico para glomerulonefrite lúpica membranosa**

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

Área de Concentração: Reumatologia

Orientador: Profa. Dra Eloísa Silva Dutra de Oliveira Bonfá

São Paulo

2006

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Eloísa Silva Dutra de Oliveira Bonfá, Titular da Disciplina de Reumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela orientação integral neste projeto, por toda sua dedicação e por me conceder a oportunidade de aprendizado com sua objetividade e excelência profissional.

À Dra. Vilma Santos Trindade Viana, biomédica, chefe do Laboratório de Imunologia Humoral do LIM-17, por sua orientação tão competente e racional em todas as fases deste e de outros projetos que eu realizei na disciplina de Reumatologia. Em seu laboratório, além do aprendizado de técnicas laboratoriais, contei com seu inestimável apoio e incentivo ao longo destes anos.

À Elaine Pires Leon, bióloga do LIM-17, pelas horas dedicadas aos meus projetos, pela paciência ao me ensinar os passos técnicos e, sobretudo pelo companheirismo e incentivo sempre.

Ao Dr. Eduardo Borba Ferreira Neto, médico assistente da disciplina de Reumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, por seu empenho e participação como co-orientador neste projeto.

Ao Dr. Leonardo Abreu Testagrossa, médico assistente da disciplina de Patologia do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, especialista em patologia renal, que estudou as biópsias dos meus pacientes. Pela sua dedicação e competência.

Ao Dr. Rui Toledo Barros, médico assistente da disciplina de Nefrologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, por permitir o estudo e inclusão de pacientes com nefrite lúpica acompanhados no ambulatório de Nefrologia do HCFMUSP.

Ao Prof. Dr. Luis Balthazar Saldanha, médico assistente da disciplina de Patologia Renal e Urológica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, por viabilizar meu acesso e permitir o estudo das lâminas de biópsias renais dos pacientes estudados neste projeto.

À Marcela Gambim, Cleonice Bueno, Margarete Vendramini, Francisca e Eliana, pela participação em várias etapas técnicas dos meus projetos, pela dedicação e pelo carinho doado.

Aos assistentes da disciplina de Reumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelo apoio e incentivo desde a minha residência médica.

Às funcionárias da secretaria da disciplina de Reumatologia (Cláudia, Fátima, Marta e Iná) da USP pela cordialidade nos meus atendimentos.

A todos os amigos e colegas do Laboratório Fleury, que acompanharam e incentivaram os meus projetos de pesquisa.

Aos meus amigos do Instituto de Psiquiatria do HCFMUSP, tanto pela compreensão de restrição dos meus horários, como pelo incentivo e apoio incondicional.

Aos meus amigos que ainda não foram incluídos nos grupos acima, igualmente fundamentais nestes anos de minha vida. Felizmente uma longa lista de nomes especiais. Sintam-se lembrados de uma forma particular e muito carinhosa.

Especial agradecimento á Dra. Karina Berger (a minha “irmã” sempre presente), á Denise Seick e Maurício Rocha (pelo inestimável apoio técnico e pessoal).

A minha família, por sempre me proporcionar os caminhos, os instrumentos e sonhos de realizações pessoais e profissionais.

“Quem não tem sonhos, tem muito pouco...”.

RESUMO

Nascimento AP. Anticorpos anti-proteína P ribossômica: um potencial marcador sorológico para glomerulonefrite lúpica membranosa. [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2006.

O anticorpo anti-proteína P ribossomal é um marcador sorológico do lúpus eritematoso sistêmico. Nós avaliamos a relevância do mesmo em discriminar os padrões histopatológicos de nefrite lúpica. O anti-P foi detectado em 18/81(22%) dos pacientes com envolvimento renal confirmado por biópsia. Foi observada uma frequência aumentada deste anticorpo em pacientes com classe V (72%) comparado com outras classes de nefrite (28%), $p=0.005$. Dentro do esperado, pacientes anti-P positivos tiveram um nível médio de proteinúria mais elevado que pacientes anti-P negativos ($6,4 \pm 4,8$ vs. $4,7 \pm 3,9$ g/dl, $p= 0,046$). É ainda interessante que a maioria dos pacientes com anti-P isolado tinha classe V, e 71% apresentaram o padrão membranoso puro. O anti-P parece ser um novo marcador sorológico para a nefrite lúpica membranosa.

SUMMARY

Nascimento AP. Anticorpos anti-proteína P ribossômica: um potencial marcador sorológico para glomerulonefrite lúpica membranosa. [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2006.

Anti-ribosomal P antibody is a serological marker for systemic lupus erythematosus. We have evaluated its relevance in discriminating histopathologic patterns of lupus nephritis. Anti-P was detected in 18/81 (22%) patients with biopsy proven renal involvement. A higher frequency of this antibody was observed in patients with class V (72%) compared to other classes of renal disease (28%), $p=0.005$. Accordingly, anti-P positive patients had higher mean proteinuria level than anti-P antibody negative patients (6.4 ± 4.8 vs. 4.7 ± 3.9 g/dl, $p=0.046$). Interestingly, the majority of patients with isolated anti-P had class V, and 71% displayed a pure membranous pattern. Anti-P seems to be a novel serological marker for membranous lupus nephritis.

LISTA DE ABREVIATURAS

dsDNA – ácido desoxirribonucléico de dupla hélice

ELISA – “*enzyme-linked immunosorbent assay*”

IgG – imunoglobulina G

NL – nefrite lúpica

LES – lúpus eritematoso sistêmico

SLEDAI - systemic lupus erythematosus disease activity index

BSA – albumina de soro bovino

PBS – solução salina tamponada fosfatada

IIF - Imunofluorescência Indireta

ISN-RSP – Sociedade Internacional de Nefrologia e Sociedade de Patologia Renal

GNM – glomerulonefrite membranosa

PAGE – polyacrylamide gel electrophoresis

SDS – sodium dodecyl sulfate

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO.....	01
2. OBJETIVOS.....	04
3. PACIENTES E MÉTODOS.....	06
3.1 Pacientes.....	07
3.2 Avaliação de dados clínicos.....	08
3.3 Avaliação laboratorial.....	09
3.3.1 Parâmetros de envolvimento renal.....	09
3.3.2 Análise imunológica de soros.....	09
3.4 Análise de lâminas de biópsia renal.....	13
3.5 Análise estatística.....	14
4. RESULTADOS.....	15
5. DISCUSSÃO.....	29
6. CONCLUSÕES.....	33
7. ANEXOS.....	35
7.1 Artigo original publicado em periódico.....	36
8. REFERÊNCIAS.....	54

INTRODUÇÃO

O acometimento renal é a principal causa de morbi-mortalidade no Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES), sendo que cerca de 10-30% dos pacientes evolui para doença renal terminal (1-7). O anticorpo anti-dsDNA é detectado em mais da metade destes pacientes (8) e é o principal marcador sorológico associado à nefrite lúpica (NL) ativa (9). De fato, a evidencia de uma riqueza de anti-dsDNA nos glomérulos humanos quando comparados a concentração sérica deste anticorpo nos pacientes com LES reforça este seu possível papel patogênico na glomerulonefrite lúpica (10). Entretanto, os anticorpos anti-dsDNA não são mandatários para o dano tecidual renal mediado por imunocomplexos (11). Além disto, altos títulos de anticorpos anti-dsDNA podem ser detectados em pacientes lúpicos sem doença renal (11).

Com isto, é de grande relevância o estudo de outros anticorpos, que possam estar envolvidos na patogênese da NL (12). Neste sentido, um estudo de caso-controle retrospectivo, com número limitado de pacientes correlacionou a presença dos anticorpos anti-proteína P ribossômica (anti-P) com a ocorrência de quadro renal do LES (13), sendo este achado posteriormente suportado pela associação deste anticorpo com atividade da NL pelo mesmo grupo (14). A observação adicional da flutuação longitudinal dos níveis séricos dos anticorpos anti-P paralelamente aos episódios de atividade renal em dois pacientes com NL na ausência de anticorpos anti-dsDNA fortaleceu este possível papel do anti-P como um determinante imunogênico da NL (15).

Além disto, de forma semelhante ao anticorpo anti-dsDNA, o potencial papel nefritogênico do anticorpo anti-P foi reforçado pela evidência de uma concentração do anti-P no eluato renal trinta vezes superior à sérica em um paciente que faleceu por NL (16).

Em contraste com estes achados, nenhuma associação do anti-P com NL foi observada em um amplo estudo chileno prospectivo em pacientes lúpicos. Este fato se deve provavelmente a baixa frequência de ambos, anticorpo anti-P e quadro de NL ativa, inviabilizando uma conclusão definitiva desta questão (17). Da mesma forma, esta falta de associação foi também identificada em outros dois estudos com amostras semelhantes de pacientes, podendo também ser explicada pela representação final de positividade de anti-P menor que 20% e pela baixa frequência de envolvimento renal nestas amostras (18-19).

A questão do anticorpo anti-P ser considerado um marcador renal adicional para os pacientes com LES é ainda controversa (17-19). Além disso, estudos considerando a relevância de um anticorpo específico na discriminação de diferentes padrões histológicos de NL ainda não foram realizados. Assim, este estudo foi feito para analisar a associação do anticorpo anti-P com padrões histopatológicos renais da NL com a finalidade de determinar a sua possível utilidade na avaliação dos pacientes com esta atividade do LES.

OBJETIVOS

(1). Avaliar a frequência do anti-P em uma população de pacientes com LES submetidos à biópsia renal.

(2). Analisar a associação do anti-P com parâmetros demográficos, manifestações clínicas extra-renais em pacientes com LES submetidos à biópsia renal.

(3). Determinar a relevância do anti-P em discriminar padrões histopatológicos da NL.

(4). Avaliar a associação do anti-P com anticorpo anti-dsDNA em pacientes com NL submetidos a biópsia renal.

PACIENTES E MÉTODOS

3.1 Pacientes

Pacientes (n=3751) foram submetidos à biópsia renal no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), entre os anos de 1999 a 2004. Destes, 126 tinham LES e eram acompanhados regularmente no Ambulatório de Reumatologia e/ou Nefrologia do HCFMUSP. No entanto, foram selecionados 81/126 para este estudo por apresentarem amostras de soro congeladas disponíveis, obtidas na ocasião da biópsia renal e armazenadas no laboratório de investigação médica (LIM 17) da disciplina de Reumatologia da Faculdade de Medicina USP. Todos os 81 pacientes selecionados preenchiem os critérios revisados do *American College of Rheumatology* (ACR) para o diagnóstico de LES (20).

Os critérios de exclusão considerados para este estudo foram doenças renais associadas a outras causas, tais como hipertensão arterial essencial, diabetes mellitus e outras glomerulonefrites não relacionadas ao LES. A Comissão de Ética local aprovou este estudo.

3.2. Avaliação de dados clínicos

Os prontuários médicos destes pacientes foram extensivamente revisados para avaliação de dados clínicos na ocasião da biópsia renal. Uma análise sistemática foi realizada nestes prontuários considerando a presença de outras manifestações extra-renais do LES, tais como: quadro cutâneo (*rash* malar ou lúpus discóide,

úlceras mucosas e fotossensibilidade), envolvimento articular (artralgia ou artrite não erosiva envolvendo duas ou mais articulações periféricas), doença neuropsiquiátrica (psicose, convulsão, depressão e neuropatia periférica), doença cardiopulmonar (serosite, miocardite, doença pulmonar restritiva e hipertensão pulmonar) e hematológica (anemia hemolítica, leucopenia com contagem de células inferior a $4000/\text{mm}^3$ ou linfopenia inferior a $1500/\text{mm}^3$, na ausência de drogas). As manifestações hepáticas do LES foram determinadas por elevação de três ou mais enzimas hepáticas aparentemente atribuídas ao LES, sendo descartado hepatite auto imune, esteatose hepática ou hepatite induzida por drogas. Foi determinado também o índice de atividade da doença LES em cada paciente revisado, de acordo com os critérios do SLEDAI (systemic lupus erythematosus disease activity index) (21). Além destes dados, foram revisadas as características demográficas, em relação à idade, sexo, raça, tempo de doença (lúpus/renal) e da realização da biópsia. Da mesma forma, foi avaliada a necessidade de diálise renal na ocasião da biópsia renal.

3.3. Avaliação laboratorial

3.3.1. Parâmetros de envolvimento renal

A evidência de doença ativa renal do LES nestes pacientes foi baseada na presença de: proteinúria persistente ≥ 0.5 g/24h, cilindros celulares, hematúria >10 cel/campo e leucócitos >5 cel/campo (excluindo a presença de infecção e/ou cálculo) (21). O valor de creatinina sérica ≥ 1.5 mg/dL foi arbitrariamente definido como parâmetro de disfunção renal.

3.3.2. Análise imunológica dos soros

Anticorpos anti-proteína P ribossômica (anti-P):

A reatividade destes anticorpos foi detectada através da técnica de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), usando proteína P2 recombinante humano purificado de *E. coli* transformada geneticamente (22), gentilmente cedidas pelo Dr K. B. Elkon da Universidade de Washington, Seattle. Em resumo, os orifícios de microplacas de polistireno (Costar®, EUA) foram sensibilizados com 50 µl da proteína (5 µg/mL), em seguida a placa foi bloqueada com 1% de BSA/PBS por 1 hora à temperatura ambiente. A seguir, foi então incubada com amostras de soros diluídos 1/100 em PBS contendo 0,1% de Tween 20, 5% de soro de cabra normal e 10% de extrato total de *E.coli* não geneticamente transformada para a proteína ribossômica P2 humana, com a finalidade de excluir possível reatividade inespecífica. A ligação dos anticorpos foi determinada pela adição sucessiva de fração IgG de soro de cabra anti-IgG humana conjugada à fosfatase alcalina (Sigma Chem Co., USA) e fosfato de p-nitrofenil (Sigma Chem. Co., St Louis, MO, USA). A densidade óptica (DO) foi monitorada num espectrofotômetro a 405 nm (Labsystems Multiskan MS ELISA Reader, Helsinki, Finland). A reação era interrompida quando a DO de um soro referência anti-P positivo atingiu o valor de 1.0. Os resultados foram considerados positivos quando estavam acima três DP (desvios padrões) da média dos valores de DO de 40 soros normais sistematicamente incluídos em cada ensaio. A especificidade da reação foi confirmada pela pré-incubação de seis soros com altos

títulos de anticorpos anti-P selecionados randomicamente com os seguintes antígenos: polipeptídeo P2 humano recombinante, ds-DNA de timo de bezerro (Sigma Chem Co, USA), bem como com as proteínas humanas recombinantes Ro/SS-A 52 kDa e La/SS-B purificadas de *E. coli* geneticamente transformadas (gentilmente cedidas pelo Dr. K. B. Elkon, USA). Para tanto, os soros foram incubados por 1h à temperatura ambiente com uma concentração dos antígenos 20 vezes superior àquela de proteína P utilizada na sensibilização das placas (100 ug/ml), e posteriormente foram testados por ELISA para a atividade anti-P e frente aos respectivos antígenos. A média de inibição da reatividade anti-P foi de $90,6 \pm 5,4\%$ após a pré-absorção do soro com o polipeptídeo homólogo, contrastando com uma inibição mínima com os outros antígenos irrelevantes: ds-DNA, Ro/SS-A 52kDa e La/SS-B ($14,5 \pm 14\%$, $11 \pm 7,4\%$ e $2,7 \pm 1,8\%$, respectivamente).

A reatividade anti-P de todos os soros foi confirmada pela técnica de *Western blotting* usando a fração ribossômica purificada de hepatócito de rato como substrato (23). Resumidamente, a fração ribossômica foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% em condições desnaturantes (SDS PAGE) e transferidas eletroforéticamente para membranas de nitrocelulose. Amostras de soro foram testadas na diluição 1:50 em PBS contendo 3% de leite desnatado e 0,1% Tween 20. A detecção do anticorpo IgG ligado às frações protéicas 38, 19 e 17 kDa foi feita pela adição de conjugado imunoenzimático específico. Um soro referência, positivo para o anticorpo anti-P, foi sistematicamente incluído em cada ensaio. Da mesma forma, a reatividade de três soros anti-P detectada por esta técnica foi inibida completamente pelo antígeno cognato, contrastando com a falta de inibição pelos outros antígenos não relacionados (Ro/SS-A 52 kDa e ds-DNA de timo de bezerro). Os pacientes

foram divididos de acordo com a presença ou ausência do anticorpo anti-P em grupo anti-P positivo e anti-P negativo.

Anticorpos Anti-dsDNA: foram determinados pela técnica de Imunofluorescência Indireta (IIF) utilizando como substrato o protozoário *Chritidia luciliae* (24). Essa reatividade também foi avaliada pelo método de ELISA usando dsDNA de timo de bezerro como antígeno (Sigma Chem Co., USA). Os resultados acima da média de valores de 40 soros normais, mais três desvios padrões foram considerados positivos. Para excluir a reatividade dos soros à DNA de hélice simples (ssDNA) presentes eventualmente na amostra e garantir assim, a especificidade dos anticorpos anti-dsDNA, foram considerados positivos somente aqueles soros com reatividade persistente após o tratamento do dsDNA adsorvido à placa com S1 nuclease (25). A especificidade da ligação do anti-dsDNA foi confirmada pela inibição da reatividade ($66,62 \pm 11,47\%$) após a pré-incubação de oito soros randomicamente selecionados com altos títulos de soro de dsDNA com 100 µg/ml (por 1h em temperatura ambiente). Por outro lado, as proteínas humanas recombinantes Ro/SS-A 52 kDa e P2 (100 µg/ml) não foram efetivas em abolir esta reatividade ($5,5 \pm 12,5\%$ e $7,05 \pm 11,7\%$, respectivamente).

3.4. Análise de lâminas de biópsia renal:

As lâminas de biópsia renal destes pacientes foram solicitadas no Departamento de Patologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, sendo utilizadas todos os espécimes disponíveis e que preencheram os critérios de inclusão na pesquisa. Todas as amostras

de biópsias renais foram revisadas por um único médico especialista em patologia renal, que desconhecia o laudo histopatológico prévio ou finalidade desta pesquisa. Os achados histológicos foram classificados de acordo com a mais atualizada classificação de glomerulonefrites lúpicas revisada em 2004 (ISN-RSP) (26,27).

3.5. Análise Estatística

A avaliação dos dados das variáveis contínuas foi realizada através de testes de comparação por Teste *t de student* ou por rank teste de *Wilcoxon sum*. As diferenças entre as variáveis categóricas foram avaliadas por Teste de Pearson Chi-Square ou por Teste Exato de Fisher. A significância estatística foi estabelecida para valores de $P < 0.05$.

RESULTADOS

Pacientes com e sem anticorpos anti-P

Dos 81 pacientes submetidos à biópsia renal por NL, 18 (22%) apresentaram positividade para o anticorpo anti-P. Não houve diferenças significativas entre sexo, raça e média de idade nestes pacientes na inclusão do estudo, em relação à presença ou ausência deste anticorpo (Tabela 1).

Da mesma forma, nenhuma diferença significativa foi observada nos dois grupos de pacientes em relação à frequência de Lúpus juvenil, média de duração do LES e da manifestação renal. A avaliação de manifestações clínicas extra-renais mostrou um predomínio de envolvimento articular e cutâneo de forma similar para os grupos de pacientes anti-P positivo e negativo (Tabela 2). Embora, o grupo de pacientes anti-P positivo tenha apresentado maior frequência de SLEDAI entre 4,1 e 8 quando comparados aos pacientes anti-P negativo, este achado não foi estatisticamente significativo. O mesmo foi observado em relação à manifestação neuropsiquiátrica nos pacientes anti-P positivo, apesar de 39% de ocorrência deste quadro neste grupo de pacientes ($P=0.263$) (Tabela 2). E ainda, a ocorrência de manifestações exclusivamente psiquiátricas (depressão/psicose) observadas em aproximadamente um terço dos pacientes anti-P positivo (33%) foi comparável aos 19% de pacientes do grupo de anti-P negativo ($P=0,108$) (Tabela 3).

Tabela 1 - Características demográficas dos 81 pacientes com NL, em relação à positividade do anti-P

Características demográficas	Anti-P		<i>P</i>
	Positivo n=18	Negativo n=63	
Feminino, n (%)	16 (88,9)	54 (85,7)	0,999
Branços, n (%)	8 (44)	37 (58,7)	0,282
Idade na inclusão, média $\pm$ DP a	32,3 $\pm$ 9,0	32,6 $\pm$ 10,1	0,928
LES juvenil n (%)	4 (22,2)	12 (19)	0,746
Duração do LES, média $\pm$ DP a	7,7 $\pm$ 6,6	5,9 $\pm$ 4,1	0,265
Duração doença renal, média $\pm$ DP a	5,5 $\pm$ 4,3	4,5 $\pm$ 3,4	0,274

DP – desvios padrões

a - anos

Tabela 2 - Características clínicas extra-renais e SLEDAI dos 81 pacientes estudados em relação à positividade do anti-P

Características clínicas n (%)	Anti-P		<i>P</i>
	Positivo n=18	Negativo n=63	
Articulares	17 (94)	62 (98)	0,397
Cutâneas	16 (89)	56 (89)	0,999
Hematológicas	8 (44)	31 (49)	0,721
Neuropsiquiátricas	7 (39)	16 (25)	0,263
Serosites	2 (11)	17 (27)	0,216
Hepáticas	4 (22)	14 (22)	0,999
SLEDAI 2 - 4	2 (3)	2 (12)	0,060
SLEDAI 4,1 - 8	45 (72)	8 (44)	
SLEDAI > 8	16 (25)	8 (44)	

Tabela 3 - Manifestações psiquiátricas nos 81 pacientes com NL, em relação à presença ou ausência do anti-P

Anti-P	Manifestações psiquiátricas n (%)		
	Psicose n=6	Depressão n=12	Convulsão n=5
Positivo (n=18)	3 (43)	3 (43)	1 (14)
Negativo (n=63)	3 (19)	9 (56)	4 (25)
<i>P</i>	0,310	0,666	0,999

Em contraste, a análise dos padrões histológicos de NL demonstrou um evidente predomínio de glomerulonefrite membranosa (GNM) ou classe V nos pacientes anti-P positivo quando comparados com os anti-P negativo (72% vs. 35%, $P=0.047$) (Tabela 4). Esta associação tornou-se ainda mais notável quando foi comparada a frequência de pacientes anti-P positivo com classe V (13/18) a aqueles também anti-P positivo com outras classes histológicas renais (5/18) ($P=0.005$).

Tabela 4 - Padrões histológicos renais dos 81 pacientes com NL de acordo com a presença de anticorpos anti-P

Classificação Histológica Renal*	Anti-P n(%)	
	Positivo n=18	Negativo n=63
II	0 (0)	3 (5)
III	1 (6)	8 (13)
IV	4 (22)	30 (47)
V	13 (72)**	22 (35)

*De acordo com a classificação revisada de NL 2004 (ISN-RSP)

** $P=0,047$

Tabela 5 – Distribuição de pacientes anti-P positivo e negativo de acordo com a Classe histológica renal V

Classe V	Anti-P n(%)	
	Positivo n=18	Negativo n=63
Sim	13 (72)	22 (35)
Não	5 (28)	41 (65)

$p=0,005$

A metade dos 18 pacientes anti-P positivos não apresentaram positividade simultânea para os anticorpos anti-dsDNA. Destes nove pacientes anti-P isolados, sete (78%) apresentaram classe histológica renal V e ainda o mais interessante foi notar que a maioria 5/7 (71%), exibiu padrão de glomerulonefrite membranosa pura ($P=0.063$).

De forma similar, a análise histológica renal dos outros nove pacientes com presença simultânea de anticorpos anti-P e anti-dsDNA revelou que a maioria, seis de nove pacientes (67%) manteve padrão histológico de classe V. Porém, em contraste com o grupo anti-P positivo isolado, a maior parte destes pacientes 4/6 (67%) tinha lesões proliferativas concomitantes ao padrão membranoso ($p=0,057$) (tabela 6).

Tabela 6 – Distribuição dos pacientes anti-P positivo de acordo com a presença de anti-dsDNA e padrões histológicos renais da classe V

Classe V	Anti-P Positivo		P
	Anti-dsDNA n (%)		
	Positivo n=9	Negativo n=9	
Pura n=07	2 (29)	5 (71)	0,063
Associadas as lesões proliferativas n= 06	4 (67)	2 (33)	0,057

Um outro achado relevante em relação ao grupo de pacientes anti-P positivo isolado com classe V é que somente um (14%) foi submetido à diálise renal na ocasião da biópsia renal. Em contraste, a metade dos pacientes (3/6) com positividade simultânea para anticorpos anti-P e anti-dsDNA com classe V necessitaram diálise renal na ocasião da biópsia ($p=0,266$).

E ainda, reforçando a associação descrita do anti-P com classe V da NL, a análise de parâmetros laboratoriais na ocasião da biópsia renal revelou que os pacientes com anti-P positivo tiveram maiores níveis de proteinúria quando comparados a aqueles pacientes que não apresentaram este anticorpo ($6,4 \pm 4,8$ vs. $4,7 \pm 3,9$ g/dL, $P=0,046$). Por outro lado, os outros parâmetros laboratoriais foram comparáveis em ambos os grupos ($P>0,050$), com uma menor, mas não significativa média de creatinina sérica no grupo de pacientes anti-P positivo (Tabela 7).

Tabela 7 - Parâmetros laboratoriais de doença renal em 81 pacientes com NL com e sem anticorpos anti-P

Dados laboratoriais	Anti-P		<i>P</i>
	Positivo n=18	Negativo n=63	
Proteinúria (g/dL)	6,4 ± 4,8	4,7 ± 3,9	0,046
Creatinina (mg/dL)	1,8 ± 1,7	2,3 ± 1,7	0,141
Hematúria (RBC/ml)	55,1 ± 46,9	60,3 ± 43,8	0,819
Cilindrúria (%)	77,8	63,5	0,257
Albumina (g/dL)	2,5 ± 0,8	2,6 ± 0,8	0,662

Valores expressos em média ± DP (desvio padrão) ou porcentagem (%)

Pacientes com e sem anticorpos anti-dsDNA: Os anticorpos anti-dsDNA foram encontrados em 23 pacientes com NL (28%) quando detectados por IFI e em 34 (42%) quando testados pelo método de ELISA ($p=0,007$). Considerando a maior sensibilidade deste último método, as análises envolvendo anticorpos anti-dsDNA foram arbitrariamente consideradas com os dados por ELISA (tabela 8). Dos 34 pacientes com anti-dsDNA positivo, 25 não foram associados com a presença do anticorpo anti-P (74%).

Nossos dados confirmaram a associação do anticorpo anti-dsDNA com padrões histológicos proliferativos de GNM lúpicas (classes III e IV, assim como, classe V com lesões proliferativas) quando comparadas a pacientes sem estes anticorpos (85% vs. 66%, $P=0,050$) (tabela 9). Além disto, na ocasião da biópsia renal, os pacientes com anti-dsDNA positivo tiveram níveis de creatinina sérica mais elevados que o grupo de pacientes em que este anticorpo foi negativo ($2,6 \pm 1,9$ vs. $1,8 \pm 1,5$ mg/dL, $p=0,014$) (tabela 10).

Tabela 8 – Positividade do anticorpo anti-dsDNA nos 81 pacientes com LES submetidos a biópsia renal

Métodos de detecção	Anti-dsDNA n (%)	
	Positivo	Negativo
Imunofluorescência Indireta	23 (28)	58 (72)
ELISA	34 (42)	47 (58)

$P=0.007$

Tabela 9 - Classificação histológica renal dos 81 pacientes com NL de acordo com a presença de anticorpos anti-dsDNA

Classificação Histológica Renal*	Anti-ds DNA n(%)	
	Positivo n=34	Negativo n=47
II	1 (3)	2 (4)
III	3 (9)**	6 (13)
IV	17 (50)**	17 (36)
V com proliferação	9 (26)**	8 (17)
V pura	4 (12)	14 (29)

*De acordo com a Classificação revisada de NL 2004 (ISN-RSP)

** $P=0,050$

Tabela 10 - Parâmetros laboratoriais de doença renal em 81 pacientes com NL com e sem anticorpos anti-dsDNA

Dados laboratoriais	Anti-dsDNA		<i>P</i>
	Positivo n=34	Negativo n=47	
Proteinúria (g/dL)	5,6 ± 5,1	4,6 ± 3,3	0,592
Creatinina (mg/dL)	2,6 ± 1,9	1,8 ± 1,5	0,014
Hematúria (RBC/ml)	68,6 ± 40,9	52,3 ± 44,5	0,097
Cilindrúria (%)	62	70	0,425
Albumina (g/dL)	2,7 ± 0,7	2,4 ± 0,8	0,185
Valores expressos em média ± DP (desvio padrão) ou porcentagem (%)			

DISCUSSÃO

Nossos dados demonstraram que o anticorpo anti-P é um novo e potencial marcador sorológico útil para GNM lúpica.

Em contraste, o envolvimento de outros órgãos pelo LES nesta amostra foi comparável, a despeito da presença dos anticorpos anti-P. Embora em estudos prévios (28), uma maior frequência de manifestações psiquiátricas tenha sido observada no grupo de pacientes anti-P positivo o mesmo não foi observado nesta amostra. A escassa representação desta condição em nossos pacientes, assim como os critérios de seleção usados para inclusão neste estudo podem explicar em parte esta discrepância.

No entanto, em relação à análise de biópsia renal, nossos dados fornecem evidências para uma inovadora e notável associação do anticorpo anti-P com classe V ou GNM lúpica, quando comparado com outras classes histológicas da NL. Este importante achado foi possível devido à inclusão de um substancial número de pacientes com biópsia renal por NL, e particularmente de pacientes com classe V que são usualmente recrutados para biópsia renal em nosso hospital (terciário). Por outro lado, a reduzida representação geral de biópsia renal na maioria dos estudos prévios (13-16) é a explicação mais provável para a falta de descrição desta notável associação. Além disto, todas as amostras séricas deste presente estudo foram obtidas na ocasião da biópsia renal, contrastando com um período acima de dois anos ou até mesmo a falta desta informação em outros estudos (13-16,29). Esta observação é extremamente relevante uma vez que é bem conhecida a flutuação longitudinal dos títulos de anticorpos, particularmente do anti-P e anti-dsDNA. (9, 30).

A associação do anti-P com padrão histológico classe V da NL foi mais uma vez fortalecida pela evidência de maiores valores de proteinúria no grupo de pacientes anti-P positivo. Além disto, todos os pacientes anti-P positivo com classe V apresentaram função renal dentro da normalidade, exceto um. Este achado é compatível com a baixa taxa de progressão para doença renal terminal sugerida pela história natural da GNM lúpica (29).

Reforçando esta potencial capacidade do anti-P em discriminar um padrão distinto de NL, observamos que cerca de 80% dos pacientes com este anticorpo e ausência de anti-dsDNA apresentaram classe histológica V, e caracteristicamente a grande maioria destes pacientes tinha padrão de GNM lúpica pura.

Por outro lado, a presença simultânea de anticorpos anti-dsDNA pareceu ser um indicador de maior severidade da injúria renal membranosa, sugerido pelo predomínio de lesões proliferativas concomitantes à GNM lúpica destes pacientes e conseqüente maior necessidade de diálise renal na ocasião da biópsia renal.

Enquanto a natureza da deposição de anticorpos na GNM em humanos ainda está indeterminada, alguns aspectos imunopatogênicos são baseados nos estudos de nefrite de *Heymann* (31). De fato, neste modelo experimental de rato para GNM, o antígeno específico para anticorpos nefritogênicos foi identificado e expresso na superfície dos podócitos (31) diferindo dos humanos nos quais o potencial imunopatogênico dos anticorpos para GNM e particularmente para NL membranosa são desconhecidos. De fato, a maioria dos estudos de depósito glomerular em pacientes com GNM lúpica falhou em identificar antígenos alvos, contrastando com os antígenos nucleossomais e histonas invariavelmente encontrados em padrões proliferativos de NL (32). Neste aspecto a expressão de proteína P ribossômica na

superfície das células renais de ratos imunes e normais aumenta a possibilidade de que os anticorpos anti-P possam estar envolvidos no dano renal do LES (33). Evidências indiretas advém da demonstração de um efeito adverso na função celular induzida pela reação cruzada do anti-dsDNA com o proteínas P expressas na superfície de células glomerulares mesangiais (34). Além disto, a evidencia de que o anticorpo anti-P isolado penetra no interior de hepatócitos vivos e causa disfunção celular em células de culturas fornece bases adicionais para um possível papel patogênico deste anticorpo em órgãos alvos (35). E ainda o fato de que 87% de pacientes reportados com hepatite lúpica e positividade de anti-P apresentavam doença renal concomitante reforça mais esta possibilidade (13).

Tendo em vista que as medidas sorológicas para a atividade de NL, como dosagem sérica de complemento e títulos de anticorpos anti-dsDNA são frequentemente inalteradas em GNM lúpica, este achado de um marcador sorológico para GNM lúpica é um promissor e adicional parâmetro laboratorial para os médicos clínicos. Com tudo isto a proteína P ribossômica torna-se um potencial candidato a alvo para anticorpos nefritogênicos na GNM lúpica.

CONCLUSÕES

(1). A frequência de anti-P nesta população de pacientes com LES submetidos à biópsia renal foi similar à descrita na literatura para a população geral de pacientes com LES.

(2). O anti-P não apresentou associação com parâmetros demográficos ou manifestações clínicas extra-renais nestes pacientes com LES submetidos à biópsia renal.

(3). O anti-P foi considerado um marcador sorológico com capacidade de discriminar pacientes com GNM lúpica ou classe V de histologia renal nesta amostra de pacientes.

(4). A presença simultânea do anticorpo anti-dsDNA em pacientes com NL submetidos a biópsia renal esteve associada a padrões de GNM que exibem padrão proliferativo concomitante.

(5). A presença de anti-P na ausência de anti-dsDNA está associada a GNM pura.

ANEXOS

ANTIBODIES TO RIBOSOMAL P PROTEINS: A POTENTIAL SEROLOGICAL MARKER FOR LUPUS MEMBRANOUS GLOMERULONEPHRITIS

Ana Patrícia do Nascimento¹, Vilma dos Santos Trindade Viana¹, Leonardo de Abreu Testagrossa², Elaine Pires Leon¹, Eduardo Ferreira Borba¹, Rui Toledo Barros³, Eloísa Bonfá¹.

Rheumatology Division¹, Pathology Department², and Nephrology Division³, School of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

A.P. Nascimento, MD, Research Fellow; V.S.T. Viana, PhD, Research Assistant; L.A. Testagrossa, MD, Research Fellow; E.P. Leon, BSc; E.F. Borba, MD, PhD, Assistant Professor; R.T. Barros, MD, PhD, Assistant Professor; E. Bonfá, MD, PhD, Full Professor.

Supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (grant 04/09953-1 to EB) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (grant 304756/2003-2 to E.B.).

Address correspondence and reprint request to: Ana Patrícia do Nascimento, MD, Disciplina de Reumatologia, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Av. Dr. Arnaldo 455, sala 3133, São Paulo, SP, Brazil. CEP: 01246-903; FAX: 55-11-30667490.

E-mail: reumato@edu.usp.br

Objective: To evaluate the relevance of antibodies to ribosomal P proteins to discriminate histopathological patterns of lupus nephritis (LN).

Methods: 81 consecutive SLE patients (ACR criteria) who underwent renal biopsy and with available frozen serum at the time of biopsy were evaluated. All biopsies were blindly revised according to 2004 ISN-RPS histological criteria. Anti-P was detected by ELISA/immunoblot and anti-dsDNA by indirect immunofluorescence/ELISA.

Results: Anti-P antibodies were detected in 18 patients (22%). Demographic and clinical features were similar in groups with and without anti-P. Remarkably, biopsy analysis revealed a higher frequency of anti-P antibodies in class V LN (72%) contrasting to only 28% in other classes ($P=0.005$). Accordingly, anti-P positive group presented higher mean proteinuria level compared to negative group (6.4 ± 4.8 vs. 4.7 ± 3.9 g/dl, $P=0.046$). Renal function was preserved in all patients except one with anti-P and class V LN. In contrast, anti-dsDNA was associated with proliferative classes LN ($P=0.050$) and higher creatinine levels ($P=0.014$). Furthermore, 7/9 patients with isolated anti-P presented class V LN and more importantly, five of them (71%) displayed pure membranous pattern. Conversely, a tendency to a predominance of class V LN with concomitant proliferative lesions (67%) was observed when anti-P was associated with anti-dsDNA.

Conclusion: Our data introduce anti-P antibody as a novel serological marker for membranous LN and support the notion that isolated anti-P may discriminate patients with pure class V LN whereas the simultaneous presence of anti-dsDNA suggests class V with concomitant presence of proliferative lesions.

Key Indexing Terms: Systemic Lupus Erythematosus, lupus glomerulonephritis, anti-ribosomal P protein antibodies, anti-P, antibody.

Running title: Anti-P antibodies in lupus glomerulonephritis

Renal disease remains a major cause of morbidity in systemic lupus erythematosus and approximately 10-30% of the patients will develop end-stage renal disease. Anti-dsDNA are strongly associated with active nephritis, however these antibodies are not mandatory for renal tissue damage.

It is therefore of great interest to study other antibodies that may be associated with lupus nephritis. Retrospective case control-study correlated antibodies to P ribosomal proteins with renal disease (1) which was further supported by its association with active nephritis (2). The additional observation of anti-P serum levels fluctuation paralleled with renal flares in two SLE patients without anti-dsDNA strengthens the possible role of this antibody as an immunological determinant of LN (3).

Moreover, similar to anti-dsDNA, the potential nephritogenic role of anti-P is reinforced by the evidence of a 30-fold enrichment of anti-P activity in renal eluates compared to the paired serum from one SLE patient who died of renal failure (4). Therefore, the present study was undertaken to analyze the association of anti-P with renal histopathological patterns in order to determine its possible usefulness in the management of SLE renal involvement.

PATIENTS AND METHODS

Patients: Eighty-one patients with biopsy-proven lupus nephritis were selected due to availability of frozen serum samples at the time of renal biopsy, from 1999 to 2004. All patients fulfilled the revised ACR criteria for SLE (5). All biopsy specimens were blindly revised by the same expert renal pathologist and histological findings were recorded according to the 2004 ISN-RSP revisited lupus glomerulonephritis classification (6).

Clinical evaluation: Charts were extensively reviewed for demographic, clinical, and laboratory data. Systematic analysis was performed regarding the presence of other extra-renal manifestations of SLE.

Renal involvement: Evidence for active renal SLE was based on: persistent proteinuria $\geq 0.5\text{g}/24\text{h}$, presence of cellular casts, hematuria >10 red blood cells (RBC)/hpf, and $> 5/\text{hpf}$ leukocytes (excluding infection or stone). Plasma creatinine ≥ 1.5 mg/dl was arbitrarily defined as renal dysfunction.

Anti-P antibodies: were detected by ELISA as previously described (7) employing high binding polystyrene microtiter plates (Costar, New York, USA) sensitized with human recombinant P2 polypeptide (kindly provided by Dr. KB Elkon, USA) and blocked with 1% bovine serum albumin/PBS for one hour. Serum samples were diluted 1/100 in PBS containing 0.1% Tween-20/10% normal goat serum and 10% wild *E. coli* total extract in order to absorb non-specific binding. Results above the mean value of 40 normal sera plus 3 standard deviations were considered positive. The assay specificity was confirmed by preincubating six randomly selected high titer anti-P positive sera with human recombinant P2 polypeptide, calf thymus

dsDNA (Sigma Chem Co, USA), human recombinant Ro/SS-A 52 kDa and La/SS-B proteins (kindly provided by Dr. KB Elkon, USA) with final concentration of 100 µg/ml, for one hour at room temperature before binding assessment. A mean inhibition of $90.6 \pm 5.4\%$ was obtained with human recombinant P2 polypeptide contrasting with only minor mean inhibition achieved with irrelevant antigens, dsDNA, Ro/SS-A 52kDa and La/SS-B ($14.5 \pm 14\%$, $11 \pm 7.4\%$ and $2.7 \pm 1.8\%$, respectively).

Specificity of the anti-P ELISA was also confirmed in all sera by Western blot using purified ribosomal fraction isolated from rat hepatocytes as substrate (9). Similarly, cognate antigen ablated this reactivity, contrasting with no inhibition with unrelated proteins (Ro/SS-A 52 kDa and calf thymus dsDNA), as assessed with three randomly selected high titer anti-P sera.

Anti-dsDNA antibodies: were assessed by indirect immunofluorescence (IIF) on *Chritidia luciliae* and by ELISA using dsDNA from calf thymus (Sigma Chem Co., USA) (8). Results above the mean value of 40 normal sera plus 3 standard deviations were considered positive. To ensure the specificity of anti-dsDNA antibodies, only those sera with sustained reactivity after S1 nuclease treatment of sensitized plates (8) were considered positive. Specificity of anti-dsDNA binding was further confirmed by the $66.62 \pm 11.47\%$ inhibition after preincubation of eight randomly selected high titer sera with 100 µg/ml of dsDNA for one hour at room temperature. On the contrary, neither Ro/SS-A 52 kDa nor P human recombinant proteins (100 µg/ml) were effective to abolish this reactivity ($5.5 \pm 12.5\%$ and $7.05 \pm 11.7\%$, respectively).

STATISTICAL ANALYSIS

Data were compared by t test or by the Wilcoxon rank sum test in continuous variables. Categorical variables differences were assessed by Pearson Chi-Square or Fisher's Exact Test. Statistical significance was set as $P < 0.05$.

RESULTS

Patients with and without anti-P antibodies: From 81 patients with biopsy-documented diagnosis of lupus nephritis, 18 (22%) presented anti-P antibody (Table 1). There were no significant difference in gender, race distribution and mean age of SLE patients at inclusion concerning the presence or absence of this antibody (Table 1).

Likewise, no significant difference was observed in the two groups of patients with regard to the frequency of juvenile-onset SLE, mean SLE and renal disease duration. Clinical findings were evenly observed in both groups with a predominance of articular and cutaneous involvement. Likewise, the higher frequency of CNS disease in anti-P positive patients (39%) did not reach statistical significance ($p=0.263$) (Table 1). In the same way, the occurrence of psychiatric manifestation (depression/psychosis) observed in approximately one third of the anti-P positive patients (33%) was comparable to 19% of the anti-P negative group ($P=0.108$).

Analysis of histological patterns of lupus nephritis demonstrated a higher frequency of membranous glomerulonephritis (class V) in anti-P positive patients compared to the anti-P negative (72% vs. 35%, $P=0.047$) (Table 2). This association was even more evident when comparing the frequency of anti-P in patients with class V (13/18) and those with other histological subclasses (5/18) ($P=0.005$).

Half of the 18 anti-P positive patients did not have anti-dsDNA antibodies. Interestingly, seven of them (78%) had class V renal disease and more importantly, the majority (71%) displayed pure membranous pattern ($P=0.063$). Among the seven

patients with isolated anti-P and class V histological pattern only one (14%) underwent renal dialysis at the time of renal biopsy.

In contrast, renal histological analysis of the nine patients with both anti-P and anti-dsDNA revealed that six (67%) exhibited features of class V pattern with concomitant proliferative lesions in four of them. Importantly, three out of six patients with both antibodies and class V (50%) underwent dialysis at the time of renal biopsy.

Reinforcing the above association of anti-P with class V nephritis, analysis of laboratorial parameters at the time of biopsy revealed that patients with this antibody had proteinuria levels compared to those without this antibody (6.4 ± 4.8 vs. 4.7 ± 3.9 g/dl, $P=0.046$). On the other hand, other laboratorial parameters were comparable in both groups ($P>0.050$), with a lower but not significant mean creatinine level in anti-P positive patients (Table 3).

Patients with and without anti-dsDNA antibodies: Antibodies to dsDNA were found in 23 LN patients (28%) as detected by IFI and in 34 (42%) when detected by ELISA. Considering the higher sensitivity of the later method, analysis involving anti-dsDNA antibodies was arbitrarily performed with ELISA data. Of the 34 anti-dsDNA positive patients, 25 were not associated with the presence of anti-P antibody (74%).

Our data confirmed the association of anti-dsDNA with proliferative histological patterns of glomerulonephritis (classes III and IV, as well as, class V with proliferative lesions) when compared to patients without these antibodies (85% vs. 66%, $P=0.050$). Moreover, at the time of biopsy, anti-dsDNA patients had higher serum

levels of creatinine than those without this antibody (2.6 ± 1.9 vs. 1.8 ± 1.5 mg/dl, $P=0.014$).

DISCUSSION

Our data have demonstrated that anti-P antibody is a new and potentially useful serological marker for lupus membranous glomerulonephritis.

In contrast, other SLE organ involvement was comparable despite the presence of anti-P antibodies. Unlike previous report (9), the higher frequency of psychiatric manifestation observed in anti-P positive group did not reach statistical significance. The small representation of this condition in our population as well as the selection criteria used herein may explain in part this discrepancy.

Concerning renal biopsy, our data provide evidence for a novel remarkable association of anti-P antibody with class V LN compared to other histological classes. This important finding was achievable due to the inclusion of a substantial number of patients with lupus renal biopsy, and particularly those with class V which is the usual recruitment of our tertiary referral hospital. On the other hand, the reduced overall representation of renal biopsies in the majority of previous studies (1-4) is the most likely explanation for the unawareness of this notable association. In addition, all sera samples in the present study were obtained at the time of renal biopsy, contrasting with a period of up to two years interval or even the lack of this information of other studies (1-4, 10). This issue is extremely relevant since it is known that antibody levels, particularly anti-P and anti-dsDNA, fluctuate longitudinally (9, 11).

The association of anti-P with class V histological pattern is further strengthened by the evidence of higher proteinuria levels in the anti-P positive group. Moreover, all except one anti-P positive class V patients presented renal function

within the normal range. This finding is in accordance to the low rate of progression to end-stage renal disease suggested for the natural history of membranous LN (10).

Reinforcing all the above data of anti-P discriminating a distinct lupus pattern of nephritis is the observation that approximately 80% of patients with this specificity and without anti-dsDNA antibodies presented class V histology, and importantly, the great majority displayed pure membranous pattern.

Conversely, the simultaneous presence of anti-dsDNA antibodies seems to be an indicator of a more severe membranous renal injury as demonstrated by the concomitant proliferative lesions over the pure class V histological pattern and a consequent higher frequency of dialysis compared to patients with isolated anti-P.

While the nature of antibody deposition in human membranous nephritis has not yet been determined, some immunopathogenic aspects are based on studies of the Heymann nephritis (12). In fact, in this rat experimental model for membranous nephritis, the specific antigen for the nephritogenic antibodies is identified and expressed on the surface of podocytes (12) differing from humans in whom the immunopathogenic potential of antibodies for membranous nephritis and particularly for MLN is unknown. Indeed, in the majority of membranous LN patients, the studies on glomerular deposits failed to identify target antigens contrasting to nucleosome or histone invariably found in proliferative patterns (13). In this regard, the expression of ribosomal P protein on the kidney cell surface of autoimmune and normal mice raises the possibility that anti-P antibodies could be involved in lupus renal damage (14). Indirect evidence comes from the demonstration of an adverse effect on cell function induced by anti-dsDNA cross-reactive with ribosomal P proteins expressed on the surface of glomerular mesangial cells (14). Furthermore, the finding that isolated anti-

P antibodies penetrates into live hepatocytes causing cellular dysfunction in culture provides further basis for a possible pathogenic role of this antibody in other target organs (15). Indeed, 87% of the reported lupus patients with anti-P and hepatitis presented concomitantly renal disease (1).

In light of the fact that serological measures of lupus activity such as serum complement and anti-dsDNA antibody levels are frequently unaltered in membranous glomerulonephritis, our finding of a promising humoral marker for MLN adds a novel laboratorial parameter to the clinician and brings the ribosomal P protein as a potential candidate as target for nephritogenic antibodies in MLN.

REFERENCES

1. Hulse M, Goldstein R, Scully L, Surbeck W, Reichlin M. Anti-ribosomal P antibodies in systemic lupus erythematosus: a case-control study correlating hepatic and renal disease. *Clin Immunol Immunopathol*. 1995;74:252-6.
2. Chindalore V, Neas B, Reichlin M. The association between anti-ribosomal P antibodies and active nephritis in systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol Immunopathol*. 1998;87:292-6.
3. Martin AL, Reichlin M. Fluctuations of antibody to ribosomal P proteins correlate with appearance and remission of nephritis in SLE. *Lupus* 1996;5:22-9.
4. Reichlin M, Wolfson-Reichlin M. Evidence for the participation of anti-ribosomal P antibodies in lupus nephritis. *Arthritis Rheum* 1999;42:2728-9.
5. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997;40:1725
6. Weening JJ, D'Agati VD, Schwartz MM, Seshan SV, Alpers CE, Appel GB, et al. The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited. *Kidney Int* 2004;65:521-30.

7. Magsaam J, Gharavi AE, Parnassa AP, Weissbach H, Brot N, Elkon KB. Quantification of lupus anti-ribosome P antibodies using a recombinant P2 fusion protein and determination of the predicted amino acid sequence of the autoantigen in patients' mononuclear cells. Clin Exp Immunol.1989;76(2):165-71.

8. Isenberg DA and Maddison PJ. Detection of antibodies to double stranded DNA and extractable nuclear antigen. J Clin Pathol 1987, 40(11): 1374-81.

9. Bonfa E, Golombeck SJ, Kaufman LD, Skelli S, Weissbach H, Brot N, et al. Association between lupus psychosis and antiribosomal P protein antibodies. N Engl J Med 1987;317:26

10. Austin HA, Illei GG. Membranous lupus nephritis. Lupus 2005;14:65-715-71

11. 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 2001; 40:1405-1412.

12. Ronco P, Debiec H. Molecular pathomechanisms of membranous nephropathy: From Heymann Nephritis to alloimmunization. J Am Soc Nephrol 2005;16:1205-13.

13. van Bruggen MCJ, Kramers C, Walgreen B, Elema JD, Kallenberg CGM, van den Born J, et al. Nucleosomes and histones are present in glomerular deposits in human lupus nephritis. *Nephrol Dial Transplant* 1997;12:57-66.

14. Sun KH, Liu WT, Tsai CY, Tang SJ, Han SH, Yu CL. Anti-dsDNA antibodies cross-react with ribosomal P proteins expressed on the surface of glomerular mesangial cells to exert a cytostatic effect. *Immunology* 1995;85:262-9.

15. Koscec M, Koren E, Wolfson-Reichlin M, Fugate RD, Trieu E, Targoff IN, et al. Autoantibodies to ribosomal P proteins penetrate into live hepatocytes and cause cellular dysfunction in culture. *J Immunol* 1997;159:2033-41.

|

Table 1. Demographic and clinical features of 81 lupus nephritis patients with and without anti-P antibodies.

	Anti-P		
	Positive (n=18)	Negative (n=63)	P
DEMOGRAPHIC FEATURES			
Female, n (%)	16 (88.9)	54 (85.7)	0.999
White, n (%)	8 (44.4)	37 (58.7)	0.282
Age at inclusion, mean ± SD yrs	32.3 ± 9.0	32.6 ± 10.1	0.928
SLE Juvenile-onset, n (%)	4 (22.2)	12 (19)	0.746
SLE Disease duration, mean ± SD yrs	7.7 ± 6.6	5.9 ± 4.1	0.265
Renal Disease duration, mean ± SD yrs	5.5 ± 4.3	4.5 ± 3.4	0.274
CLINICAL FEATURES			
Articular	17 (94)	62 (98)	0.397
Cutaneous	16 (89)	56 (89)	0.999
Hematological abnormalities	8 (44)	31 (49)	0.721
Central nervous system involvement	7 (39)	16 (25)	0.263
Serositis	2 (11)	17 (27)	0.216

SD (standard deviation)

Table 2. Renal histological patterns of 81 patients with lupus nephritis according to the presence of anti-P antibodies.

Renal Histological Classification*	Anti-P	
	Positive	Negative
	(n=18) <i>n</i> (%)	(n=63)
II	0 (0)	3 (5)
III	1 (6)	8 (13)
IV	4 (22)	30 (47)
V	13 (72)**	22 (35)

*According to 2004 ISN-RSP revisited lupus glomerulonephritis classification criteria.

** $P=0.047$

Table 3. Laboratorial parameters of renal disease in 81 lupus patients with and without anti-P antibody.

Renal Disease Laboratorial data	Anti-P		<i>P</i>
	Positive (n=18)	Negative (n=63)	
Proteinuria (g/dl)	6.4 ± 4.8	4.7 ± 3.9	0.046
Creatinine (mg/dl)	1.8 ± 1.7	2.3 ± 1.7	0.141
Hematuria (RBC/ml)	55.1 ± 46.9	60.3 ± 43.8	0.819
Cylindruria (%)	77.8	63.5	0.257
Albumin (g/dl)	2.5 ± 0.8	2.6 ± 0.8	0.662
Anti-dsDNA(%)*	50	39.6	0.589

Values expressed in mean ± SD (standard deviation) or percentage (%).

* ELISA

Formatado: Justificado

REFERÊNCIAS

1. Stahl-Hallengren C, Jonsen A, Nived O, Sturfelt G. Incidence studies of systemic lupus erythematosus in southern Sweden: increasing age, decreasing frequency of renal manifestations and good prognosis. *J Rheumatol* 2000;27:685-91.
2. Mok CC, Lee KW, Ho CT, Lau CS, Wong RW. A prospective study of survival and prognostic indicators of systemic lupus erythematosus in a southern Chinese population. *Rheumatology (Oxford)* 2000;39:399-406.
3. Cervera R, Khamashta MA, Font J, Sebastiani GD, Gil A, Lavilla P, et al. Morbidity and mortality in systemic lupus erythematosus during a 5-year period. A multicenter prospective study of 1,000 patients. European Working Party on Systemic Lupus Erythematosus. *Medicine (Baltimore)* 1999;78:167-75.
4. Donadio JV Jr, Hart GM, Bergstralh EJ, Holley KE. Prognostic determinants in lupus nephritis: a long-term clinicopathologic study. *Lupus* 1995;4:109-15.
5. Mok CC, Wong RW, Lau CS. Lupus nephritis in southern Chinese patients: clinicopathologic findings and long-term outcome. *Am J Kidney Dis* 1999;34:315-23.

6. Neumann K, Wallace DJ, Azen C, Nessim S, Fichman M, Metzger AL, et al. Lupus in the 1980s: III. Influence of clinical variables, biopsy, and treatment on the outcome in 150 patients with lupus nephritis seen at a single center. *Semin Arthritis Rheum* 1995;25:47-55.
7. Korbet SM, Lewis EJ, Schartz MM, Reichlin M, Evans J, Rohde RD. Factors predictive of outcome in severe lupus nephritis. Lupus Nephritis Collaborative Study Group. *Am J Kidney Dis* 2000;35:904-14.
8. Lloyd W, Schur PH. Immune complexes, complement, and anti-DNA in exacerbations of systemic lupus erythematosus (SLE). *Medicine (Baltimore)* 1981;60:208-17.
9. Harley JB, Sestak L, Willis LG, Fu SM, Hansen JA, Reichlin M. A model for disease heterogeneity in systemic lupus erythematosus: relationship between histocompatibility antigens, autoantibodies, and lymphopenia, or renal disease. *Arthritis Rheum* 1989;32:826-36.
10. Winfield JB, Faferman I, Koffler D. Avidity of anti-DNA antibodies in serum and IgG glomerular eluates from patients with systemic lupus erythematosus. Association of high avidity antinative DNA antibody with glomerulonephritis. *J Clin Invest* 1977;59:90-6.

11. Foster MH, Cizman B, Madaio MP. Nephritogenic autoantibodies in systemic lupus erythematosus: immunochemical properties, mechanisms of immune deposition, and genetic origins. *Lab Invest* 1993;69:494-507.
12. Reichlin M, Wolfson-Reichlin M. Correlations of anti-dsDNA and anti-ribosomal P autoantibodies with lupus nephritis. *Clin Immunol* 2003;108:69-72.
13. Hulse M, Goldstein R, Scully L, Surbeck W, Reichlin M. Anti-ribosomal P antibodies in systemic lupus erythematosus: a case-control study correlating hepatic and renal disease. *Clin Immunol Immunopathol.* 1995;74:252-6.
14. Chindalore V, Neas B, Reichlin M. The association between anti-ribosomal P antibodies and active nephritis in systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol Immunopathol.* 1998;87:292-6.
15. Martin AL, Reichlin M. Fluctuations of antibody to ribosomal P proteins correlate with appearance and remission of nephritis in SLE. *Lupus* 1996;5:22-9.
16. Reichlin M, Wolfson-Reichlin M. Evidence for the participation of anti-ribosomal P antibodies in lupus nephritis. *Arthritis Rheum* 1999;42:2728-9.
17. Massardo L, Burgos P, Martinez ME, Perez R, Calvo M, Barros J, et al. Antiribosomal P protein antibodies in Chilean SLE patients: no association with renal disease. *Lupus* 2002;11:379-83.

18. Schneebaum AB, Singleton JD, West SG, Blodgett JK, Allen LG, Cheronis JC, et al. Association of psychiatric manifestations with antibodies to ribosomal P proteins in systemic lupus erythematosus. *Am J Med* 1991;90:54-62.
19. Gerli R, Caponi L, Tincani A, Scorza R, Sabbadini MG, Danieli MG, et al. Clinical and serological associations of ribosomal P autoantibodies in systemic lupus erythematosus: prospective evaluation in a large cohort of Italian patients. *Rheumatology (Oxford)* 2002;41:1357-66.
20. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997;40:1725.
21. 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.
22. Magsaam J, Gharavi AE, Parnassa AP, Weissbach H, Brot N, Elkon KB. Quantification of lupus anti-ribosome P antibodies using a recombinant P2 fusion protein and determination of the predicted amino acid sequence of the autoantigen in patients' mononuclear cells. *Clin Exp Immunol*.1989;76(2):165-71.

23. Gordon TP, Jovanovich SA, Sykes P, Bradley J, Roberts-Thomson PJ. Detection of autoantibodies to ribosomal P protein using recombinant autoantigen in a quantitative immunoassay. *Rheumatol Int* 1990;10:99-102.

24. Aarden LA, de Groot ER, Feltkamp TE. Immunology of DNA. III. Crithidia luciliae, a simple substrate for the determination of anti-dsDNA with the immunofluorescence technique. *Ann N Y Acad Sci.* 1975;254:505-15.

25. Isenberg DA, Maddison PJ. Detection of antibodies to double stranded DNA and extractable nuclear antigen. *J Clin Pathol* 1987;1374-81.

26. Weening JJ, D'Agati VD, Schwartz MM, Seshan SV, Alpers CE, Appel GB, et al. The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited. *Kidney Int* 2004;65:521-30.

27. Weening JJ, D'Agati VD, Schwartz MM, Seshan SV, Alpers CE, Appel GB, et al. The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:241-50.

28. Bonfa E, Elkon KB. Clinical and serologic associations of the antiribosomal P protein antibody. *Arthritis Rheum* 1986;29:981-5.

29. Austin HA, Illei GG. Membranous lupus nephritis. *Lupus* 2005;14:65-71.

30. 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* 2001; 40:1405-1412.
31. Ronco P, Debiec H. Molecular pathomechanisms of membranous nephropathy: From Heymann Nephritis to alloimmunization. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:1205-13
32. van Bruggen MCJ, Kramers C, Walgreen B, Elema JD, Kallenberg CGM, van den Born J, et al. Nucleosomes and histones are present in glomerular deposits in human lupus nephritis. *Nephrol Dial Transplant* 1997;12:57-66.
33. Sun KH, Liu WT, Tang SJ, Tsai CY, Hsieh SC, Wu TH, et al. The expression of acidic ribosomal phosphoproteins on the surface membrane of different tissues in autoimmune and normal mice which are the target molecules for anti-double-stranded DNA antibodies. *Immunology* 1996;87:362-71.
34. Sun KH, Liu WT, Tsai CY, Tang SJ, Han SH, Yu CL. Anti-dsDNA antibodies cross-react with ribosomal P proteins expressed on the surface of glomerular mesangial cells to exert a cytostatic effect. *Immunology* 1995;85:262-9.
35. Koscec M, Koren E, Wolfson-Reichlin M, Fugate RD, Trieu E, Targoff IN, et al. Autoantibodies to ribosomal P proteins penetrate into live hepatocytes and cause cellular dysfunction in culture. *J Immunol* 1997;159:2033-41.