ANA LUISA GARCIA CALICH

**Anticorpo antiproteína P ribossomal em pacientes
com hepatite autoimune**

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

Programa de: Ciências Médicas

Área de concentração: Processos Imunes e
Infecciosos

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eloísa Silva Dutra de
Oliveira Bonfá

**SÃO PAULO
2013**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Calich, Ana Luisa Garcia

Anticorpo antiproteína P ribossomal em pacientes com hepatite autoimune /
Ana Luisa Garcia Calich. -- São Paulo, 2013.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Ciências Médicas. Área de concentração: Processos Imunes e
Infecciosos.

Orientador: Eloísa Silva Dutra de Oliveira Bonfá.

Descritores: 1.Lúpus eritematoso sistêmico 2.Hepatite autoimune
3.Ribossomos 4.Anticorpos 5.Prognóstico

USP/FM/DBD-035/13

Dedico esta tese aos meus pais, Isidio Calich, que para mim é um exemplo de médico e pessoa a ser seguido a quem agradeço por todo conhecimento clínico ensinado e Vera Calich que é para mim o exemplo de pesquisadora ética e eficiente e a quem agradeço todos os ensinamentos para fazer esta tese.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Eloísa, que sempre foi e será um exemplo de determinação. Agradeço por ter permitido minha entrada no HC e pela confiança e carinho com que sempre me tratou.

À Dr^a. Vilma Viana Trindade, pelos ensinamentos, entusiasmo e disponibilidade que foi fundamental para a realização desta tese. E às funcionárias do Laboratório de Investigação Médica da Reumatologia, em especial a Elaine Leon, pelo carinho, apoio e ajuda sempre que foi preciso.

Ao Prof. Dr. Eduardo Cançado e Dr^a. Débora Terrabuio, pelo fornecimento do material necessário para a realização desta tese.

Ao Prof. Clóvis, pelo incentivo, divertimento e por acreditar neste trabalho desde o início.

Ao Adriano, pelo apoio, estímulo, amor e compreensão.

Às minhas grandes amigas e irmãs, Luiza, Luciana, Renata, Karina e Fernanda, que fizeram da residência na Reumatologia uma lembrança de um período repleto de alegrias, aprendizado e companheirismo.

À secretaria Katia, da Disciplina de Gastroenterologia pela disponibilidade para separar todos os prontuários dos pacientes para a coleta de dados.

Aos amigos do CEDMAC, em especial a Carla e Nádia que estavam sempre dispostas a me ajudar com as dúvidas burocráticas da pós graduação.

Aos assistentes da Reumatologia do HC, especialmente Dr. Eduardo Borba, pela ajuda na elaboração da tese.

Aos pacientes, que tornaram possível este estudo.

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

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

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

Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentações; 2012.

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

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	4
3	MÉTODOS	6
3.1	População do Estudo	7
3.2	Métodos	8
3.2.1	Determinação dos autoanticorpos relacionados a hepatite autoimune	8
3.2.2	Determinação do anticorpo anti-P	8
3.2.3	Determinação do anticorpo anti-DNA dupla fita e anticorpo anti-SM	9
3.2.4	Análise estatística	9
4	RESULTADOS	10
4.1	Dados Demográficos e Clínicos no Momento do Diagnóstico	11
4.2	Caracterização do Tipo de Hepatite Autoimune Baseado no Perfil de Autoanticorpos	12
4.3	Anticorpo Anti-P	12
4.4	Características Clínicas e Laboratoriais dos Pacientes com Hepatite Autoimune Anti-P Positivo e Anti-P Negativo	12
5	DISCUSSÃO	16
6	CONCLUSÕES	20
7	ANEXO	22
8	REFERÊNCIAS	24
	APÊNDICES	31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAML	- Anticorpo antimúsculo liso
Anti-P	- Anticorpo antiproteína P ribossomal
Anti-LKM1	- Anticorpo antifração microssomal de fígado e rim Tipo 1
AST	- Aspartato transaminase
CAPPesq	- Comissão de ética para análise de projetos de pesquisa
DP	- Desvio padrão
FAN	- Fator antinúcleo
HAI	- Hepatite autoimune
HCFMUSP-	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
IFI	- Imunofluorescência indireta
IFN- γ	- Interferon-gama
LES	- Lúpus eritematoso sistêmico
Th1	- Linfócitos T helper Tipo 1

RESUMO

Calich ALG. *Anticorpo antiproteína P ribossomal em pacientes com hepatite autoimune* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

Introdução: Os anticorpos antiproteína P ribossomal (anti-P) são considerados marcadores sorológicos específicos do Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) e estão associados a acometimento hepático nesta doença. As semelhanças entre a hepatite autoimune (HAI) e a hepatite associada ao LES levou ao questionamento se o anticorpo anti-P também estaria presente na HAI. **Objetivo:** Avaliar a frequência e significância clínica do anticorpo anti-P em uma grande coorte de pacientes com HAI. **Métodos:** Foram analisados os soros de 96 pacientes com HAI, coletados no diagnóstico e comparados com 82 soros de indivíduos saudáveis. Todos os soros foram testados para a presença do anticorpo anti-P pelo método de ELISA, do anticorpo anti-DNA de dupla fita pelo método de imunofluorescência indireta usando *Crithidia luciliae* e do anticorpo anti-Sm pelo método de ELISA. Os critérios de exclusão adotados foram a presença de outros anticorpos específicos de LES como o anti-DNA de dupla fita ($n=1$) e o anti-Sm ($n=2$) ou se o paciente apresentasse o diagnóstico de LES definido pelo Colégio Americano de Reumatologia ($n=0$). Os prontuários médicos foram revisados para dados demográficos, clínicos e resultados de exames laboratoriais relacionados a hepatopatia e anticorpos específicos de HAI. **Resultado:** Títulos moderados ou alto (> 40 U) de anti-P foram encontrados em 9,7% (9/93) dos pacientes com HAI e em nenhum dos controles ($p = 0,003$). No diagnóstico, os pacientes com anti-P positivo ou negativo apresentavam características demográficas/clínicas semelhantes, como a frequência de cirrose (44,4% vs 28,5%, $p = 0,44$) e exames laboratoriais relacionados a hepatite ($p > 0,05$). Entretanto, ao final do seguimento destes pacientes (média de $10,2 \pm 4,9$ anos), os pacientes positivos para anticorpos anti-P apresentaram uma maior frequência de cirrose quando comparados a pacientes negativos para anti-P (100% vs 60%, $p = 0,04$). **Conclusão:** a demonstração da presença do anticorpo anti-P em pacientes com HAI sem evidência de LES sugere um mecanismo comum de acometimento hepático nestas duas doenças. Além disso, a presença deste anticorpo parece predizer um pior prognóstico nos pacientes com HAI.

Descritores: Lúpus eritematoso sistêmico. Hepatite autoimune. Ribossomos. Anticorpos. Prognóstico.

SUMMARY

Calich ALG. *Anti-ribosomal P protein antibody in autoimmune hepatitis patients* [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

Background: Autoantibodies to ribosomal P proteins (anti-rib P) are specific serological markers for systemic lupus erythematosus (SLE) and are associated with liver involvement in this disease. The similarity in autoimmune background between autoimmune hepatitis (AIH) and SLE-associated hepatitis raises the possibility that anti-rib P antibodies might also have relevance in AIH. **Aims:** To evaluate the frequency and clinical significance of anti-rib P antibodies in a large AIH cohort. **Methods:** Sera obtained at diagnosis of 96 AIH patients and of 82 healthy controls were tested for IgG anti-ribosomal P protein by ELISA. All of the sera were also screened for other lupus-specific autoantibodies, three patients with the presence of anti-dsDNA (n=1) and anti-Sm (n = 2) were excluded. **Results:** Moderate to high titers (> 40 U) of anti-rib P antibody were found in 9.7% (9/93) of the AIH patients and none of the controls ($P = 0.003$). At presentation, AIH patients with and without anti-rib P antibodies had similar demographic/clinical features, including the frequency of cirrhosis (44.4% vs. 28.5%, $P = 0.44$), hepatic laboratorial findings ($p > 0.05$). Importantly, at the final observation (follow-up period 10.2 ± 4.9 years), the AIH patients with anti-rib P had a significantly higher frequency of cirrhosis compared to the negative group (100% vs. 60%, $P = 0.04$). **Conclusion:** The novel demonstration of anti-rib P in AIH patients without clinical or laboratory evidence of SLE suggests a common underlying mechanism targeting the liver in these two diseases. In addition, this antibody appears to predict the patients with worse AIH prognoses.

Descriptors: Systemic lupus erythematosus. Autoimmune hepatitis. Ribosomes. Antibodies. Prognosis.

1 INTRODUÇÃO

A hepatite autoimune (HAI) é uma doença inflamatória crônica do fígado de etiologia desconhecida caracterizada pela presença de autoanticorpos, hipergamaglobulinemia e alterações necroinflamatórias na histologia hepática. Os autoanticorpos são parâmetros importantes para o diagnóstico de HAI, de acordo com o Critério Internacional de HAI^{1,2}. Os mais frequentes encontrados nesta doença e que apresentam relevância para a classificação da HAI em tipo I ou tipo II são: o fator antinúcleo (FAN), o anticorpo antimúsculo liso (AAML) e o anticorpo antifração microssomal de fígado e rim tipo 1 (anti-LKM1). Entretanto, a presença e o título dos anticorpos citados não apresentam relação com a gravidade da doença, e não há portanto indicação de monitorização dos seus títulos³. A técnica considerada padrão ouro para a detecção destes anticorpos é a imunofluorescência indireta (IFI) que é operador dependente e portanto apresenta um nível baixo de acurácia⁴. Além disso, cerca de 10% dos pacientes com HAI não possuem autoanticorpos positivos, e o diagnóstico é estabelecido pelo conjunto de dados clínicos e laboratoriais associados às alterações encontradas no exame histológico do fígado⁴. Os fatos acima justificam portanto a busca por novos anticorpos na HAI que possam ser detectados por métodos melhor padronizados e que apresentem valor prognóstico^{5,6}.

O anticorpo antiproteína P ribossomal (anti-P) é considerado um marcador sorológico bastante específicos do Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES)⁷⁻¹¹. Este anticorpo ocorre em maior frequência em pacientes com LES e acometimento hepático do que em pacientes sem esta manifestação¹²⁻¹³. O papel patogênico do anti-P em doença hepática foi demonstrado experimentalmente pela habilidade deste anticorpo em penetrar em hepatomas e causar disfunção destas células¹⁴.

As similaridades entre a HAI e a hepatite associada ao LES, que algumas vezes levam a dúvida diagnóstica entre estas duas patologias, levou ao questionamento se o anti-P também estaria presente na HAI¹⁵. Entretanto, o único estudo da literatura que avaliou a presença deste anticorpo em 20 pacientes com HAI não encontrou associação¹⁶. Devido ao número pequeno de pacientes incluídos neste estudo e a ausência de dados referentes se a análise do soro foi feita antes dos pacientes iniciarem tratamento (o título do anticorpo anti-P pode variar dependendo da atividade da doença no LES) impedem uma conclusão definitiva em relação a possibilidade do anticorpo anti-P estar presente em pacientes com HAI^{8,17}.

2 OBJETIVOS

a) Avaliar a presença do anticorpo anti-P em uma grande coorte de pacientes com HAI na qual as amostras de soro haviam sido coletadas antes do início do tratamento.

b) Avaliar as implicações fenotípicas e prognósticas da presença do anticorpo anti-P em pacientes com HAI.

3 MÉTODOS

3.1 População do Estudo

O estudo incluiu 96 pacientes com diagnóstico de HAI definido através do Critério Internacional de HAI², os quais foram seguidos na Divisão de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo e que tinham soro coletado e armazenado no diagnóstico da doença. Para todos os pacientes, no momento do diagnóstico, foram excluídas outras causas de hepatopatia como Hepatite B, Hepatite C e ingestão excessiva de álcool. Os prontuários médicos foram cuidadosamente revisados retrospectivamente para dados demográficos, clínicos e resultados de exames laboratoriais relacionados a hepatopatia e anticorpos específicos de HAI. Além disso, foram coletados dados referentes à presença de manifestações clínicas de LES.

Os critérios de exclusão adotados foram:

- a) Pacientes que apresentassem critério diagnóstico de LES definido pelo Colégio Americano de Reumatologia.
- b) Presença de outros autoanticorpos específicos de LES (anti-DNA dupla fita ou anti-Sm)^{18,19}.

Permaneceram no estudo 93 pacientes com HAI devido à exclusão de três (um paciente devido à positividade do anticorpo anti-DNA dupla fita e outros dois com anticorpo anti-Sm positivo).

Indivíduos saudáveis (n = 82) foram incluídos como grupo controle. O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP (CAPPesq) (número 0546/10) (Anexo A).

3.2 Métodos

3.2.1 Determinação dos autoanticorpos relacionados a hepatite autoimune

O anticorpo AAML e o anticorpo anti-LKM1 foram analisados pela técnica de imunofluorescência indireta utilizando cortes de estômago, rim e fígado de roedores¹⁹. Títulos $\geq 1:40$ foram considerados positivos. O FAN foi analisado pela técnica de IFI em células Hep-2 e considerado positivo quando encontrado título $\geq 1:80$.

3.2.2 Determinação do anticorpo anti-P

O anticorpos anti-P IgG foi analisado pela técnica de ELISA, utilizando um *kit* comercial*, que utiliza como substrato antigênico um peptídeo de 22 aminoácidos presentes na cadeia carboxil-terminal da proteína ribossomal. As amostras foram analisadas seguindo a instrução do fabricante. Foram considerados positivos apenas resultados superiores a 40U, valor de corte para resultados moderado pelo fabricante.

Pacientes que apresentaram resultado positivo para o anti-P foram convocados para comparecer ao Departamento de Reumatologia para uma

* Quanta lite™, INOVA Diagnostics Inc., San Diego, CA, USA.

anamnese e exame físico detalhado e dirigido, feito por médico reumatologista a fim de excluir a possibilidade de lúpus subdiagnosticado.

3.2.3 Determinação do anticorpo anti-DNA dupla fita e anticorpo anti-Sm

O anticorpo anti-DNA dupla fita foi analisado pela técnica de IFI em *Crithidia lucillae*[†]. Foram considerados resultados positivos reatividade superior a diluição de 1:10.

O anticorpo IgG anti-Sm foi analisado por ELISA utilizando *kit* comercial[‡], seguindo as instruções do fabricante. Resultados superiores a 20U foram considerados positivos.

3.2.4 Análise estatística

As variáveis categóricas foram comparadas utilizando o teste exato de Fisher. O teste *t* de Student foi utilizado para comparar as diferenças das médias das variáveis contínuas. As variáveis não paramétricas foram comparadas com o teste de Mann-whitney. A significância estatística foi fixada em $p < 0,05$. Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP).

[†] Euroimmun, Medizinische Labordiagnostika, AG, Lübeck, Germany.

[‡] Quanta lite™, INOVA Diagnostics Inc., San Diego, CA, USA.

4 RESULTADOS

4.1 Dados Demográficos e Clínicos no Momento do Diagnóstico

A análise dos 93 pacientes com HAI e dos 82 controles revelou que ambos os grupos apresentavam idade média similar ($30,5 \pm 19,4$ vs $31,2 \pm 18,2$ anos, respectivamente) ($p = 0,645$) e a predominância do sexo feminino nos dois grupos ($84,4\%$ vs $81,7\%$, $p = 0,690$).

Biopsia hepática foi feita em todos os pacientes que concordaram em realizar o procedimento e que não apresentavam contraindicação clínica para a sua realização (64/93, 68,8%). A análise histopatológica mostrou alterações típicas de HAI na grande maioria das biopsias (54/64, 84%). No momento do diagnóstico, a frequência de cirrose encontrada foi de 30,1% (28/93). O diagnóstico de cirrose hepática foi baseado em alterações histopatológicas ou por alterações clínicas e laboratoriais características como a presença de ascite ou hipertensão portal.

O tratamento inicial instituído para a maioria dos pacientes foi prednisona (98,9%) e azatioprina (91,4%).

4.2 Caracterização do Tipo de Hepatite Autoimune Baseado no Perfil de Autoanticorpos

Em 80 pacientes (86%) foi feito diagnóstico de HAI do tipo I, 30 pacientes apresentavam apenas AAML (32,2%), cinco apenas FAN (5,4%) e 45 reatividade concomitante a AAML e FAN (48,4%).

Hepatite tipo II foi diagnosticada em apenas 12 pacientes (12,9%) devido a presença do anticorpo anti-LKM1.

Apenas um paciente (1,0%) apresentava todos os anticorpos negativos e o diagnóstico foi baseado em características clínicas e biópsia hepática.

4.3 Anticorpo anti-P

A análise das amostras séricas dos 93 pacientes com HAI revelou uma positividade em títulos moderados ou altos em 9,7% para o anti-P, média dos títulos de $93,6 \pm 33,1$ unidades. Diferentemente dos pacientes, nenhum dos controles ($n = 82$) apresentou resultado positivo para este anticorpo ($p = 0,004$).

4.4 Características Clínicas e Laboratoriais dos Pacientes com Hepatite Autoimune Anti-P Positivo e Anti-P negativo

Comparando o grupo de pacientes anti-P positivo com grupo anti-P negativo no momento do diagnóstico, não encontramos diferenças em relação às características demográficas, clínicas e exames laboratoriais (Tabela 1). A presença de outras doenças autoimunes associadas foi

diagnosticada em dois dos nove (22,2%) pacientes anti-P positivo (doença de Graves e psoríase) e em 23 dos 84 (27,4%) dos anti-P negativos ($p = 1,0$). No momento do diagnóstico, a frequência de cirrose diagnosticada não apresentou diferença significativa entre esses dois grupos (44,4% vs 28,5%, $p = 0,44$).

Tabela 1 - Características clínicas e laboratoriais no momento do diagnóstico de 93 pacientes com hepatite autoimune e anticorpo antiproteína P ribossomal (anti-P) positivo ou negativo

Características Demográficas/Clínica	Anti-P positivo (n = 9) n (%)	Anti-P negativo (n = 84) n (%)	p
Sexo Feminino	6 (66,7)	72 (85,8)	0,15
Cor da pele branca	3 (33,3)	56 (66,7)	0,07
Idade, média $\pm$ DP (anos)	29,1 $\pm$ 22,1	30,7 $\pm$ 19,2	0,82
Seguimento, média $\pm$ DP (anos)	10,7 $\pm$ 5,1	10,3 $\pm$ 5,2	0,68
Doenças autoimunes associadas	2 (22,2)	23 (27,4)	1,0
Cirrose	4 (44,4)	24 (28,5)	0,44
Prednisona	9 (100)	83 (98,8)	0,09
Azatioprina	7 (78,8)	78 (92,8)	0,17
Exames Laboratoriais			
AST (nl $\leq$ 31 U/L)	371 $\pm$ 248	549 $\pm$ 524	0,67
Bilirrubina (nl $\leq$ 1,0 mg/dL)	4,2 $\pm$ 2,5	5,1 $\pm$ 5,5	0,77
Gamaglobulina (nl $\leq$ 1,5 g/dL)	3,7 $\pm$ 1,3	3,2 $\pm$ 1,2	0,35
Albumina (nl $\geq$ 3,2 g/dL)	3,2 $\pm$ 0,8	3,3 $\pm$ 0,7	0,58
AAML	2 (22,2)	28 (33,3)	0,71
FAN	0	5 (5,9)	1,0
AAML+FAN	7 (77,8)	38 (45,2)	0,08
Anti-LKM1	0	12 (14,3)	0,59

AST: aspartato aminotransferase; AAML: anticorpo antimúsculo liso; FAN: fator antinúcleo; Anti-LKM1: anticorpo antifração microssomal de fígado e rim tipo 1.

Em relação ao perfil de autoanticorpos relacionados à HAI, ambos os grupos também não apresentaram diferença significativa. A maioria do grupo anti-P positivo e anti-P negativo tinha o AAML positivo concomitantemente com o FAN (77,8% vs 45,2%, respectivamente, $p = 0,08$). Além disso, a frequência de AAML isolado (22,2% vs 33,3%, $p = 0,71$), FAN isolado (0% vs 5,9%, $p = 1,0$) e anti-LKM1 (0% vs 14,3%, $p = 0,59$) era similar nos dois grupos respectivamente (Tabela 1).

No momento do diagnóstico, também não havia diferença entre o grupo anti-P positivo e o anti-P negativo em relação aos exames laboratoriais como a média dos valores de aspartato transaminase (AST), bilirrubina, gamaglobulina e albumina ($p > 0,05$). O tratamento instituído no diagnóstico e presente na última avaliação disponível dos pacientes, incluindo a administração de prednisona ($p = 0,10$ e $p = 1,00$, respectivamente) e azatioprina ($p = 0,17$ e $p = 0,43$, respectivamente) também era comparável nos dois grupos (Tabelas 1 e 2).

A avaliação dos desfechos após uma média de seguimento de $10,2 \pm 4,9$ anos mostrou uma taxa significativamente maior de cirrose nos pacientes anti-P positivo comparados aos anti-P negativos (100% vs. 60,0%, respectivamente, $p = 0,04$). Durante o seguimento dos pacientes, a frequência de remissão clínica (definida pela normalização das enzimas hepáticas por 18 meses) foi menor no grupo anti-P positivo, entretanto esta diferença não foi estatisticamente significativa (28% vs 56%, $p = 0,24$). A frequência de morte secundária a falência hepática e a indicação de transplante hepático foram similares em ambos os grupos ($p = 1,0$ e $p = 0,58$, respectivamente) (Tabela 2).

Tabela 2 - Desfechos após o seguimento de 93 pacientes com hepatite autoimune e anticorpo antiproteína P ribossomal (anti-P) positivo ou negativo

Desfecho	Anti-P positivo (n = 9) n (%)	Anti-P negativo (n = 84) n (%)	<i>p</i>
Remissão (18 meses) ^a	2/7 (28,6)	45/80 (56,2)	0,24
Prednisona ^b	5/7 (71,4)	56/80 (70,0)	1,0
Azatioprina ^b	5/7 (71,4)	41/80 (51,2)	0,43
Cirrose	7/7 (100)	48/80 (60,0)	0,04
Morte por falência hepática	0	3/80 (3,7)	1,0
Transplante hepático	1/7 (14,3)	9/80 (11,2)	0,58

^a Definida pela normalização de enzimas hepáticas por 18 meses consecutivos.

^b Uso do medicamento na última visita médica durante o seguimento.

5 DISCUSSÃO

Conforme o nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que demonstrou a presença do anti-P em pacientes com HAI sem evidência clínica ou laboratorial de LES. Além disso, este estudo sugere que este anticorpo pode ser um marcador de pior prognóstico na HAI.

Frente as possíveis similaridades entre HAI e LES²¹, a maior vantagem do nosso estudo foi o critério rigoroso de selecionar pacientes com diagnóstico definido de HAI de acordo com o critério internacional de HAI² e excluir pacientes com diagnóstico de LES, definido pelo Colégio Americano de Reumatologia²². Além disso, foram excluídos pacientes com outros anticorpos específicos do LES (anti-DNA dupla fita e anti-Sm), pois sabemos que a positividade de anticorpos pode preceder em anos o início das manifestações clínicas desta doença^{18,19,23-25}. A fim de aumentar a especificidade do método de detecção do anti-P consideramos resultados positivos apenas valores acima dos considerados como moderado pelo fabricante do produto.

Um dado bastante interessante em nosso estudo foi que a frequência de anti-P observada nos pacientes com HAI foi bastante similar a frequência deste anticorpo em pacientes com LES na população brasileira, segundo estudo prévio²⁶.

Entretanto, os nossos dados contrastam com o único estudo na literatura que avaliou a presença do anti-P em 20 pacientes com HAI¹⁶.

Acreditamos que esta discrepância possa ser explicada pelo número muito pequeno de pacientes avaliados no estudo prévio, a ausência de dados referente a fase da doença em que foi feita a pesquisa do anticorpo e a diferença entre o antígeno utilizado na técnica para a detecção do anticorpo em ambos estudos. Escolhemos um *kit* de ELISA que empregava como antígeno um peptídeo de 22 aminoácidos da cadeia carboxil-terminal da proteína ribossomal, pois em estudos prévios este *kit* mostrou uma ótima sensibilidade e especificidade^{27,28}.

Outro dado interessante e original de nosso estudo foi a observação que pacientes com HAI e anti-P positivo desenvolveram uma frequência maior de cirrose durante o período de seguimento, quando comparados a pacientes anti-P negativo. Entretanto, a relevância clínica deste dado necessita de confirmação em estudos prospectivos.

A maior frequência de cirrose no grupo anti-P positivo reforça o potencial papel patogênico desse anticorpo no fígado, assim como nas manifestações psiquiátricas no LES²⁹, na nefrite lúpica^{30,31} e na hepatite associada ao LES^{12,16,32}. Estudos prévios demonstraram a presença da proteína ribossomal P0 em células de hepatoma³³ e a habilidade do anti-P penetrar nestas células e causar disfunção celular¹⁴. Além disso, já fora demonstrada a capacidade do anti-P em interagir com monócitos humanos periféricos e aumentar a produção de citocinas inflamatórias (fator de necrose tumoral- α , interleucina-6 e interleucina-12) por estas células, induzindo, portanto a uma resposta imune Th1^{34,35}. Na fisiopatologia da hepatite autoimune, a resposta Th1 apresenta um papel importante e o IFN- γ secretado por células Th1 é o principal mediador de lesão tecidual nesta doença³⁶.

A demonstração inédita da presença do anti-P em pacientes com HAI sem manifestação clínica ou laboratorial de LES sugere um mecanismo comum de lesão hepática nestas duas doenças. Além disso, este anticorpo parece predizer pacientes com pior prognóstico na HAI. Não podemos excluir totalmente a possibilidade que estes pacientes desenvolverão lúpus e que a presença do anti-P neste estudo apenas precede o aparecimento das manifestações clínicas²³. Entretanto, essa hipótese é bastante improvável devido ao longo período de seguimento desses pacientes.

6 CONCLUSÕES

a) O anticorpo anti-P também pode ser detectado na HAI assim como na hepatopatia associada ao LES sugerindo um mecanismo comum de acometimento hepático em ambas as doenças. Portanto, este anticorpo não deve ser utilizado para a diferenciação de HAI da hepatopatia associada ao LES quando há dúvida diagnóstica.

b) A possibilidade de pior prognóstico dos pacientes com HAI e anti-P positivo deve ser levada em consideração no seguimento destes pacientes.

Anexo A - Aprovação da CAPPesq

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CAPPesq

Ao

Departamento de Clínica Médica

O Coordenador da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, **APROVOU ad-referendum** em 31/05/2012, a execução do subprojeto intitulado "Anticorpo anti-proteína P ribossômica em pacientes com hepatite autoimune" que será tese de Doutorado da aluna Ana Luisa Garcia Calich, tendo como orientadora a Profa Dra. Eloísa Silva Dutra Bonfá.

O referido projeto faz parte do **Protocolo de Pesquisa nº 0546/10**, intitulado "Anticorpo anti-proteína P ribossômica em crianças e adultos com hepatite auto-imune" tendo como Responsável a Profa Dra. Eloísa Silva Dutra Bonfá.

CAPPesq, 31 de Maio de 2012.

PROF. DR. LUIZ EUGÊNIO GARCEZ LEME
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

8 REFERÊNCIAS

1. Johnson PJ, McFarlane IG. Meeting report: International Autoimmune Hepatitis Group. *Hepatology* 1993; 18: 998-1005.
2. Alvarez F, Berg PA, Bianchi FB, Bianchi L, Burroughs AK, Cancado EL, Chapman RW, Cooksley WG, Czaja AJ, Desmet VJ, Donaldson PT, Eddleston AL, Fainboim L, Heathcote J, Homberg JC, Hoofnagle JH, Kakumu S, Krawitt EL, Mackay IR, MacSween RN, Maddrey WC, Manns MP, McFarlane IG, Meyer zum Büschenfelde KH, Zeniya M, et al. International Autoimmune Hepatitis Group Report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. *J Hepato*1999; 31: 929-38.
3. Czaja AJ, Norman GL. Autoantibodies in the diagnosis and management of liver disease. *J ClinGastroenterol* 2003; 37: 315-29.
4. Vergani D, Alvarez F, Bianchi FB, Cançado EL, Mackay IR, Manns MP, Nishioka M, Penner E. International Autoimmune Hepatitis Group. Liver autoimmune serology: a consensus statement from the committee for autoimmune serology of the International Autoimmune Hepatitis Group. *J Hepatol* 2004; 41: 677-83.
5. Hirschfield GM. Autoimmune hepatitis - learning about your patients from their autoantibody profiles. *Liver Int* 2012; 32: 5-7.

6. Montano-Loza AJ, Shums Z, Norman GL, Czaja AJ. Prognostic implications of antibodies to Ro/SSA and soluble liver antigen in type 1 autoimmune hepatitis. *Liver Int* 2012; 32: 85-92.
7. Elkon K, Bonfa E, Skelly S, Weissbach H, Brot N. Ribosomal protein autoantibodies in systemic lupus erythematosus. *Bioessays* 1987; 7: 258-61.
8. Kiss E, Shoenfeld Y. Are anti-ribosomal P protein antibodies relevant in systemic lupus erythematosus? *Clin Rev Allergy Immunol* 2007; 32: 37-46.
9. Elkon KB, Bonfa E, Brot N. Antiribosomal antibodies in systemic lupus erythematosus. *Rheum Dis Clin North Am* 1992; 18: 377-90.
10. Bonfa E, Elkon KB. Clinical and serologic associations of the antiribosomal P protein antibody. *Arthritis Rheum* 1986; 29: 981-5.
11. Quintana G, Coral-Alvarado P, Aroca G, Patarroyo PM, Chalem P, Iglesias-Gamarra A, Ruiz AI, Cervera R. Single anti-P ribosomal antibodies are not associated with lupus nephritis in patients suffering from active systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev* 2010; 9:750-5.
12. Hulsey 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.

13. Toubi E, Shoenfeld Y. Clinical and biological aspects of anti-P-ribosomal protein autoantibodies. *Autoimmun Rev* 2007; 6: 119-25.
14. Koscec M, Koren E, Wolfson-Reichlin M, Fugate RD, Trieu E, Targoff IN, Reichlin M. Autoantibodies to ribosomal P proteins penetrate into live hepatocytes and cause cellular dysfunction in culture. *J Immunol* 1997; 159: 2033-41.
15. Kaw R, Gota C, Bennett A, Barnes D, Calabrese L. Lupus-related hepatitis: complication of lupus or autoimmune association? Case report and review of the literature. *Dig Dis Sci* 2006; 51: 813-8.
16. Ohira H, Takiguchi J, Rai T, Abe K, Yokokawa J, Sato Y, Takeda I, Kanno T . High frequency of anti-ribosomal P antibody in patients with systemic lupus erythematosus-associated hepatitis. *Hepatol Res* 2004; 28: 137-139.
17. Sato T, Uchiumi T, Ozawa T, Kikuchi M, Nakano M, Kominami R, Arakawa M. Autoantibodies against ribosomal proteins found with high frequency in patients with systemic lupus erythematosus with active disease. *J Rheumatol* 1991; 18: 1681-4.
18. Mahler M. Sm peptides in differentiation of autoimmune diseases. *AdvClinChem* 2011; 54: 109-28.
19. Smeenk RJ, van den Brink HG, Brinkman K, Termaat RM, Berden JH, Swaak AJ. Anti-dsDNA: choice of assay in relation to clinical value. *RheumatolInt* 1991; 11: 101-7.

20. Cançado EL, Vilas-Boas LS, Abrantes-Lemos CP, Novo NF, Porta G, Da Silva LC, Laudanna AA. Heat serum inactivation as a mandatory procedure for antiactin antibody detection in cell culture. *Hepatology* 1996; 23: 1098-104.
21. Kaw R, Gota C, Bennett A, Barnes D, Calabrese L. Lupus-related hepatitis: complication of lupus or autoimmune association? Case report and review of the literature. *Dig Dis Sci* 2006; 51: 813-8.
22. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997; 40: 1725.
23. Arbuckle MR, McClain MT, Rubertone MV, Scofield RH, Dennis GJ, James JA, Harley JB. Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 2003; 349: 1526-33.
24. Doria A, Zen M, Canova M, Bettio S, Bassi N, Nalotto L, Rampudda M, Ghirardello A, Iaccarino L. SLE diagnosis and treatment: when early is early. *Autoimmun Rev* 2010; 10: 55-60.
25. Bengtsson A, Nezlin R, Shoenfeld Y, Sturfelt G. DNA levels in circulating immune complexes decrease at severe SLE flares- correlation with complement component C1q. *J Autoimmun* 1999; 13: 111-9.

26. Mahler M, Kessenbrock K, Szmyrka M, Takasaki Y, Garcia-De La Torre I, Shoenfeld Y, Hiepe F, Shun-le C, von Mühlen CA, Locht H, Höpfel P, Wiik A, Reeves W, Fritzler MJ. International multicenter evaluation of autoantibodies to ribosomal P proteins. *Clin Vaccine Immunol* 2006; 13: 77-83.
27. Agmon-Levin N, Gilburd B, Kivity S, Katz BS, Flitman-Katzevman I, Shoenfeld N, Paran D, Langevitz P, Shoenfeld Y. Anti-ribosomal-P antibodies in lupus patients and healthy controls: evaluation of three ELISA assays. *Isr Med Assoc J* 2009; 11: 403-6.
28. Ghirardello A, Caponi L, Franceschini F, Zampieri S, Quinzanini M, Bendo R, Bombardieri S, Gambari PF, Doria A. Diagnostic tests for antiribosomal p protein antibodies: a comparative evaluation of immunoblotting and ELISA assays. *J Autoimmun* 2002; 19: 71-7.
29. Bonfa E, Golombek SJ, Kaufman LD, Skelly S, Weissbach H, Brot N, Elkon KB. Association between lupus psychosis and anti-ribosomal P protein antibodies. *N Engl J Med* 1987; 317: 265-71.
30. do Nascimento AP, Viana Vdos S, TestagrossaLde A, Leon EP, Borba EF, Barros RT, Bonfá E. Antibodies to ribosomal P proteins: a potential serologic marker for lupus membranous glomerulonephritis. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 1568-72.

31. Massardo L, Burgos P, Martínez ME, Pérez R, Calvo M, Barros J, González A, Jacobelli S. Antiribosomal P protein antibodies in Chilean SLE patients: no association with renal disease. *Lupus* 2002; 11: 379-83.
32. Koren E, Schnitz W, Reichlin M. Concomitant development of chronic active hepatitis and antibodies to ribosomal P proteins in a patient with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1993; 36: 1325-8.
33. Koren E, Reichlin MW, Koscec M, Fugate RD, Reichlin M. Autoantibodies to the ribosomal P proteins react with a plasma membrane-related target on human cells. *J Clin Invest* 1992; 89: 1236-41.
34. Nagai T, Arinuma Y, Yanagida T, Yamamoto K, Hirohata S. Anti-ribosomal P protein antibody in human systemic lupus erythematosus up-regulates the expression of proinflammatory cytokines by human peripheral blood monocytes. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 847-55.
35. Nagai T, Yanagida T, Hirohata S. Anti-ribosomal P protein antibody induces Th1 responses by enhancing the production of IL-12 in activated monocytes. *Mod Rheumatol* 2011; 21: 57-62.
36. Liberal R, Longhi MS, Mieli-Vergani G, Vergani D. Pathogenesis of autoimmune hepatitis. *Best Pract Res ClinGastroenterol* 2011; 25: 653-

APÊNDICES

Apêndice A - Artigo Submetido

Liver International

Anti- ribosomal P protein: a novel antibody in autoimmune hepatitis

Journal:	<i>Liver International</i>
Manuscript ID:	LIVint-12-00774
Wiley - Manuscript type:	Original Articles
Date Submitted by the Author:	13-Aug-2012
Complete List of Authors:	Calich, Ana; Faculdade de Medicina Universidade de São Paulo, Rheumatology Viana, Vilma; Faculdade de Medicina Universidade de São Paulo, Rheumatology Cancado, Eduardo; Faculdade de Medicina Universidade de São Paulo, Gastroenterology Tustumi, Francisco; Faculdade de Medicina Universidade de São Paulo, Rheumatology Terrabuio, Débora; Faculdade de Medicina Universidade de São Paulo, Gastroenterology Leon, Elaine; Faculdade de Medicina Universidade de São Paulo, Rheumatology Silva, Clovis; Faculdade de Medicina Universidade de São Paulo, Rheumatology Borba, Eduardo; Faculdade de Medicina Universidade de São Paulo, Rheumatology Bonfa, Eloisa; Faculdade de Medicina Universidade de São Paulo, Rheumatology
Keywords:	Autoimmune hepatitis, prognosis, autoantibodies, anti- ribosomal p protein antibody, systemic lupus erythematosus

SCHOLARONE™
Manuscripts

Anti- ribosomal P protein: a novel antibody in autoimmune hepatitis

Ana L Calich¹, Vilma ST Viana¹, Eduardo Cancado², Francisco Tustumi¹,
Débora RB Terrabuio², Elaine P Leon¹, Clovis A Silva ^{1,3}, Eduardo F Borba¹,
Eloisa Bonfa¹.

¹Division of Rheumatology, University of São Paulo School of Medicine,
São Paulo, Brazil

²Division of Gastroenterology, University of São Paulo School of
Medicine, São Paulo, Brazil

³Pediatric Rheumatology Unit, University of São Paulo School of
Medicine, São Paulo, Brazil

Correspondence and reprints request to:

Ana Luisa Calich

Disciplina de Reumatologia, Faculdade de Medicina, Universidade de São
Paulo

Av. Dr. Arnaldo, 455 – 3º. Andar – Cerqueira César – São Paulo – SP, Brasil

CEP: 01246-903

Phone: 5511 30617492; Fax: 5511 30617490

isacalich@uol.com.br

Abstract: 249 words

Main Text: 3252 words

Abstract

Background: Autoantibodies to ribosomal P proteins (anti-rib P) are specific serological markers for systemic lupus erythematosus (SLE) and are associated with liver involvement in this disease. The similarity in autoimmune background between autoimmune hepatitis (AIH) and SLE-associated hepatitis raises the possibility that anti-rib P antibodies might also have relevance in AIH. **Aims:** To evaluate the frequency and clinical significance of anti-rib P antibodies in a large AIH cohort. **Methods:** Sera obtained at diagnosis of 96 AIH patients and of 82 healthy controls were tested for IgG anti-ribosomal P protein by ELISA. All of the sera were also screened for other lupus-specific autoantibodies, three patients with the presence of anti-dsDNA (n=1) and anti-Sm (n=2) were excluded. **Results:** Moderate to high titers (>40 U) of anti-rib P antibody were found in 9.7% (9/93) of the AIH patients and none of the controls ($P = 0.003$). At presentation, AIH patients with and without anti-rib P antibodies had similar demographic/clinical features, including the frequency of cirrhosis (44.4% vs. 28.5%, $P = 0.44$), hepatic laboratorial findings ($p > 0.05$). Importantly, at the final observation (follow-up period 10.2 ± 4.9 years), the AIH patients with anti-rib P had a significantly higher frequency of cirrhosis compared to the negative group (100% vs. 60%, $P = 0.04$). **Conclusion:** The novel demonstration of anti-rib P in AIH patients without clinical or laboratory evidence of SLE suggests a common underlying mechanism targeting the liver in these two diseases. In addition, this antibody appears to predict the patients with worse AIH prognoses.

Keywords

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Autoimmune hepatitis, prognosis, autoantibodies, anti- ribosomal p protein
antibody, systemic lupus erythematosus

For Peer Review

Introduction

According to the International Autoimmune Hepatitis Group, autoantibodies are important parameters for diagnosing autoimmune hepatitis (AIH) [1, 2]. Antinuclear antibodies (ANA) and antibodies to smooth muscle (SMA) and liver kidney microsome type 1 antigen (anti-LKM1) are the most frequently detected autoantibodies with diagnostic and classification relevance, but they are devoid of prognostic value [3]. The gold-standard technique used to detect these antibodies is indirect immunofluorescence, which is operator dependent and thus has a reduced level of accuracy [4]. These observations explain the continuing search for new autoantibodies that can be assessed by standardized methods and that could be potential AIH serological markers with prognostic value [5, 6].

In this regard, anti-ribosomal P proteins antibodies (anti-rib P), which are highly specific markers for systemic lupus erythematosus (SLE) [7-10], have been reported to occur in a higher prevalence in lupus patients with liver involvement than in patients without this complication [11,12]. The potential pathogenic role of anti-rib P antibodies in liver disease was supported by the ability of these antibodies to penetrate into live hepatocytes, causing cellular dysfunction [13].

The similarities between AIH- and SLE-associated hepatitis, such as the presence of ANA, hypergammaglobulinemia and arthritis, have raised the possibility that anti-rib P antibodies might also be present in AIH and could have a role in the severity of liver injury [14]. However, the only available study in the literature reported that this antibody was not detected in 20 AIH patients [15]. The limited number of patients and the absence of information regarding sera

being tested before treatment have precluded a definitive conclusion about their findings because anti-rib P levels are known to fluctuate during flares [8, 16].

Therefore, we retrospectively evaluated the frequency, phenotypic manifestation and prognostic implications of anti-rib P antibodies in a large, well-characterized, long-term AIH cohort with serum samples that were obtained at the time of diagnosis and before treatment.

For Peer Review

Material and Methods

Patients

The study initially included 96 consecutive patients with definite diagnosis of AIH according to the AIH International Group criteria [2] and regularly followed in the Gastroenterology Division of Hospital das Clínicas, University of São Paulo and from whom frozen sera samples were obtained at the time of diagnosis. All patients lacked serologic evidence of chronic viral hepatitis B or C, and there was no evidence of drug abuse or excessive alcohol intake. Patient's charts were extensively reviewed for demographic, clinical, and conventional laboratory tests of liver inflammation and function, as well as for the presence of AIH-related autoantibodies. The clinical manifestations associated with SLE were also assessed. The exclusion criteria were the presence of a definite SLE diagnosis and/or the presence of specific disease-related antibodies (anti-dsDNA and anti-Sm) [17, 18]. Biopsy-proven hepatic cirrhosis data obtained from patients with clinical indications and clinical manifestations, such as portal hypertension, ascites, hepatic encephalopathy, organ transplant indication, and eventually death, were also investigated. At the end of this evaluation, a total of 93 AIH patients comprised the study group due to the exclusion of three patients with positive anti-dsDNA ($n = 1$) and anti-Sm ($n = 2$) antibodies.

Healthy subjects ($n = 82$) were included as controls. The study was approved by the local Institutional Ethical Committee, and informed consent was obtained from all of the participants.

Autoimmune serology for AIH

Anti-smooth muscle (SMA) and anti-LKM1 antibodies were determined by indirect immunofluorescence (IIF) using unfixed tissue sections from rodent stomach, kidney and liver [19]. Positivity was defined at a serum titer of $\geq 1:40$. Antinuclear antibodies (ANA) were detected by IIF on HEp-2 cells, and serum samples were considered positive at a $>1:80$ dilution.

Determination of anti-ribosomal P protein antibodies

The presence of IgG anti-ribosomal P protein antibodies (anti-rib P) was determined by ELISA using a commercially available kit (Quanta lite™, INOVA Diagnostics Inc., San Diego, CA, USA), which employs a synthetic 22 amino acid C-terminal peptide as the target antigen. The assays were performed following the manufacturer's protocols and using the cut-off values for moderate antibody titers established for the kit (≥ 40 units).

Patients with positive results for anti-rib P were referred to the Rheumatology Outpatient Clinic for a more detailed clinical evaluation, which included an extensive chart review and an investigation of previous or recent signs and symptoms of lupus, to exclude the possibility of a lupus diagnosis.

Determination of anti-dsDNA and anti-Sm antibodies

Reactivity to double-stranded DNA (dsDNA) was assessed by indirect immunofluorescence on *Crithidia luciliae* (Euroimmun, Medizinische, Labordiagnostika, AG, Lübeck, Germany). Serum samples with IgG reactivity at a dilution of 1:10 or higher were considered positive.

The serum samples were tested for the presence of IgG anti-Sm antibodies by ELISA using a commercially available ELISA kit and following the established manufacturer's instructions (Quanta lite™, INOVA Diagnostics Inc., San Diego, CA, USA), and values greater than 20 units were considered positive.

Statistical analysis

Fisher's exact probability test was used to compare dichotomous variables, and an unpaired *t*-test was used to compare the differences in means of the continuous variables. Nonparametric variables in independent samples were compared using the Mann-Whitney test. Two-sided *p* values less than 0.05 were considered statistically significant. The results are expressed as the mean $\pm$ standard error (SD).

Results

Demographic and clinical features at diagnosis

An analysis of 93 AIH patients and 82 controls revealed that both groups had a similar mean age at the time of diagnosis (30.5 ± 19.4 vs. 31.2 ± 18.2 years old, respectively) ($p = 0.645$), with a clear predominance of women (84.4% vs. 81.7%, $p = 0.690$).

Liver biopsies were performed in 64 of 93 (68.8%) patients fulfilling the clinical conditions for the procedure. Histological analysis showed typical features of AIH in 54 of 64 (84.3%) patients. At diagnosis, cirrhosis, determined by histological evaluation, hepatic ultrasound findings or clinical evidence of ascites and/or portal hypertension, was found in 30.1% (28/93) of the patients. The majority of the patients started treatment with prednisone (98.9%) and 85 of them (91.4%) with azathioprine.

Characterization of AIH autoantibody profile

At diagnosis, 30 patients had only SMA (32.2%), five had only ANA (5.4%), and concomitant reactivity was present in 45 (48.4%). Anti-LKM1 antibodies were found in 12 patients (12.9%), and only one was uniformly negative for these autoantibodies.

Anti-rib P antibody

The analysis of serum samples by ELISA showed that nine AIH patients (9.7%) were positive for IgG anti-C22 ribosomal P peptide with moderate to high antibody titers, with a mean titer of 93.6 ± 33.1 units. Conversely, the control sera ($n = 82$) were all negative ($p = 0.004$).

Clinical and laboratory features of anti-rib P-positive and -negative patients

A comparison of patients with and without anti-rib P antibodies revealed that at diagnosis, both groups were similar regarding demographic/clinical features and laboratory findings (Table 1). Concurrent autoimmune disease was diagnosed in 2 of 9 (22.2%) anti-rib P-positive patients (Graves disease and psoriasis) and in 23 of 84 (27.4%) of anti-rib P-negative patients ($p = 1.0$). Cirrhosis was present in four of these patients, but this finding was not significantly different from that observed in the anti-rib P-negative group (44.4% vs. 28.5%, $p = 0.44$). Concerning AIH-related autoantibody profiles, the majority of anti-rib P-positive and -negative patients (77.8% vs. 45.2%, $p = 0.08$) had SMA antibodies concomitantly with ANA. Both groups of patients were also comparable regarding positivity to SMA (22.2% vs. 33.3%, $p = 0.71$), ANA (0% vs. 5.9%, $p = 1.0$) and anti-LKM1 (0% vs. 14.3%, $p = 0.59$) (Table 1).

At diagnosis, there was no difference between the anti-rib P-positive and -negative patients regarding laboratory findings, including the mean values of aspartate aminotransferase (AST), bilirubin, γ -globulin and albumin ($p > 0.05$). Similarly, the treatment of patients at diagnosis and at the end of the evaluation was also comparable in both groups, including the administration of prednisone ($p = 0.10$ and $p = 1.00$, respectively) and azathioprine ($p = 0.17$ and $p = 0.43$, respectively) (Tables 1 and 2).

The evaluation of the outcomes revealed a significantly higher frequency of cirrhosis in the anti-rib P-positive group compared to those patients without this antibody (100% vs. 60.0%, respectively, $p = 0.04$). The follow-up period was long and comparable in both groups (10.7 ± 5.1 vs. 10.3 ± 5.2 years, $p =$

0.68). Clinical remission during follow-up, defined by the normalization of liver enzymes for a period of 18 months, was less frequently observed in the anti-rib P-positive group, but this finding did not reach statistical significance (28% vs. 56%, $p = 0.24$). Death secondary to liver failure and the frequency of liver transplantation were comparable in patients with and without anti-rib P ($p = 1.0$ and $p = 0.58$, respectively) (Table 2).

For Peer Review

Discussion

To the best of our knowledge, this is the first report to demonstrate that anti-rib P is present in AIH patients without clinical or laboratory evidence of SLE, and this antibody might be a marker of worse prognosis in this disease.

The very restricted diagnosis criteria for inclusion were the major advantage of the present study due to the similarities between SLE and AIH [20], which might have hampered the interpretation of the findings. In this regard, only patients with definite diagnoses of AIH, according to the Revised Original Pretreatment Scoring System of the International Autoimmune Hepatitis Group, were included, and patients with definite SLE, according to the revised American College of Rheumatology criteria, were excluded [2,21]. Because it is known that lupus autoantibodies can precede clinical disease expression by years, the presence of other established serological markers, such as anti-dsDNA and anti-Sm, was also a pertinent exclusion criterion [17, 18, 22-24]. The moderate cut-off value for anti-rib P positivity arbitrarily defined herein was essential for improving the specificity of the method and determining the putative antibody-AIH association more accurately.

Interestingly, the frequency of anti-rib P in AIH patients observed in the present study was similar to that reported for the general Brazilian SLE population [25].

Our data, however, contrast with previous findings showing that anti-rib P was uniformly absent in 20 AIH patients [15]. The most likely explanations for this discrepancy rely on the very small sample size analyzed, the absence of restricted clinical inclusion criteria and the distinct molecular nature of the antigen employed in the technique used for anti-rib P detection by this group. In

1
2
3 this regard, the carboxy-terminal C22 amino acid synthetic P peptide used as
4
5 the ELISA antigen herein agrees strongly with the gold-standard immunoblotting
6
7 assay in terms of sensitivity and specificity [26, 27].
8

9
10 Another original and important finding of the present study is the
11
12 observation that compared to anti-rib P-negative patients, anti-rib P-positive AIH
13
14 patients developed a higher frequency of cirrhosis during the follow-up period.
15
16 However, the clinical relevance of this finding must be confirmed in prospective
17
18 studies. The higher frequency of cirrhosis found in the anti-rib P-positive group
19
20 supports the notion of a potential pathogenic role of this antibody in liver
21
22 disease, as also described for lupus with psychiatric manifestations [28],
23
24 nephritis [29,30] and SLE-associated hepatitis [11,15,31]. Reinforcing this
25
26 possibility, previous studies have demonstrated that ribosomal P0 proteins are
27
28 expressed on the surface of hepatoma cells [32] and anti-rib P antibodies can
29
30 penetrate into live hepatoma cells and cause cellular dysfunction [13].
31
32 Moreover, anti-rib P has the capacity to react with activated human peripheral
33
34 blood monocytes and enhance the production of tumor necrosis factor- α ,
35
36 interleukin-6 and interleukin-12, thus inducing a Th1 immune response [33, 34].
37
38 In AIH, the role of Th1 immune response is well established, as IFN- γ secreted
39
40 by Th1 cells is the main mediator of tissue damage in this disease [35].
41
42
43
44

45
46 The novel demonstration of anti-rib P in AIH patients without clinical or
47
48 laboratory evidence of SLE suggests a common underlying mechanism
49
50 targeting the liver in these two diseases. In addition, this antibody seems to
51
52 predict those patients with worse AIH prognoses. We cannot, however,
53
54 completely rule out that these AIH patients will develop lupus and that the anti-
55
56 rib P in the present study merely predates the onset of clinical symptoms [22].
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

However, this hypothesis is highly unlikely due to the long-term follow-up and meticulous inclusion criteria of the patients stated herein, which suggest that anti-rib P might not be a specific feature of lupus patients.

In summary, anti-rib P might underlie the autoimmune response in liver disease not restricted to the SLE spectrum. The observed predictive value of this antibody for AIH severity appears to be a promising tool for the management of these patients.

For Peer Review

References

1. Johnson PJ, McFarlane IG. Meeting report: International Autoimmune Hepatitis Group. *Hepatology* 1993; **18**: 998-1005.
2. Alvarez F, Berg PA, Bianchi FB, et al. International Autoimmune Hepatitis Group Report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 1999; **31**: 929-38.
3. Czaja AJ, Norman GL. Autoantibodies in the diagnosis and management of liver disease. *J Clin Gastroenterol* 2003; **37**: 315-29.
4. Vergani D, Alvarez F, Bianchi FB, et al.; International Autoimmune Hepatitis Group. Liver autoimmune serology: a consensus statement from the committee for autoimmune serology of the International Autoimmune Hepatitis Group. *J Hepatol* 2004; **41**: 677-83.
5. Hirschfield GM. Autoimmune hepatitis - learning about your patients from their autoantibody profiles. *Liver Int* 2012; **32**: 5-7.
6. Montano-Loza AJ, Shums Z, Norman GL, Czaja AJ. Prognostic implications of antibodies to Ro/SSA and soluble liver antigen in type 1 autoimmune hepatitis. *Liver Int* 2012; **32**: 85-92.
7. Elkon K, Bonfa E, Skelly S, Weissbach H, Brot N. Ribosomal protein autoantibodies in systemic lupus erythematosus. *Bioessays* 1987; **7**: 258-61.
8. Kiss E, Shoenfeld Y. Are anti-ribosomal P protein antibodies relevant in systemic lupus erythematosus? *Clin Rev Allergy Immunol* 2007; **32**: 37-46.
9. Elkon KB, Bonfa E, Brot N. Antiribosomal antibodies in systemic lupus erythematosus. *Rheum Dis Clin North Am* 1992; **18**: 377-90.
10. Bonfa E, Elkon KB. Clinical and serologic associations of the antiribosomal P protein antibody. *Arthritis Rheum* 1986; **29**: 981-5.

11. 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.
12. Toubi E, Shoenfeld Y. Clinical and biological aspects of anti-P-ribosomal protein autoantibodies. *Autoimmun Rev* 2007; **6**: 119-25.
13. Koscec M, Koren E, Wolfson-Reichlin M, et al. Autoantibodies to ribosomal P proteins penetrate into live hepatocytes and cause cellular dysfunction in culture. *J Immunol* 1997; **159**: 2033-41.
14. Kaw R, Gota C, Bennett A, Barnes D, Calabrese L. Lupus-related hepatitis: complication of lupus or autoimmune association? Case report and review of the literature. *Dig Dis Sci* 2006; **51**: 813-8.
15. Ohira H, Takiguchi J, Rai T, et al. High frequency of anti-ribosomal P antibody in patients with systemic lupus erythematosus-associated hepatitis. *Hepatol Res* 2004; **28**: 137-139.
16. Sato T, Uchiumi T, Ozawa T, et al. Autoantibodies against ribosomal proteins found with high frequency in patients with systemic lupus erythematosus with active disease. *J Rheumatol* 1991; **18**: 1681-4.
17. Mahler M. Sm peptides in differentiation of autoimmune diseases. *Adv Clin Chem* 2011; **54**: 109-28.
18. Smeenk RJ, van den Brink HG, Brinkman K, Termaat RM, Berden JH, Swaak AJ. Anti-dsDNA: choice of assay in relation to clinical value. *Rheumatol Int* 1991; **11**: 101-7.
19. Cançado EL, Vilas-Boas LS, Abrantes-Lemos CP, et al. Heat serum inactivation as a mandatory procedure for antiactin antibody detection in cell

- 1
2
3 culture. *Hepatology* 1996; **23**: 1098-104.
4
5
6 20. Kaw R, Gota C, Bennett A, Barnes D, Calabrese L. Lupus-related hepatitis:
7 complication of lupus or autoimmune association? Case report and review of
8 the literature. *Dig Dis Sci* 2006; **51**: 813-8.
9
10
11 21. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised
12 criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis*
13 *Rheum* 1997; **40**: 1725.
14
15
16 22. Arbuckle MR, McClain MT, Rubertone MV, et al. Development of
17 autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus. *N*
18 *Engl J Med* 2003; **349**: 1526-33.
19
20
21 23. Doria A, Zen M, Canova M, et al. SLE diagnosis and treatment: when early
22 is early. *Autoimmun Rev* 2010; **10**: 55-60.
23
24
25 24. Bengtsson A, Nezlin R, Shoenfeld Y, Sturfelt G. DNA levels in circulating
26 immune complexes decrease at severe SLE flares-correlation with
27 complement component C1q. *J Autoimmun* 1999; **13**: 111-9.
28
29
30 25. Mahler M, Kessenbrock K, Szmyrka M, et al. International multicenter
31 evaluation of autoantibodies to ribosomal P proteins. *Clin Vaccine Immunol*
32 2006; **13**: 77-83.
33
34
35 26. Agmon-Levin N, Gilburd B, Kivity S, et al. Anti-ribosomal-P antibodies in
36 lupus patients and healthy controls: evaluation of three ELISA assays. *Isr*
37 *Med Assoc J* 2009; **11**: 403-6.
38
39
40 27. Ghirardello A, Caponi L, Franceschini F, et al. Diagnostic tests for
41 antiribosomal p protein antibodies: a comparative evaluation of
42 immunoblotting and ELISA assays. *J Autoimmun* 2002; **19**: 71-7.
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 28. Bonfa E, Golombek SJ, Kaufman LD, et al. Association between lupus
4 psychosis and anti-ribosomal P protein antibodies. *N Engl J Med* 1987; **317**:
5 265-71.
6
7
8
9
10 29. do Nascimento AP, Viana Vdos S, Testagrossa Lde A, et al. Antibodies to
11 ribosomal P proteins: a potential serologic marker for lupus membranous
12 glomerulonephritis. *Arthritis Rheum* 2006; **54**: 1568-72.
13
14
15 30. Massardo L, Burgos P, Martínez ME, et al. Antiribosomal P protein
16 antibodies in Chilean SLE patients: no association with renal disease. *Lupus*
17 2002; **11**: 379-83.
18
19
20
21 31. Koren E, Schnitz W, Reichlin M. Concomitant development of chronic active
22 hepatitis and antibodies to ribosomal P proteins in a patient with systemic
23 lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1993; **36**: 1325-8.
24
25
26 32. Koren E, Reichlin MW, Koscec M, Fugate RD, Reichlin M. Autoantibodies to
27 the ribosomal P proteins react with a plasma membrane-related target on
28 human cells. *J Clin Invest* 1992; **89**: 1236-41.
29
30
31 33. Nagai T, Arinuma Y, Yanagida T, Yamamoto K, Hirohata S. Anti-ribosomal P
32 protein antibody in human systemic lupus erythematosus up-regulates the
33 expression of proinflammatory cytokines by human peripheral blood
34 monocytes. *Arthritis Rheum* 2005; **52**: 847-55.
35
36
37 34. Nagai T, Yanagida T, Hirohata S. Anti-ribosomal P protein antibody induces
38 Th1 responses by enhancing the production of IL-12 in activated monocytes.
39 *Mod Rheumatol* 2011; **21**: 57-62.
40
41
42 35. Liberal R, Longhi MS, Mieli-Vergani G, Vergani D. Pathogenesis of
43 autoimmune hepatitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2011; **25**: 653-64.
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

For Peer Review

Apêndice B - Trabalho aceito para apresentação oral em congresso

Dear Ana Luisa Calich, MD,

Thank you for agreeing to participate in the 2012 ACR/ARHP Annual Meeting, in Washington, DC, November 09 - 14, 2012. We are delighted and grateful that you have agreed to serve as Oral presenter for the abstract titled "Anti-Ribosomal P Antibodies in a Large Cohort of Autoimmune Hepatitis with No Evidence of Lupus: A Common Underlying Mechanism Targeting Liver?".

We have you scheduled for the following:

Session Type: Oral

Session Name: Miscellaneous Rheumatic and Inflammatory I

Date and Session Time: Tuesday, November 13, 2012: 4:30 PM-6:00 PM

Location: 145 A (WCC)

Presentation Number: 2526

If you have specific questions regarding your abstract, you may contact Stacey Boyd, Annual Scientific Meeting Abstracts, at abstracts@rheumatology.org or 404-633-3777. We look forward to seeing you at this year,s Annual Scientific Meeting in Washington.

Sincerely,

Chester Oddis, MD

Chair, ACR Annual Meeting Planning Committee

Linda Ehrlich-Jones, PhD, RN

Chair, ARHP Annual Meeting Program Sub-Committee