

C 733687
R 1496700
04/06/02
R#6,70

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

Centro de Ciências da Saúde

Departamento de Medicina Clínica

**ANTICORPOS ANTI-NUCLEOSSOMA EM PORTADORES
DE LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO**

Antonio Luiz Carneiro Jerônimo

Fortaleza

1999

TESE
616.77
J54a
1999

ANTONIO LUIZ CARNEIRO JERÔNIMO

**ANTICORPOS ANTI-NUCLEOSSOMA EM PORTADORES DE
LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO**

**Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em
Medicina - Clínica Médica, do Departamento de Medicina
Clínica da Universidade Federal do Ceará para obtenção
do título de Mestre em Clínica Médica.**

Orientador :

Prof. Dr. Henry de Holanda Campos

Fortaleza - Ceará

1999

J54i Jerônimo, Antonio Luiz Carneiro

Anticorpos anti-nucleossoma em Portadores de Lúpus
Eritematoso Sistêmico/Antonio Luiz
Carneiro Jerônimo. – Fortaleza, 1999.

134f:il

Orientador : Prof. Dr. Henry de Holanda Campos.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará.
Curso de Pós-graduação em Medicina-Clínica Médica.

1. Lúpus. 2. Nucleossoma – anticorpos. 3. DNA –
anticorpos. 4. Atividade clínica

CDD 616.77

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, do Departamento de Medicina Clínica, da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Clínica.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Henry de Holanda Campos

Universidade Federal do Ceará

Orientador

Dra. Maria José Pereira Vilar

Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Prof. Dr. Rui Toledo Barros

Universidade Estadual de São Paulo (USP)

Prof. Dra. Marta Maria das Chagas Medeiros

Universidade Federal do Ceará

Aos meus pais Albanísio e Violeta

Com muito amor e gratidão

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Henry de Holanda Campos, pelo incentivo à pesquisa, por todo apoio, orientação e revisão completa desta dissertação.

À Profa. Rosa Maria Salani Mota, pelo empenho e dedicação com que realizou a primorosa análise estatística dos resultados aqui apresentados.

Ao Dr. Jefferson Paes de Andrade Rodrigues, por sua valorosa contribuição na coleta dos dados.

À Dra. Sophie Koutouzov e a todos os técnicos do Laboratório 25 do *Institut Nationale de la Santé et Recherche Médicale*, Hospital Necker, Paris, pela realização da pesquisa dos anticorpos em nosso estudo, possibilitando-me também o aprendizado daquelas técnicas e a discussão dos resultados.

À direção do Hospital Geral Dr. César Cals por permitir a adequação de minhas atividades como médico daquele hospital, tornando possível desenvolver esta pesquisa e nela incluir pacientes atendidos naquela instituição.

À direção do Hospital Universitário Walter Cantídio, sobretudo ao Prof. Fernando Antonio Frota Bezerra, pelo apoio recebido e que possibilitou a inclusão neste estudo, tanto de pacientes internados como em seguimento ambulatorial naquele Hospital.

Ao Prof. Antonio Cleyton Mendonça Ribeiro, Chefe do Serviço de Reumatologia do Hospital Universitário Walter Cantídio, que nos possibilitou o recrutamento de pacientes portadores de artrite reumatóide.

Aos colegas do ambulatório de Nefrologia do Hospital Universitário Walter Cantídio, Drs. Paulo Roberto Tavares, Cláudia C. de Oliveira e Marcos Kubrusly, pelo encaminhamento de pacientes portadores de glomerulopatia primária ou de LES para inclusão em nosso estudo.

Ao Laboratório Central do Hospital Universitário Walter Cantídio, na pessoa das Dras. Zilmar Fontenele e Silva e Heliane Baltazar Ribeiro, pela disponibilidade e interesse na realização de exames laboratoriais de pacientes incluídos neste estudo.

Aos funcionários do Laboratório de Imunogenética e Imunologia de Transplantes do Centro de Pesquisas em Doenças Hepato-Renais, especialmente a Jaqueline de Amorim Fernandes, pela classificação e estocagem das amostras de soro para congelação.

Ao Prof. José Otho Leal Nogueira, pelo exemplo profissional que me tem inspirado durante todos estes anos, pela dedicação e capacidade com que conduz os casos clínicos no Hospital Geral Dr. César Cals.

Ao Centro de Hemoterapia do Ceará (HEMOCE) , pelo fornecimento dos soros de doadores voluntários de sangue.

Ao coordenador do Mestrado em Medicina Clínica , Prof. Dr. Pedro Felipe Carvalhedo de Bruin, pelo apoio na conclusão deste trabalho.

Às colegas do mestrado, Silvana, Eliana, Tânia e Luiza, pelo bom convívio durante este período em que estivemos juntos na qualidade de alunos.

Às colegas médicas Dras. Ana Cleine Pinheiro, Sônia Maria Holanda Almeida Araújo e Alzenir Holandá Castelo e as enfermeiras Maria das Graças Miranda e Sandra Tomé, do Centro de Hemodiálise da Santa Casa , por sua compreensão e ajuda.

A todos os amigos que me incentivaram na conclusão desta pesquisa, a minha gratidão.

Aos pacientes, colaboradores anônimos e estímulo maior para a realização deste estudo.

*“Não há limites para o homem que
tem a capacidade de sonhar e a
determinação de transformar em
realidade o seu sonho”*

B.Brecht

*“... o homem será antes de
mais nada o que tiver
projetado ser.”*

P.Sartre

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE QUADROS.....	xiv
LISTA DE FIGURAS.....	xv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xvii
RESUMO.....	xxi
SUMMARY.....	xxiv
1.0 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Histórico.....	2
1.2 Epidemiologia.....	4
1.3 Etiopatogenia.....	6
1.4 Quadro clínico.....	14
1.5 Diagnóstico.....	18
1.5.1 Testes para screening.....	19
1.5.2 Testes confirmatórios.....	21
1.5.3 Outras provas imunológicas.....	24
1.6 Avaliação da atividade clínica.....	25
1.7 Tratamento.....	27
2.0 OBJETIVOS.....	30
3.0 CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	33
3.1 Pacientes e soros.....	34
3.2 Obtenção de antígenos.....	39

3.2.1	Preparação da cromatina e de mononucleossomas.....	39
3.2.2	Outros antígenos.....	43
3.3	Pesquisa dos anticorpos.....	44
3.4	Expressão dos resultados e análise estatística.....	46
4.0	RESULTADOS.....	48
5.0	DISCUSSÃO.....	79
6.0	CONCLUSÕES.....	95
7.0	BIBLIOGRAFIA	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição dos portadores de LES em Fortaleza, nos hospitais HUWC e HGCC, no período de 1995 a 1997, segundo sexo, idade e tempo de doença.

Tabela 2. Distribuição dos portadores de LES em Fortaleza, nos hospitais HUWC e HGCC, no período de 1995 a 1997, segundo a atividade da doença.

Tabela 3. Distribuição dos portadores de LES em Fortaleza, nos hospitais HUWC e HGCC, no período de 1995 a 1997, segundo a presença ou ausência de nefrite.

Tabela 4. Frequência das manifestações clínicas e laboratoriais registradas em portadores de LES em Fortaleza, nos hospitais HUWC e HGCC, no período de 1995 a 1997, segundo a presença ou ausência de nefrite.

Tabela 5. Distribuição dos portadores de LES em Fortaleza, nos hospitais HUWC e HGCC, no período de 1995 a 1997, segundo o tempo de doença, tempo de tratamento e tipo de tratamento.

Tabela 6. Características demográficas dos doadores voluntários de sangue, de portadores de Artrite Reumatóide e de portadores de Glomerulopatia Primária em Fortaleza, nos hospitais HUWC e HGCC, no período de 1995 a 1997.

Tabela 7. Presença de anticorpos anti-nucleossoma e anticorpos anti-dsDNA nos grupos de portadores de LES, portadores de Artrite Reumatóide, portadores de Glomerulopatia Primária e doadores voluntários de sangue em Fortaleza, nos hospitais HUWC e HGCC, no período de 1995 a 1997.

Tabela 8. Sensibilidade e especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo, falsos positivos e negativos dos anticorpos anti-nucleossoma e anti-dsDNA para o diagnóstico do LES na população estudada, em Fortaleza, nos hospitais HUWC e HGCC, no período de 1995 a 1997.

Tabela 9. Distribuição dos portadores de LES em função da presença dos anticorpos anti-nucleossoma e anti-dsDNA, em Fortaleza, nos hospitais HUWC e HGCC, no período de 1995 a 1997, segundo a atividade clínica.

Tabela 10. Presença de anticorpos anti-nucleossoma e anti-dsDNA em portadores de LES em Fortaleza, nos Hospitais HUWC e HGCC, no período de 1995 a 1997, em função da atividade e do número de anticorpos presentes, incluindo-se a pesquisa de anticorpos anti-histona.

Tabela 11. Características clínicas e laboratoriais dos portadores de LES com anticorpo anti-nucleossoma restrito, em Fortaleza, nos hospitais HUWC e HGCC, no período de 1995 a 1997.

Tabela 12. Presença dos anticorpos anti-nucleossoma e anti-dsDNA em portadores de LES com manifestações renais presentes, em Fortaleza, nos hospitais HUWC e HGCC, no período de 1995 a 1997, segundo a atividade clínica.

Tabela 13. Presença dos anticorpos anti-nucleossoma e anti-dsDNA em portadores de LES sem manifestações renais, em Fortaleza, nos hospitais HUWC e HGCC, no período de 1995 a 1997, segundo a atividade clínica.

Tabela 14. Distribuição dos portadores de LES em função da atividade, em Fortaleza, nos hospitais HUWC e HGCC, no período de 1995 a 1997, segundo o número de manifestações clínicas e laboratoriais presentes.

Tabela 15. Distribuição dos portadores de LES em função da presença de anticorpos anti-nucleossoma e anti-dsDNA, em Fortaleza, nos hospitais HUWC e HGCC, no período de 1995 a 1997, segundo o número de manifestações clínicas e laboratoriais presentes.

Tabela 16. Resultado da análise univariada para investigar a associação entre a presença de anticorpos anti-dsDNA e as manifestações clínicas e laboratoriais isoladas em portadores de LES ativo, em Fortaleza, nos hospitais HUWC e HGCC, no período de 1995 a 1997.

Tabela 17. Resultado da análise univariada para investigar a associação entre a presença de anticorpos anti-nucleossoma e as manifestações clínicas e laboratoriais isoladas dos portadores de LES ativo, em Fortaleza, nos hospitais HUWC e HGCC, no período de 1995 a 1997.

Tabela 18. Distribuição dos portadores de LES em função do tempo de doença, em Fortaleza, nos hospitais HUWC e HGCC, no período 1995 a 1997, segundo a presença ou ausência dos anticorpos anti-nucleossoma e anti-dsDNA.

Tabela 19. Distribuição dos portadores de LES em função do tempo de tratamento, em Fortaleza nos HUWC e HGCC, no período de 1995 a 1997, segundo a presença ou ausência dos anticorpos anti-nucleossoma e anti-dsDNA.

Tabela 20. Média dos títulos séricos dos anticorpos anti-nucleossoma e anti-dsDNA, expressa em densidade óptica, em portadores de LES, em Fortaleza nos hospitais HUWC e HGCC, no período de 1995 a 1997, em função da presença ou ausência de tratamento.

Tabela 21. Distribuição dos portadores de LES em função do tempo de doença e do tipo de tratamento, em Fortaleza, nos hospitais HUWC e HGCC, no período de 1995 a 1997, segundo a presença ou ausência dos anticorpos anti-nucleossoma e anti-dsDNA.

Tabela 22. Distribuição dos portadores de LES em função do tempo de tratamento e tipo de tratamento, em Fortaleza, nos hospitais HUWC e HGCC, no período de 1995 a 1997, segundo a presença ou ausência dos anticorpos anti-nucleossoma e anti-dsDNA.

Tabela 23. Valores médios de SLEDAI, média dos títulos dos anticorpos anti-nucleossoma e anti-dsDNA obtidos na primeira (1) e na segunda(2) avaliação de 28 portadores de LES em Fortaleza, nos hospitais HUWC e HGCC, no período de 1995 a 1997, segundo a mudança ou manutenção da atividade clínica.

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1 .** Critérios revisados para a classificação do Lúpus Eritematoso Sistêmico.
- Quadro 2.** LACC (*The Lupus Activity Criteria Count*).
- Quadro 3.** SLEDAI (*Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index*)
- Quadro 4.** Classificação histológica da biópsia renal segundo critérios da OMS em portadores de LES, em Fortaleza, nos hospitais HUWC e HGCC, no período de 1995 a 1997.

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1 .** Critérios revisados para a classificação do Lúpus Eritematoso Sistêmico.
- Quadro 2.** LACC (*The Lupus Activity Criteria Count*).
- Quadro 3.** SLEDAI (*Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index*)
- Quadro 4.** Classificação histológica da biópsia renal segundo critérios da OMS em portadores de LES, em Fortaleza, nos hospitais HUWC e HGCC, no período de 1995 a 1997.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Títulos séricos dos anticorpos anti-nucleossoma, expressos em D.O., nos grupos de portadores de Lúpus Eritematoso Sistêmico, de Glomerulopatia Primária, de Artrite Reumatóide e em doadores voluntários de sangue. O ponto de corte para positividade (—) foi determinado pela soma da média dos valores obtidos em doadores de sangue mais três desvios padrões.

Figura 2. Títulos séricos dos anticorpos anti-dsDNA, expressos em D.O., nos grupos de portadores de Lúpus Eritematoso Sistêmico, de Glomerulopatia Primária, de Artrite Reumatóide e em doadores voluntários de sangue. O ponto de corte para positividade (—) foi determinado pela soma da média dos valores obtidos em doadores de sangue mais três desvios padrões.

Figura 3. Correlação entre títulos séricos de anticorpos anti-nucleossoma e SLEDAI, avaliada pelo coeficiente de correlação de Pearson.

Figura 4. Correlação entre títulos séricos de anticorpos anti-nucleossoma e LACC, avaliada pelo coeficiente de correlação de Pearson.

Figura 5. Correlação entre títulos séricos dos anticorpo anti-dsDNA e SLEDAI, avaliada pelo coeficiente de correlação de Pearson.

Figura 6. Correlação entre títulos séricos dos anticorpos anti-dsDNA e LACC, avaliada pelo coeficiente de correlação de Pearson.

Figura 7. Distribuição dos portadores de Lúpus Eritematoso Sistêmico segundo o número de anticorpos presentes em função da atividade.

Figura 8. Distribuição dos portadores de Lúpus Eritematoso Sistêmico em função do tipo de anticorpo e segundo o número de anticorpos presentes , incluindo-se a pesquisa de anticorpos anti-histona.

Figura 9. Distribuição dos portadores de Lúpus Eritematoso Sistêmico em função da atividade e segundo o número de manifestações clínicas e laboratoriais presentes.

Figura 10. Distribuição dos portadores de Lúpus Eritematoso Sistêmico em função do tempo de doença e segundo a presença dos anticorpos.

Figura 11. Correlação entre a variação do SLEDAI e a variação dos títulos séricos dos anticorpos anti-dsDNA (D.O) em 28 portadores de Lúpus Eritematoso Sistêmico, submetidos a uma segunda avaliação.

Figura 12. Correlação entre a variação do SLEDAI e a variação dos títulos séricos dos anticorpos anti-nucleossoma (D.O) em 28 portadores de Lúpus Eritematoso Sistêmico, submetidos a uma segunda avaliação.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACR - *American College of Rheumatology*

ABTS – Azinobis (3-etilbenzotiazolina ácido sulfônico)

AR - Artrite Reumatóide

BILAG – *British Isles Lupus Assessment Group*

BXSB - Cepa de camundongo espontaneamente lúpico

CREST - Condrocálcinose, fenômeno de Raynaud, alterações esofageanas, esclerodactilia e telangiectasias.

CaCl₂ - Cloreto de Cálcio

D.O. – Densidade Óptica

DNA – Ácido desoxiribonucleico

dsDNA – Ácido desoxiribonucleico de dupla fita

EDTA - ácido etilendiaminotetracético

ELISA – *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*

FAN - Fator anti-nuclear

GP - Glomerulopatia Primária

HUWC – Hospital Universitário Walter Cantídio

HGCC – Hospital Geral Dr. César Cals

HLA - *Human Leukocytes Antigens* – antígenos do sistema principal de histocompatibilidade

IFI - Imunofluorescência indireta

IL - Interleucina

INF- γ - Interferon gama

INSERM – *Institut Nationale de la Santé et Recherche Médicale*

KCl – Cloreto de Potássio

LACC – *The Lupus Activity Criteria Count*

LES – Lúpus Eritematoso Sistêmico

MRL - Cepa de camundongo espontaneamente lúpico

M - Molar

mM – milimol

ml - mililitro

nm - nanômetro

NaOH – hidróxido de sódio

NaCl – cloreto de sódio

NP40 - Nonilfenoxipolietoxietanol

NZB – *New Zealand Black*

NZW – *New Zealand White*

nRNP – Ribonucleoproteína nuclear

OMS - Organização Mundial da Saúde

PBS - Salina tamponada com fosfato

Pmsf – Fenilmetilsulfonil fluoreto

RPMI - solução de aminoácidos para cultura de células e tecidos

RNP - Ribonucleoproteína

rRNP – Ribonucleoproteína ribossomal

rpm – rotações por minuto

SLAM – *Systemic Lupus Activity Measure*

SLEDAI – *Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index*

ssDNA – Ácido desoxiribonucleico de única fita

SNF1 - Cepa de camundongo lúpico, híbrido.

Th - Linfócitos T *helper*

Tris - Trishidroximetimetilamino

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

TPTA – Tempo parcial de tromboplastina ativada

Tween – Polioxietilenosorbitam

VHS - Velocidade de hemossedimentação

VDRL (*Veneral Disease Research Laboratories*) – teste sorológico para
detecção de sífilis

μg - micrograma

μl - microlitro

RESUMO

Estudos mais recentes sobre a patogenia do LES sugerem que o nucleossoma, a unidade fundamental da cromatina, seja o principal antígeno desencadeador da resposta autoimune nesta patologia. Por muitos anos este papel foi atribuído ao DNA, principalmente devido à constatação de que a presença de anticorpos anti-dsDNA estava associada a períodos de atividade do lúpus, sobretudo às recidivas de nefrite. Verificou-se entretanto, em experimentos animais e em investigações clínicas, que a hipótese de ser o DNA o principal imunógeno não satisfazia completamente a todas as observações. Tentativas de imunização de animais com DNA isolado foram infrutíferas e a perfusão de complexos imunes formados artificialmente com DNA e anti-dsDNA não reproduziram a doença. Além disso, em vários modelos, incluindo camundongos espontaneamente lúpicos e também em humanos, se tem verificado a ocorrência de formas graves do LES sem que se constate a presença dos anticorpos anti-dsDNA. Nos estudos em que outros elementos da cromatina, sobretudo o DNA associado a histonas - o nucleossoma, foram injetados em animais predispostos ao lúpus, ficou claramente demonstrada uma exacerbação da resposta autoimune com surgimento de nefrite em alguns camundongos. Fica assim evidente que essa molécula possui um papel fundamental na estimulação da célula T patogênica, iniciando o processo de desregulação imunológica observado no LES. Fortalecendo essa hipótese, se constatou também que o DNA circulava no sangue desses indivíduos sob forma de nucleossomas, liberados por um provável distúrbio da apoptose, sugerida em alguns estudos. A identificação de material nuclear em tecido renal humano e a presença de anticorpos anti-nucleossoma em eluatos de rim sugerem igualmente que possam exercer um efeito nefritogênico.

Diante dessas evidências iniciais sugerindo um papel primordial do nucleossoma na fisiopatogenia do LES, elaboramos um estudo clínico para avaliar o valor dos anticorpos anti-nucleossoma no diagnóstico do LES, sua correlação com os índices de atividade da doença, a sua associação com manifestações clínico-laboratoriais, principalmente a nefrite em atividade, associação com o tempo de doença, o tempo de tratamento e o tipo de terapêutica empregada. Realizamos um estudo de coorte transversal, reunindo 71 portadores de LES, 64 mulheres e 07 homens, com média de idade=30,01±11,48 anos e tempo médio de doença=37,7±47,87 meses, internados ou atendidos em ambulatórios do Hospital Universitário Walter Cantídio e Hospital Geral Dr. César Cals, durante o período de março de 1995 a novembro de 1997. Todos os pacientes preenchem pelo menos 4 critérios, do Colégio Americano de Reumatologia (ACR) para diagnóstico do lúpus e foram classificados segundo a atividade da doença através de dois índices SLEDAI e LACC. 63,4% deles encontravam-se com doença ativa e 77,4% apresentavam envolvimento renal como definido pelos critérios do ACR. As amostras de sangue foram obtidas para pesquisa dos anticorpos anti-nucleossoma, anticorpos anti-dsDNA e anticorpos anti-histonas, através do método imunoenzimático (ELISA). Valores normais para esses testes foram definidos num grupo de doadores voluntários de sangue, sendo também analisado soro de portadores de artrite reumatóide e de glomerulopatia primária para cálculo da sensibilidade e da especificidade dos anticorpos. A comparação entre os grupos mostrou que os títulos dos anticorpos anti-nucleossoma e anti-dsDNA estiveram significativamente mais elevados nos portadores de LES que nos demais indivíduos ($p<0,0001$). A sensibilidade dos anticorpos anti-nucleossoma foi de 71,8%, significativamente superior à de 43,6% observada para os anticorpos anti-dsDNA ($p<0,0001$). Entretanto, a sua especificidade foi de 84,2%, inferior à registrada para o anti-dsDNA, 94,7% ($p<0,009$). Os títulos dos anticorpos anti-nucleossoma apresentaram correlação com os índices de atividade da doença SLEDAI e LACC ($r=0,486$, $p<0,0001$; $r=0,536$, $p<0,0001$, respectivamente) assim como os títulos dos anticorpos anti-dsDNA ($r=0,449$, $p<0,0001$; $r=0,488$, $p<0,0001$, respectivamente). Essa correlação foi confirmada em 28 pacientes submetidos a uma segunda pesquisa de anticorpos e nova avaliação da atividade lúpica (anti-nucleossoma $r=0,573$, $p=0,001$ e anti-dsDNA: $r=0,518$, $p=0,004$).

Entre os pacientes que apresentavam anticorpos anti-nucleossoma, 10% deles mostravam reatividade isolada, sem a concomitância dos outros anticorpos, confirmando os relatos de outros pesquisadores sobre a presença de anticorpos anti-nucleossoma restritos. Os anticorpos anti-nucleossoma estiveram presentes em 25% dos pacientes com doença inativa, enquanto que apenas 3,2% destes indivíduos apresentavam o anticorpo anti-dsDNA. A presença dos anticorpos anti-nucleossoma, ao contrário dos anticorpos anti-dsDNA, exibiu associação com atividade lúpica apenas no grupo com envolvimento renal ($p=0,021$), o que pode representar a confirmação de relatos experimentais de um papel nefritogênico para os anticorpos anti-nucleossoma. Nenhuma associação foi demonstrada, através de análise univariada, entre a presença de ambos os anticorpos e manifestações clínicas e laboratoriais isoladas do lúpus. Pacientes com menor tempo de doença ou de tratamento apresentaram positividade de anticorpos anti-nucleossoma ($p=0,041$ e $p=0,003$, respectivamente) e anticorpos anti-dsDNA ($p=0,001$ e $p=0,005$, respectivamente) significativamente mais elevada, enquanto que nenhuma diferença foi observada entre os indivíduos tratados ($n=58$) e não tratados ($n=13$). Os pacientes em uso de corticosteróide como terapêutica única e com tempo de doença ou tempo de tratamento inferior a 6 meses, apresentavam positividade de anticorpos anti-nucleossoma ($p=0,034$ e $p=0,016$, respectivamente) e anticorpos anti-dsDNA ($p=0,001$ e $p=0,003$) significativamente superior em relação àqueles doentes ou tratados há pelo menos 6 meses. Entre os pacientes em uso de terapêutica combinada de imunossupressor e corticosteróide não foram observadas diferenças quanto à presença dos anticorpos, independente do tempo de doença ou de tratamento. A pesquisa de anticorpos anti-nucleossoma, além de contribuir para uma melhor compreensão sobre a patogenia do LES, pode representar também um importante recurso diagnóstico, notadamente por apresentar maior sensibilidade em comparação aos anticorpos anti-dsDNA, manter boa especificidade e exibir correlação com a atividade clínica da doença, sobretudo nos pacientes com nefrite lúpica, além da possibilidade de serem os únicos anticorpos anti-cromatina presentes.

SUMMARY

More recent studies on the pathogenesis of SLE suggest that the nucleosome, chromatin's main structure, might be the antigen playing a leading role in the development of the immune response in lupus. For several years this place had been assigned to DNA, mainly due to the fact that anti-dsDNA antibodies were found to be associated with lupus activity, specially in relapsing nephritis. Observations driven from experimental animal studies and clinical investigations as well, further indicated that the hypothesis of being DNA the main immunogen in SLE could no longer be maintained. Attempts to immunize animals with isolated DNA did not succeed, and infusion of artificially built DNA-anti-dsDNA immune complexes failed to mimic disease. In addition, in several models, including mice strains bearing spontaneous LES, and in humans, severe forms of lupus have been observed without the detection of anti-dsDNA antibodies. In the studies where other components of chromatin, specially histones-bound DNA, the nucleosome, were injected in pre-immune animals, this led to an exacerbation of the auto-immune response and to nephritis development. It becomes thus evident that nucleosomes play a key role in the stimulation of the pathogenic T-cell and in the development of immune dysregulation observed in LES. An additional argument favouring this hypothesis is the observation that DNA circulates in the blood of these individuals under the form of nucleosomes derived from a disturbed apoptosis process, as suggested by some studies. The identification of nuclear material in human renal tissue and the finding of anti-nucleosome antibodies in kidney eluates additionally suggest that a nephritogenic role may be exerted by the nucleosome. In face of this evidence suggesting a primordial role for the nucleosome in the pathogeny of lupus, a clinical study was undertaken in order to evaluate the value of anti-nucleosome antibodies in LES diagnosis, its correlation with disease activity indexes, association with clinical and laboratory parameters, specially nephritis, length time of disease, type and length of treatment. We performed a cohort study including 71 patients with LES, 64 women and 7 men, mean age=30,01±11,48, mean time of disease=37,7±47,87 months, treated at Hospital Universitário Walter Cantídio and Hospital Geral Dr. César Cals, from March 1995 to November 1997. All the patients fulfilled at least four criteria of the American College of Rheumatology for the diagnosis of lupus and disease was classified according to two activity indexes, SLEDAI and LACC. 63.4% of the patients showed active lupus and 77.4% of them had renal involvement. Blood samples were drawn in order to determine anti-nucleosome, anti-dsDNA and anti-histones antibodies titers, through ELISA. Normal values for these tests were established from a group of volunteer blood donors (mean value + 3 x standard deviations) and the tests were also performed in rheumatoid arthritis patients and in patients with primary glomerular disease in order to calculate its sensitivity and specificity. Comparison between groups showed that anti-nucleosome and anti-dsDNA antibodies titers were significantly higher in lupus patients than in the other groups ($p < 0.0001$). Sensitivity of the antinucleosome antibody was 71.8%, greater than the 43.6% value found for the anti-dsDNA antibody ($p < 0.0001$). On the other hand, its specificity, 84.2%, was lower than the one observed for the anti-dsDNA antibody ($p < 0.009$). Serum levels of both antibodies correlated to disease activity indexes (anti-nucleosome and SLEDAI: $r = 0,486, p < 0,001$; anti-nucleosome and LACC: $r = 0,536, p < 0,001$; anti-dsDNA and SLEDAI: $r = 0,449, p < 0,0001$; anti-dsDNA and

LACC: $r=0,488, p<0,0001$) and this correlation was further confirmed in 28 patients who underwent a second clinical and laboratory evaluation (anti-nucleosome and SLEDAI: $r=0,573, p=0,001$; anti-dsDNA and SLEDAI: $r=0,518, p=0,004$). In 10% of the patients in whom antinucleosome antibodies were found this was shown to be an exclusive reactivity; other antibodies were not detected, thus confirming previous findings from other authors of nucleosome restricted antibodies. Antinucleosome antibodies were observed in 25% of the patients with inactive lupus, whilst anti-dsDNA antibodies occurred in only 3.2% of them. In opposition to anti-dsDNA antibodies, the finding of antinucleosome antibodies only showed association to lupus activity in the group presenting renal involvement. This may represent the clinical equivalent of experimental evidence that points out the nephritogenic role of antinucleosome antibodies. Significantly higher positivity rates of both antibodies were observed in patients with shorter length of disease or shorter treatment duration (anti-nucleosome: $p=0,041$ and $p=0,003$ respectively ; anti-dsDNA: $p=0,001$ and $p=0,005$ respectively), but no differences were noted between treated ($n=58$) and untreated ($n=13$) patients. Patients on steroid therapy alone and with length of disease and treatment duration shorter than 6 months presented higher serum levels of both antibodies (anti-nucleosome: $p=0,034$ and $p=0,016$, respectively ; anti-dsDNA: $p=0,001$ and $p=0,003$, respectively) as compared to patients who had been treated for at least 6 months. No differences regarding the presence of both antibodies were noticed in patients whose therapy combined steroids and immunosuppressors, regardless of length of disease or treatment duration. The search for antinucleosome antibodies not only leads to a better comprehension of LES pathogeny but it may also become an important diagnostic tool, specially for its higher sensitivity compared to anti-dsDNA antibody, good specificity and correlation with activity indexes, especially in patients bearing lupus nephritis, and also because antinucleosome antibodies may be the only anti-chromatin antibodies detected in lupus.

INTRODUÇÃO

1.1 HISTÓRICO

O termo Lúpus, do latim lobo, foi introduzido no vocabulário médico por Rogerius, no século XIII e usado para descrever uma lesão erosiva facial que se assemelhava a uma mordida de lobo, destruindo agressiva e profundamente as camadas cutâneas (BLOTZER, 1983).

A história dessa patologia pode ser dividida em três períodos: o clássico, o neoclássico e o moderno (HOCHBERG, 1991). No primeiro período, as lesões cutâneas foram descritas e classificadas como lúpus *vulgaris*, lúpus *profundus*, lúpus discóide e lesão malar em asas de borboleta, por Thomas Bateman, Cazenave e Moriz Kaposi, todos no século XIX . O período neoclássico se inicia em 1872 com a observação de Kaposi sobre a natureza sistêmica da doença, propondo a ocorrência de duas formas de apresentação: a discóide e a disseminada. Nesta época foram identificados os primeiros sinais e sintomas presentes na forma sistêmica, como os nódulos subcutâneos, a artrite, a linfadenopatia, a febre, a perda de peso, a anemia e o acometimento do sistema nervoso central. Em 1895, Osler sugeriu em suas publicações que o lúpus se tratava de uma vasculite (ROTHFIELD , 1989) e os estudos realizados por JADASSOHN, em Viena, em 1904, confirmaram a existência da forma disseminada.

Na primeira metade do século XX florescem os estudos patológicos e são feitas as primeiras correlações clinico-patológicas. Libman e Sacks identificaram a existência de uma endocardite valvar e mural de

natureza não infecciosa, relacionada ao lúpus (LIBMAN & SACKS, 1924) e em 1935, Baehr, Klemperer e Schifrin descreveram a lesão glomerular assimilada à alça de arame, nos pacientes com glomerulonefrite (BAEHR et al., 1935). Com esses achados, KLEMPERER et al. (1941) sugeriram que o lúpus constituía uma patologia do colágeno, termo inapropriadamente usado por muitos anos.

Em 1936 Friedberg, Gross e Wallach fizeram o diagnóstico pós-*mortem* dos primeiros casos de doença sistêmica sem achados cutâneos e, em 1948, com a descoberta da célula LE por Hargraves (HARGRAVES et al, 1948), se inicia o período moderno , quando se associou pela primeira vez a presença dos autoanticorpos à etiopatogenia da doença.

Alguns testes imunológicos descobertos posteriormente nos anos cinquenta como, por exemplo, o VDRL (MOORE & LUTZ, 1955), foram associados ao LES e a detecção de um resultado falso positivo ainda hoje mantém importância clínica por se relacionar à presença dos anticorpos anti-fosfolípidos. Em 1957 foi descrita a técnica de imunofluorescência para detecção dos anticorpos anti-nucleares (FRIOU, 1957) e, a partir de então, diversos investigadores independentes identificaram os anticorpos anti-DNA (DEICHER et al., 1959) . A aplicação da imunofluorescência para detecção dos anticorpos anti-DNA se intensificou a partir de 1968 com a descoberta da técnica de Farr, capaz de isolar o anticorpo anti-DNA nativo. Posteriormente, foram identificados outros anticorpos contra diversos antígenos nucleares, entre eles os anticorpos anti-ENA,(*anti-extract nuclear antigens*), expandindo-se o número de testes imunológicos empregados na avaliação do Lúpus (TAN & KUNKEL, 1966).

1.2 EPIDEMIOLOGIA

Os estudos epidemiológicos sobre o LES mostram que existe uma prevalência variável desta patologia nos diferentes países e que alguns grupos étnicos e raciais parecem ser mais susceptíveis. Além dos fatores genéticos, a influência ambiental parece ser importante. Entre os chineses que habitam na China se observa uma maior prevalência do lúpus do que naqueles residindo nos Estados Unidos. Na África ele é raramente observado, sendo contudo encontrado entre americanas de origem africana, habitantes de Nova Iorque e São Francisco, com uma prevalência quatro vezes maior do que a relatada em suas comunidades de origem.(FESSEL, 1988).

Na Europa, especificamente na França, esta patologia é mais frequente entre os imigrantes portugueses, espanhóis, norte-africanos e italianos. No Havaí , é vista mais comumente entre os orientais e polinésios (ROTHFIELD, 1989) . No Brasil não existem dados apropriados sobre a sua incidência e prevalência.

Estima-se que a prevalência do LES no mundo varia de 4 a 250 casos por 100.000 habitantes (LAWRENCE et al., 1989), e esta larga variação reflete as diferenças observadas entre as diversas populações estudadas. É uma doença mais comum na zona urbana que na rural, mais frequente no sexo feminino, provavelmente por uma influência hormonal ainda não bem elucidada. Em crianças, onde esse efeito hormonal é mínimo, a proporção de mulheres em relação aos homens é de 1,4 - 5,8:1,0, enquanto

que nos adultos varia de 8-13:1 (WALLACE & DUBOIS,1987) . O surgimento da sintomatologia ocorre preferencialmente entre 16 e 55 anos em 65% dos pacientes (ROTHFIELD, 1981), mas também pode surgir em vinte por cento dos menores de 16 anos (SCHALLER, 1982) e em quinze por cento dos maiores de 55 anos (BALLOU, 1982). Em alguns países europeus, como Suécia, Reino Unido e Islândia existe uma variação no pico de incidência do LES, observando-se um maior número de casos entre mulheres mais idosas, ao contrário dos relatos americanos em que o LES ocorre predominantemente entre mulheres em idade fértil (HOPKINSON, 1992).

O quadro clínico é mais severo nas crianças, com uma maior incidência de nefrite, pericardite, hepatoesplenomegalia e anormalidades hematológicas (SCHALLER, 1982) e, nos homens, há uma maior tendência à doença renal e à trombocitopenia (KAUFMAN et al., 1989). Nos idosos a doença tem geralmente menor gravidade (WARD & POLISSON, 1989) . A cor negra parece ser um fator de pior prognóstico (REVEILLE e al., 1990) e há relatos de que o baixo nível sócio-econômico predispõe e influencia o curso clínico da doença, como também a sobrevida dos pacientes com LES (CALLAHAN & PINCUS, 1990), embora nem todos os pesquisadores tenham registrado esta associação (SIEGEL & SEELLENFREUND, 1965 ; ESDAILE et al., 1988).

1.3 ETIOPATOGENIA

A etiologia do LES é provavelmente multifatorial e parece estar relacionada a uma interação de diversos fatores genéticos, infecciosos, hormonais, ambientais e imunológicos. Os estudos populacionais registram a importância da predisposição genética pela presença de uma segregação familiar (SHOENFELD et al., 1992) e por um índice de concordância de 30 a 50% entre gêmeos monozigóticos (BLOCK et al., 1975 ; DEAPEN et al., 1986). Estima-se que entre irmãos a ocorrência da doença possa ser vinte vezes maior que na população geral e que cinco a doze por cento dos outros parentes possam ser afetados (ARNET, et al. 1984). Contudo, ainda não se conseguiu determinar que região do código genético estaria envolvida, mas acredita-se que sua origem é poligênica, com transmissão desconhecida e provavelmente não mendeliana. Alguns marcadores genéticos são observados com maior frequência que na população geral, como os antígenos HLA-B8 (SCHUR et al., 1982), HLA-DR2 (ARNETT et al., 1984), HLA-DR3 (SCHUR et al., 1990) e HLA-DQw1 (FRONEK et al, 1990).

O lúpus é uma patologia que se caracteriza pela presença de vários anticorpos, dirigidos principalmente contra antígenos presentes nos núcleos celulares, notadamente as histonas (FRITZLER & TAN, 1978 ; THOMAS et al., 1984 ; KRIPNNER et al., 1984 ; GOHILL et al., 1985 ; PORTANOVA et al., 1987), o DNA de dupla hélice, o DNA de hélice única (ARANA & SELIGMANN, 1967 ; TAN & NATALI, 1970 ; SCHWARTZ & STOLLAR, 1985), o antígeno Sm e as partículas ribonucleicas

(NORTHWAY & TAN, 1972) . Alguns anticorpos são meros marcadores da doença, enquanto outros apresentam um potencial patogênico. Embora as causas dessa produção de autoanticorpos não sejam claras, existem evidências de hiperatividade de linfócitos B e de participação de linfócitos T auto-reativos, estimulando seletivamente as células B na produção de anticorpos anti-DNA patogênicos (DATTA et al., 1987 ; MOHAN & DATTA , 1995). Estudos em murinos, especialmente com camundongos das linhagens NZB, MRL/lpr e BXSB (MOUTSOPOULOS et al., 1977 ; COHEN & ZIFF, 1977; IZUI et al., 1978 ; KLINMAN & STEINBERG, 1987; PERKINS et al., 1990; KLINMAN,1990; SOBEL et al., 1991 ; NEMAZEE et al. , 1991 ; MERINO et al., 1991) , e pesquisas em humanos (FAUCI & MOUTSOPOULOS , 1981 ; SAKANE et al., 1988) confirmam essa hiperatividade dos linfócitos B, mas também existem evidências de que a resposta imune no LES é mediada por linfócitos T e do tipo antígeno-dependente, por se constatar que durante a produção de autoanticorpos ocorre uma mudança da classe de imunoglobulina, do tipo IgM para IgG, como evidenciada em outras respostas de imunidade celular e pela detecção de uma expansão clonal (BURLINGAME et al., 1993). É provável portanto, que a hiperatividade observada nos linfócitos B seja consequência de uma estimulação promovida por linfócitos T.

O papel do DNA como o imunógeno responsável pela ativação dos linfócitos T auto-reativos tem sido investigado há décadas, embora nenhuma comprovação do seu potencial imunizante foi evidenciada em estudos experimentais que utilizaram deliberadamente essa molécula como indutora de autoimunidade (MADAIO et al.,1984 ; GILKESON et al.,1995). Recentemente, MOHAN et al. (1993) identificaram que linfócitos T patogênicos de camundongos espontaneamente lúpicos eram do tipo CD4+ e

a análise funcional destas células demonstrou uma especificidade para antígenos nucleossomais em aproximadamente 50% delas, o que não foi detectado em camundongos normais. Essas células CD4+ com ação específica dirigida contra antígenos nucleossomais foram identificadas essencialmente em animais predispostos ao lúpus e de forma tão precoce como um mês de vida, mesmo antes do aparecimento das manifestações auto-imunes.

A importância do nucleossoma como partícula imunogênica foi comprovada em experimentos com camundongos espontaneamente lúpicos que foram inoculados com essa molécula e que desenvolveram de forma precoce manifestações de nefrite lúpica (MOHAN et al., 1993), sendo este o maior avanço no conhecimento etiopatogênico do LES nos últimos tempos.

O nucleossoma é a estrutura fundamental da cromatina e tem a importante função de compactar o DNA no núcleo. A sua organização é a mesma em todos os eucariótipos (McGHEE & FELSENFELD, 1980), consistindo num octâmero central composto por quatro pares de histonas: H3, H4, H2A e H2B, externamente envoltos por um DNA com 146 pares de bases e uma histona H1(ARENTS et al., 1991).

Alguns estudos demonstram que o nucleossoma além de estimular a célula Th patogênica também ativa as células B de modo policlonal, aumentando ainda a produção de IL-6 , citocina importante na produção de auto-anticorpos (BELL et al., 1990 ; ATKINSON et al., 1985 ; HEFENEIDER et al., 1992). A presença do nucleossoma na corrente sanguínea dos indivíduos lúpicos tem sido demonstrada por alguns pesquisadores (LI & STEINMAN, 1989 ; RUMORE & STEINMAN, 1990 ; AMOURA et al., 1997) e é possível que esteja relacionada a um distúrbio de apoptose (TAX et al., 1995) como evidenciado em alguns experimentos

(EMLEN et al., 1994 ; SINGER et al., 1994).

A participação de citocinas no processo de auto-imunidade lúpica tem sido objeto de muitos estudos e alguns pesquisadores têm demonstrado que os linfócitos Th de camundongos SNF1 e MRL/lpr apresentam um perfil de liberação de citocinas preferencialmente do tipo Th1 (MOHAN et al., 1993 ; KLINMAN et al., 1994), que são aquelas relacionadas à produção de anticorpos de classe IgG2a (MOSMANN & COFFMAN, 1989), detectados em lesões renais desses animais (GAVALCHIN & DATTA, 1987; FISHER et al., 1988). Igualmente em camundongos lúpicos de outras linhagens, como BXSB e lpr/lpr, se identificou um aumento na liberação de IFN- γ a partir de células CD4+ (CHU et al., 1994), sendo também o IFN- γ identificado em tecido renal de pacientes com nefrite lúpica (LINKER-ISRAELI et al. 1992) , sugerindo um efeito patogênico local. Embora ainda não esteja completamente definida a importância dessas substâncias na patogenia do LES, algumas anormalidades de expressão e de indução têm sido verificadas em estudos *in vitro*, envolvendo interleucina 6 (IL-6), interleucina 10 (IL-10), interleucina 4 (IL-4), interleucina 2 (IL-2), interleucina 1 (IL-1) e fator de necrose tumoral (TNF- α) (LINKER-ISRAELLI et al., 1992). A administração de IL-2 a camundongos MRL/lpr-lpr resultou numa menor ocorrência de nefrite e de artrite nestes animais quando comparados ao controle (GUTIERREZ-RAMOS et al., 1990). Outros autores também relataram uma correlação entre a redução de IL-2 e a atividade da doença em camundongos híbridos NZB e também naqueles de linhagem MRL/lpr-lpr e BXSB (DAUPHINEE et al., 1981). Em humanos, o que se tem registrado é uma maior expressão constitucional de receptores de IL-6 e um aumento da concentração sérica de IL-6 , com ativação policlonal de células B

dependente desta citocina (LINKER-ISRAELLI et al., 1992 ; KITANI et al., 1992; SPRONK et al., 1992 ; NAGAFUCHI et al., 1993). O aumento na expressão de IL-6 pode ser determinado geneticamente (LINKER-ISRAELLI et al. , 1994) ou ser secundário a infecções, à ação de hormônios ou ainda produzido por um aumento do nucleossoma circulante (BELL et al., 1990 ; GUERNE et al., 1990). Portanto, já que as citocinas são substâncias importantes na regulação imune é provável que elas também favoreçam a manutenção dos eventos auto-ímunes anormais que ocorrem no LES.

O mecanismo mais relevante de lesão tecidual no lúpus parece ser a deposição de imunocomplexos em combinação com a ativação da cascata do complemento, para produção de efeito inflamatório local. É provável que esse mecanismo ocorra na maioria das lesões lúpicas, como vasculites, nefrite, serosites, lesões cutâneas, artrite, etc. Outra possibilidade é a existência de anticorpos dirigidos contra antígenos implantados ou que reajam de forma cruzada com epítomos teciduais . Em algumas das manifestações clínicas como, por exemplo, a neurológica, este parece ser o mecanismo principal.

Entre os diversos auto-anticorpos, o anti-dsDNA é o mais associado à patogenia do LES, principalmente porque seus títulos séricos se elevam em concomitância com a exacerbação da doença renal (FELDMAN et al., 1982 ; SWAAK et al. , 1979 et 1982 ; ter BORG et al., 1990a) e também por serem encontrados em eluatos renais de pacientes lúpicos (WINFIELD et al., 1977 ; KALUNIAN et al., 1989). Baseados nessas observações KOFFLER et al.(1971) formularam a hipótese sobre a ocorrência de complexos imunes , depositados ou implantados nos tecidos, e consideraram esta patologia como o protótipo das doenças mediadas por imunocomplexos. Entretanto, nem todos os pesquisadores conseguiram

reproduzir a agressão tecidual promovida pelo anticorpo anti-dsDNA em experimentos animais em que injetaram imunocomplexos preparados artificialmente com DNA e anti-dsDNA. Nenhuma afinidade desses complexos imunes com a membrana basal glomerular foi constatada e eles desapareceram rapidamente da corrente sanguínea, por metabolização hepática (CHUSED et al., 1972 ; EMLÉN & MANNIK, 1984). Além disso, a presença do DNA/anti-DNA na circulação é duvidosa (IZUI e al., 1977). Uma outra proposição para justificar a agressão tecidual dos autoanticorpos foi a ligação com antígenos presentes na intimidade dos tecidos, com a formação de imunocomplexo *in situ*, por reação cruzada com epítomos locais ou por deposição dos antígenos circulantes (MADAIO et al., 1987 ; FAABER et al., 1986 ; LEFKOWITH et al, 1996). A capacidade de alguns anticorpos anti-DNA monoclonais de reagirem com outros antígenos não DNA foi evidenciada por LAFER (1981), incluindo os constituintes intrínsecos da membrana basal glomerular, como o sulfato de heparan (FAABER et al.,1986 ; SUZUKI e al., 1993) e a laminina (SABBAGA e al.,1989). Entretanto, ficou demonstrado que a ligação desses anticorpos às superfícies celulares (JACOB e al., 1989), ao sulfato de heparan (TERMAAT, et al., 1990) e à laminina (TERMAAT e al., 1993) não ocorria de forma direta mas necessitava de um mediador, sendo constatado que o nucleossoma era a molécula que facilitava essa ligação (BRINKMAN et al., 1990). Com este achado, ficou também registrada a participação do nucleossoma no dano tecidual que ocorre na nefrite lúpica.

Embora a associação dos anticorpos anti-DNA com nefrite lúpica seja demonstrada por alguns investigadores (FELDMAN et al.,1982 ; ter BORG et al.,1990a) , os estudos com animais espontaneamente lúpicos,

como os camundongos da linhagem NZB/NZW e as pesquisas em humanos mostram que estes anticorpos não são necessários nem suficientes para que ocorra esta manifestação grave da doença. Há relatos da ocorrência dos anticorpos anti-dsDNA sem a presença de nefrite (YOSHIDA et al., 1981), mesmo em animais que apresentam títulos elevados de anticorpos anti-DNA (IZUI et al., 1984), havendo também registros de pacientes com nefrite em que estes anticorpos não são detectados (HECHT et al., 1976; LLOYD & SCHUR, 1981; APPEL et al., 1978). É possível que outros anticorpos estejam envolvidos na patogênese da nefrite lúpica (TERMAAT, et al., 1993) e os anticorpos anti-nucleossoma parecem exercer um papel fundamental neste processo (Van BRUGGEN et al., 1994 e 1996). Eles foram identificados em soros de pacientes lúpicos com uma frequência elevada (BURLINGAME et al., 1994; MASSA et al., 1994; CHABRE et al., 1995) e reagem com epítomos situados na estrutura quaternária do nucleossoma. Alguns desses anticorpos como, por exemplo, os dirigidos contra os dímeros H2A-H2B, com ou sem o DNA, são mais associados à nefrite em pacientes lúpicos que os anticorpos anti-dsDNA, como demonstrado por BURLINGAME (1994). A presença desses anticorpos também tem sido relatada em eluatos renais de camundongos lúpicos com proteinúria (AMOURA et al., 1994).

A existência de anticorpos reagindo com epítomos situados na cromatina também são encontrados no lúpus induzido por drogas como, por exemplo, a procainamida. Esses anticorpos são dirigidos contra sítios antigênicos localizados nos dímeros H2A-H2B e não mostram atividade anti-H2A ou anti-H2B individualmente (RUBIN et al., 1985). Em pelo menos vinte por cento dos pacientes com LES se pode detectar anticorpos com afinidade para esses mesmos epítomos (MONESTIER et al., 1992) e tais

anticorpos apresentam até maior reatividade quando o DNA está complexado ao dímero H2A-H2B para formar o chamado subnucleossoma (BURLINGAME & RUBIN, 1991)

1.4 QUADRO CLÍNICO

A apresentação clínica do LES é altamente variável e entre os órgãos mais comumente afetados estão rim, pele, articulações, sistema nervoso, superfícies serosas e elementos figurados do sangue.

Os sintomas gerais são frequentes e surgem mesmo antes das manifestações objetivas. No momento do diagnóstico a fadiga está presente em quase todos os paciente. A febre, habitualmente não elevada ocorre em 90% dos casos e a perda de peso é encontrada em 85% dos doentes.

A apresentação clínica mais comum inclui a presença de artrite ou artralguas, as lesões cutâneas de fotossensibilidade, a lesão em asa de borboleta e o eritema maculo-papular, observados em 90% dos pacientes. As queixas articulares podem preceder em meses ou anos a doença sistêmica. Existe uma predileção assimétrica para os joelhos, articulações do carpo e dos dedos, especialmente as interfalangeanas proximais. A artrite é geralmente não deformante, embora 15 a 30% dos pacientes possam apresentar deformidades de flexão com desvio ulnar e pescoço de ganso (DUBOIS & WALLACE, 1987 ; ALARCON-SEGOVIA et al., 1988). A alopecia é vista em 70% dos casos, podendo ser difusa ou em placas e, em 40% dos casos, podem ser detectadas úlceras de mucosas orais, principalmente no palato duro ou mole. A vasculite cutânea se caracteriza por lesões avermelhadas dolorosas, localizadas geralmente em polpas digitais e pés, ou em mucosas nasal e oral e ocorre em cerca de 20-30% dos pacientes, geralmente no curso de formas graves, com

envolvimento de outros órgãos. O fenômeno de Raynaud é visto em 17-30% dos pacientes (ROTHFIELD, 1981) podendo estar associado à presença de crioglobulinas. Mialgias e fraqueza muscular não são incomuns e estão presentes em cerca de 70% dos pacientes (DUBOIS & WALLACE, 1987). A fraqueza muscular envolve sobretudo os músculos proximais.

A convulsão e a psicose lúpica são as manifestações mais comuns de envolvimento do sistema nervoso central, sendo encontradas em 15 a 50% dos pacientes, principalmente no início do quadro, associadas a outros sinais de gravidade. Sintomas neuropsiquiátricos aparecem antes ou durante o curso da enfermidade (ROTHFIELD, 1981) e, entre eles, a depressão é o mais comum.

A frequência do comprometimento cardíaco é muito variável, pois depende da sensibilidade do método de investigação utilizado. A pericardite pode ocorrer em cerca de 18% a 45% dos casos e se apresenta com dor precordial, atrito pericárdico ou apenas como um achado radiológico ou ecográfico. A miocardite causa arritmias, cardiomegalias, defeitos de condução e quadros de insuficiência cardíaca congestiva. As lesões valvares não são raras (STRAATON et al., 1988). O prolapso mitral é observado em 25% dos pacientes (BARZIZZA et al., 1987) e a presença de sopros pode sugerir comprometimento de válvulas mitral e/ou aórtica. A endocardite verrucosa é principalmente um achado de autópsia.

A trombose vascular de repetição, tanto arterial como venosa, em membros ou vísceras e a elevada taxa de perda fetal estão relacionadas à síndrome de anticorpos antifosfolípidos, associada ao LES (HUGHES , 1983 ; HARRIS et al., 1983).

A manifestação gastrointestinal mais comum é a dor abdominal, que surge quase sempre em associação com evidências de atividade em outros órgãos. A arterite mesentérica pode ser a causa desta dor e uma perfuração colônica ou ileal deve ser suspeitada quando ela se localiza na região inferior do abdomen ou região periumbilical, com sinais de irritação peritoneal. A hepatomegalia ocorre em 30% dos pacientes, mais comumente em crianças, assim como a esplenomegalia é detectada em 20% dos casos (ROTHFIELD, 1989).

O envolvimento pulmonar se manifesta como derrame pleural e /ou infiltrados pulmonares bilaterais associados em 40% dos doentes. O derrame é usualmente pequeno ou moderado e o seu estudo mostra uma predominância de linfócitos. Anormalidade de difusão pulmonar é observada em 40 a 67% dos casos, sem qualquer sintomatologia (RUBIN & UROWITZ, 1983). Os pacientes que apresentam hemorragia pulmonar (EAGEN et al., 1978) têm um pior prognóstico, já que frequentemente apresentam estado mais grave com comprometimento renal concomitante.

Entre 25 e 50% dos pacientes com LES exibem anormalidade urinárias ou de função renal no início de sua doença e mais de 60% dos adultos e 80% das crianças manterão essas alterações renais tardiamente, no curso da enfermidade. A manifestação clínica predominante é a proteinúria, presente em quase todos os doentes, comumente levando à síndrome nefrótica. A hematúria microscópica é frequente, mas não costuma ocorrer isoladamente. Pacientes com nefrite lúpica mais severa também apresentam hipertensão arterial mais grave. Cerca de 50% dos pacientes apresentam insuficiência renal. A Organização Mundial da Saúde classifica as lesões glomerulares em seis tipos histológicos que reproduzimos de forma

simplificada: classe I - rim normal ; classe II – alterações mesangiais puras ; classe III – glomerulonefrite focal e segmentar ; classe IV – glomerulonefrite difusa ; classe V – glomerulonefrite membranosa difusa e classe VI – glomerulonefrite esclerosante avançada. Nas diferentes séries de biópsias renais publicadas na literatura observa-se uma distribuição semelhante nas várias classes histológicas, com mais da metade dos pacientes exibindo lesões da classe III ou da classe IV. As alterações tubulo-intersticiais são vistas em 75% dos pacientes (PARK et al., 1986) sendo observados infiltrados difusos ou focais de células inflamatórias e fibrose intersticial. Alguns estudos têm valorizado estas manifestações como indicadores de pior prognóstico na sobrevida renal. (PARK, 1986 ; ALEXOPOULOS, et al., 1990).

Quase todos os pacientes lúpicos apresentam anormalidades hematológicas, principalmente anemia leve ou moderada do tipo normocítica e normocrômica , leucopenia e/ou plaquetopenia. A elevação do VHS ocorre geralmente na fase ativa e tende a normalizar-se com a remissão. Linfadenopatia ocorre em 50% dos pacientes, com gânglios de tamanho variável, indolores, localizados principalmente nas regiões cervical, axilar e inguinal. Tendências hemorrágicas são observadas naqueles pacientes portadores de plaquetopenia ou de anticorpos dirigidos contra fatores de coagulação, principalmente os fatores VIII, IX, XI, XII e XIII .

Outros achados clínicos presentes no LES são : conjuntivite, episclerites, corpos citóides, que são exudatos retinianos durante a fase ativa da doença (STAFFORD-BRADY et al., 1988), aumento unilateral da parótida e alterações menstruais, como amenorréia ou menorragia.

1.5 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico do LES é baseado na constelação de achados clínicos e sorológicos. Em 1982 o Colégio Americano de Reumatologia (ACR) definiu 11 critérios diagnósticos mostrados no Quadro 1, que permitem a identificação da doença com uma sensibilidade de 96% e especificidade de 96 a 99% (PASSAS et al., 1985)

Quadro 1 -Critérios Revisados para a Classificação do Lúpus Eritematoso Sistêmico

1. *Rash* malar
2. *Rash* discóide
3. Fotossensibilidade
4. Úlceras Orais
5. Artrite
não erosiva envolvendo 02 ou mais juntas periféricas
6. Serosite
Pleurite ou pericardite
7. Alteração renal
Proteinúria > 0,5g/dia persistente ou cilindros hemáticos, granulares, tubulares ou mixtos
8. Alteração Neurológica
Convulsão ou psicose
9. Alteração hematológica
Anemia hemolítica, leucopenia < 4000 leucócitos em duas ou mais ocasiões, linfopenia < 1500 linfócitos em duas ou mais ocasiões ou trombocitopenia menor que 100.000 plaquetas
10. Alteração Imunológica
Célula LE, anticorpo anti-DNA nativo, anti-Sm ou falso VDRL por pelo menos 6 meses
11. FAN pela imunofluorescência

Adaptado de Tan EM, Cohen AS, Fries JF, et al: The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 25:1271-1277, 1982

A presença de quatro ou mais destes onze critérios estabelece o

diagnóstico do LES. Entretanto, a experiência clínica mostra que alguns pacientes exibem achados clínicos do lúpus sem contudo preencherem estes critérios do ACR. Estes casos são rotulados como lúpus incompleto, lúpus latente ou incipiente (PANUSH et al., 1993) e podem permanecer nesse estágio incompleto por meses ou anos.

1.5.1 TESTES PARA *SCREENING*

A pesquisa dos anticorpos anti-nucleares feita pela imunofluorescência indireta (IFI) é o exame mais solicitado universalmente para *screening* e faz parte dos critérios diagnósticos do ACR . Sua excelente sensibilidade diagnóstica (99%) torna-o bastante útil, embora sua especificidade seja de apenas 49% e seu valor preditivo positivo baixo (TAN et al., 1982), podendo ser encontrado em 70% dos pacientes com doença inativa. É um teste simples que utiliza como substrato hepatócitos de camundongo ou células de epiteloma de laringe humana Hep-2 (van MÜHLEN & TAN,1995). Há relatos de alta taxa de falsos positivos, chegando a 30% entre pessoas idosas sadias (MANOUSSAKIS et al., 1987) e 34 % de pacientes cronicamente enfermos (JUBY et al., 1994). Pode estar presente em outras doenças reumáticas como a síndrome de Sjögren, a artrite reumatóide e a esclerose sistêmica progressiva. Existem seis padrões principais de fluorescência que sugerem a presença dos diversos tipos de autoanticorpos (SENECAL et al., 1985) : 1) padrão homogêneo - registra a existência de anticorpos anti-histonas e/ou anti-dsDNA ; 2) padrão periférico - indica anticorpos contra proteínas da membrana nuclear, como laminina ou de

anticorpos anti-dsDNA, quando a cromatina inativa se situa na periferia do núcleo ; 3) padrão pontilhado nuclear - anticorpos contra antígenos não histona, podendo se apresentar como pontilhado grosseiro, indicativo de anticorpos anti-Sm e anti-U1-nRNP e pontilhado fino dos anticorpos anti-SS-A/Ro ou anti-SS-B/La ; 4) padrão nucleolar - encontrado principalmente na esclerodermia ou síndrome de *overlap*; 5) centrômero - visto na síndrome de CREST (esclerose sistêmica), indicativo de anticorpos anti-cinetocoros; 6) padrão citoplasmático - envolvendo diversos antígenos como mitocôndria, complexo de Golgi, rRNP e outros. Embora esses padrões sugiram a presença dos auto-anticorpos é importante ressaltar que não são específicos nem diagnósticos de qualquer patologia ou tipo de anticorpo, sendo necessária a confirmação através de outros testes.

GILLIAM. O *screening* dos anticorpos anti-nucleares também pode ser feito utilizando-se *kits* comercialmente disponíveis para teste imunoenzimático (ELISA). Há estudos comparativos entre os testes IFI e ELISA que mostram uma boa concordância entre eles (JASKOWSKI et al., 1996), enquanto que em outras pesquisas esta concordância foi apenas marginal (EMLEN & O'NEILL, 1997) . Foi constatada uma variabilidade de positividade entre os diferentes *Kits* ELISA utilizados, sendo visto que aqueles com maior sensibilidade para detecção apresentam um maior número de falsos positivos, enquanto que a menor proporção de falsos positivos implica na falha de detecção de alguns pacientes com diagnóstico clínico de lúpus (EMLLEN & O'NEILL, 1997). Entretanto o uso destes testes se estabelece a cada dia nos laboratórios, principalmente pela simplicidade de execução, pelo tempo e custos reduzidos e a possibilidade de automação computadorizada.

1.5.2 TESTES CONFIRMATÓRIOS

A partir de 1957, época em que foram identificados os anticorpos anti-DNA, vários estudos têm demonstrado a sua importância no diagnóstico do LES e sua boa correlação com a atividade da doença (SCHUR, P.H., 1968 ; PINCUS , 1969 ; FELDEMAN et al., 1982 ; ter BORG et al., 1990).

Trata-se de população heterogênea de anticorpos quanto ao tipo de imunoglobulina , a fixação do complemento (SONTHEIMER & GILLIAM, 1978), a avidéz de ligação antigênica (LEON et al., 1977) e a especificidade, podendo reagir com o DNA nativo (dsDNA) ou com o DNA de hélice única (ssDNA) .

Os métodos laboratoriais para detecção deste anticorpo são: a IFI, a imunodifusão, a contra-imunoelectroforese, a hemaglutinação, o radioimunoensaio e o ELISA (SPRONK et al.,1995). A IFI, que utiliza os hemoflagelos da *Crithidia lucila* como substrato, é a técnica mais específica, com a vantagem de detectar anticorpos com diferentes graus de avidéz antigênica. ELISA e o radioimunoensaio pela técnica de Farr são bastante sensíveis mas identificam anticorpos de avidéz intermediária e de alta avidéz, respectivamente (SMEENK et al., 1981 ; MILLER et al., 1981).

A presença do anticorpo anti-dsDNA, juntamente com a redução da fração C3 do complemento sérico, é virtualmente diagnóstica de LES em 100% dos pacientes com suspeita clínica. Há relatos de que a elevação nos

títulos de anti-dsDNA em concomitância com a redução do complemento é um preditor da reativação de nefrite lúpica (FELDMAN e al., 1982), embora não confirmados por outros autores que questionam o valor deste anticorpo na predição de recidiva clínica (ESDAILE et al., 1996 b).

Outro anticorpo bastante útil no diagnóstico confirmatório do LES é o anticorpo anti-Sm (CRAFT , 1992 ; TAN , 1989), identificado em 1966 por Tan e Kunkel quando estudavam o soro de uma paciente chamada Stephanie Smith, uma talentosa artista que desenvolveu lúpus na adolescência. Os antígenos correspondentes são compostos de RNA nuclear complexado a vários pequenos peptídeos imunogênicos. Sua determinação é feita por contra-imunoeletroforese, hemaglutinação passiva e ELISA (CRAFT , 1992). É um dos marcadores com especificidade de 99% (FRITZLER, 1996.), sendo incluído como um critério sorológico para a classificação da doença (TAN et al., 1982). Com sensibilidade que varia de 15-25% é encontrado frequentemente associado ao anticorpo anti-RNP e está relacionado à atividade da doença, independente da flutuação do anticorpo anti-dsDNA (YASUMA et al., 1990). Existem alguns registros que assinalam uma fraca correlação entre a presença do anticorpo anti-Sm e envolvimento do sistema nervoso central (CRAFT, 1992 ; TAN, 1989), doença renal, fibrose pulmonar e pericardite (YASUMA, 1990).

Os demais anticorpos detectados nos soros dos pacientes lúpicos não possuem a mesma importância diagnóstica daqueles já referidos anteriormente, destacando-se apenas pela associação encontrada com algumas manifestações específicas do LES . O anticorpo anti-C1q é relacionado à progressão da doença renal, à predominância de formas proliferativas nas lesões glomerulares e à amplificação da resposta inflamatória no glomérulo

(SIERGET et al.,1991). O lúpus cutâneo subagudo, a deficiência homozigótica de C2 e C4, o lúpus neonatal, a miocardite e os defeitos de condução se associam ao anti-SSA/Ro (BEN-CHETRIT, 1993). Os anticorpos anti-fosfolípídeos são associados à ocorrência de fenômenos trombóticos arteriais ou venosos, ao aborto espontâneo e à doença cerebral (HARRIS et al., 1983) e podem ser detectados em cerca de 35% a 45% dos casos, principalmente na fase ativa da doença. Dois métodos são usados rotineiramente para a sua determinação: a pesquisa do anticoagulante lúpico, geralmente feita por meio dos testes de coagulação com aumento de TPTA (tempo parcial de tromboplastina ativada), que não se corrige com a adição de plasma normal e pelo ELISA, utilizando a cardiolipina como substrato.

Waalte-Ros Menor especificidade é atribuída aos anticorpos anti-histona, comumente encontrados no LES e em outras patologias. Sua prevalência nos diversos estudos varia de 21 a 85% . Há relatos de associação com a atividade da doença em apenas algumas pesquisas (MONESTIER & KOTZIN , 1992 ; COHEN et al., 1992) e seus sítios de ligação podem ser histonas totais ou individuais .

1.5.3 OUTRAS PROVAS IMUNOLÓGICAS :

A pesquisa de células LE pode ser positiva em 90% dos pacientes em atividade e em 65% daqueles em remissão. A diminuição do complemento sérico total ou dos seus componentes como C2, C3 e C4 ocorre na doença ativa, notadamente nos casos com envolvimento renal. As crioglobulinas estão presentes em 11% dos pacientes, sendo geralmente do tipo misto IgG-IgM. O fator reumatóide, identificado através dos métodos látex e Waaler-Rose, é positivo em 20% dos casos.

1.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CLÍNICA

Sendo o LES uma doença crônica, com períodos de exacerbação e recidiva, a avaliação de sua atividade constitui uma questão central já que pode favorecer um melhor controle da doença. Um número elevado de sistemas têm sido elaborados para mensurar essa atividade, o que demonstra a grande complexidade desta patologia. Múltiplos índices de monitorização do grau de atividade são frequentemente utilizados, possibilitando classificar e comparar os pacientes nos diferentes estudos clínicos (GLADMAN et al.,1994). Entre esses incluem-se SLAM, LACC, SLEDAI, BILAG, etc. A comparação de seis desses índices feito por LIANG et al.(1989) mostrou que os escores entre eles se correlacionam bem, o que valida o seu emprego como recursos de classificação (PETRI et al., 1992).

Embora sejam úteis na investigação diagnóstica e complementem a avaliação clínica, os testes laboratoriais têm valor prognóstico controverso (ESDAILE, et al.,1996 a) . Como definido por vários autores, a associação entre as manifestações clínicas do LES e a presença de auto-anticorpos ainda é imprecisa e variável entre as diferentes séries de pacientes estudados, permanecendo ainda largamente inexplorado o valor dos testes imunológicos como instrumento de avaliação de prognóstico ou eficácia terapêutica (HARLEY & GAITHER 1988 ; CHRISTIAN, 1983). Alguns marcadores, como a presença do anticorpo anti-dsDNA e a redução do

complemento sérico, podem ser observados mesmo quando a doença está clinicamente quiescente (WALZ e BLANC et al.,1994 ; SULLIVAN et al.,1996). Pouco numerosos são os estudos que determinam a habilidade dos testes de rotina em prever recaídas. SWAAK et al . (1982 e 1986), estudando 143 pacientes com um seguimento de 6 anos, observaram a exacerbação da doença em 33 deles quando os títulos de anticorpos anti-dsDNA duplicavam nas 10 semanas precedentes à recaída. Estes autores propõem a introdução de agentes imunossupressores neste momento, como uma conduta benéfica para controle da recidiva clínica do LES. O mesmo registro foi relatado por TER BORG et al.(1990). Contrariamente, ABRASS et al. (1980) estudando 48 pacientes, num período de 6 a 18 meses, não constataram a eficácia dos anticorpos anti-dsDNA e do C3 como preditores de atividade lúpica. BUYON et al.(1992), também foram incapazes de detectar associação dessas técnicas convencionais, como títulos de anti-dsDNA e de componentes do complemento sérico (C3,C4 e CH50), com subsequente reativação da doença. Mais recentemente algumas publicações relatam o valor de outros testes especializados como preditores da atividade lúpica como, por exemplo, o aumento dos produtos de ativação do complemento no sangue e na urina (MANZI et al., 1996 ; PORCEL et al.,1995) e as alterações nos níveis plasmáticos de receptores da interleucina-2 (TER BORG et al.,1990 b.), entre outros. Embora sejam testes de interesse para o estudo fisiopatogênico do lúpus, não são usados rotineiramente na prática clínica.

1.7 TRATAMENTO

A terapêutica do LES deve ser ajustada de modo individual para cada paciente, já que a apresentação clínica e a severidade da doença são bastante variáveis. Na avaliação devem ser incluídas medidas objetivas da atividade inflamatória, testes para excluir a presença de infecções que simulem o lúpus ativo e a identificação das manifestações que serão controladas com o tratamento instituído.

Quatro princípios fundamentais devem ser considerados na escolha do tratamento do LES, sobretudo quando se opta por drogas citotóxicas: 1 – a doença é mediada pelo sistema imune ; 2 – existe um componente inflamatório ; 3 – a imunossupressão vai reduzir a atividade da doença e, 4 – os linfócitos auto-reativos deverão ser destruídos preferencialmente, como na terapia anti-neoplásica. Além das drogas imunossupressoras, anti-inflamatórios não hormonais, corticosteróides e anti-maláricos fazem parte do arsenal terapêutico nesta patologia.

Os anti-inflamatórios não hormonais são amplamente usados, principalmente para controle de manifestações leves como artrite, mialgia, febre e pleurite. A escolha da droga é baseada na resposta individual e na tolerância . Como inibem as enzimas ciclo-oxigenases podem interferir no fluxo renal aumentando o dano nos pacientes que já apresentam nefrite lúpica.

As manifestações agudas do LES respondem favoravelmente ao uso de corticosteróides, que continuam sendo a terapêutica mais importante no manuseio da doença. Podem ser utilizados por via oral ou na forma de

pulsoterapia com metilprednisolona para as manifestações severas, como por exemplo, a nefrite (BOUMPAS et al., 1992), a cerebrite, a alveolite hemorrágica, a trombocitopenia e a hemólise auto-imune (KIMBERLY, 1988).

Os anti-maláricos são úteis no tratamento das formas cutâneo-articulares e de sintomas constitucionais leves. Os mais usados são a cloroquina e a hidroxicloroquina . Geralmenté são bem tolerados, mas um controle oftalmológico periódico deve ser realizado para detecção de toxicidade retiniana.

Entre os imunossuppressores mais prescritos no LES estão a azatioprina e a ciclofosfamida. Estudos bem controlados demonstram que o uso combinado de corticosteróides e imunossupressor, especialmente o regime terapêutico que utiliza a ciclofosfamida em forma de pulsoterapia venosa é mais eficaz que a corticoterapia isolada para controle da nefrite lúpica, prevenindo a longo prazo a deterioração da função renal (BALLOW et al., 1984). Os doentes incluídos nesses estudos eram principalmente portadores de glomerulopatias de classes III e IV da classificação da OMS. Outras manifestações graves podem também se beneficiar com o uso desses medicamentos, como envolvimento do SNC (NEUWELT et al., 1995) , pneumonite (EISER & SHANIES, 1994), hemorragia pulmonar e trombocitopenia (BOUMPAS et al., 1990). Os efeitos adversos são consideráveis e incluem infecções severas, esterilidade e surgimento de neoplasias malignas. O uso de ciclofosfamida venosa com intervalo mensal é mais seguro que a administração oral contínua, já que se tem observado um menor número de complicações com este esquema.

A ciclosporina pode ser teoricamente benéfica no LES pelo seu

efeito na expansão das células T *helper*. Uma dose de 5mg/Kg ao dia produz uma boa resposta em alguns pacientes, embora a recaída seja frequente após suspensão do tratamento. As evidências são limitadas sobre o verdadeiro benefício desta droga no LES e deve-se considerar o seu potencial nefrotóxico. A ciclosporina não possui efeito sobre a redução dos títulos do anticorpo anti-dsDNA.

OBJETIVOS

2. Verificar a especificidade de uma estrutura de sequência de DNA e a especificidade de estruturas de DNA de uma estrutura de sequência de DNA para o anticorpo anti-DNA e os anticorpos anti-DNA.

2.0 OBJETIVOS

- 1 - Estudar a frequência dos anticorpos anti-dsDNA e anti-nucleossoma em 71 pacientes portadores de Lúpus Eritematoso Sistêmico, atendidos em dois hospitais públicos da cidade de Fortaleza, Hospital Universitário Walter Cantídio e Hospital Geral Dr. César Cals.
- 2 - Verificar a utilidade dos anticorpos anti-nucleossoma no diagnóstico do LES através de um estudo de sensibilidade e de especificidade, comparando os resultados com aqueles obtidos para o anticorpos anti-dsDNA e os referidos na literatura para o anticorpo anti-Sm.
- 3 - Avaliar a existência de correlação entre a presença dos anticorpos anti-nucleossoma e anti-dsDNA com dois índices de atividade da doença , SLEDAI e LACC.
- 4 - Avaliar a existência de correlação entre a variação da atividade, determinada pelo índice SLEDAI e os títulos de anticorpos num grupo de pacientes submetido a uma segunda pesquisa de anticorpos anti-nucleossoma e anti-dsDNA.

- 5 - Avaliar a existência de associação entre a presença dos anticorpos anti-nucleossoma e anti-dsDNA , a ocorrência de nefrite e de manifestações extra-renais isoladas, em função da atividade clínica.

- 6 - Investigar a ocorrência de associações dos anticorpos com manifestações clínicas e laboratoriais do LES.

- 7 - Investigar a ocorrência isolada, neste grupo de pacientes, da presença de anticorpos anti-nucleossoma, sem atividade anti-dsDNA e anti-histonas concomitantes .

- 8 - Avaliar a influência do tempo de doença , tempo de tratamento e tipo de tratamento sobre a presença dos anticorpos anti-nucleossoma e anti-dsDNA.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.0 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 PACIENTES E SOROS:

Realizamos um estudo de coorte transversal, incluindo 71 pacientes portadores de Lupus Eritematoso Sistêmico atendidos a nível ambulatorial ou internados em dois hospitais públicos da cidade de Fortaleza, Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC) e Hospital Geral Dr. César Cals (HGCC), no período de março de 1995 a novembro de 1997. Todos os pacientes preenchiam pelo menos quatro critérios do Colégio Americano de Reumatologia (ACR), revisados em 1982 (TAN e al.,1982), sendo 64 mulheres e 07 homens, com média de idade= $30,01 \pm 11,48$ anos, variando de 10 a 72 anos e tempo médio de doença= $55,5 \pm 8,35$ meses, variando de 1 a 228 meses. Por ocasião da realização de exames de rotina, solicitados pelo médico assistente, amostras de 10 ml de sangue não heparinizado foram colhidas através de punção de veia periférica para pesquisa dos anticorpos anti-nucleossoma e anti-dsDNA. Os soros foram congelados a -20°C até a titulação dos anticorpos e a eliminação do complemento foi feita por aquecimento a 56°C no momento da realização do teste, no Laboratório do INSERM 25, Hospital Necker, Paris, França.

Dados de identificação, história clínica, resultado de exames laboratoriais e informações sobre o tratamento prescrito foram obtidos de registros do prontuário. O tempo de doença foi estimado a partir do

aparecimento da primeira sintomatologia incluída nos critérios diagnósticos do ACR, segundo informações da história clínica e o tempo de tratamento, a partir do momento em que foram prescritas drogas visando o controle do LES. Treze pacientes não haviam recebido tratamento quando foram incluídos no estudo.

Os pacientes foram classificados conforme a atividade clínica e a ocorrência de nefrite. O comprometimento renal foi definido pelos critérios do ACR (TAN e al., 1982) e/ou presença de hemácias (≥ 5 /campo) no sumário de urina, excluindo-se outras causas, e/ou perda de função renal (creatinina $> 1,2$ mg/dl), excluindo-se outras causas, e/ou por alteração histopatológica em material de biópsia. A avaliação da atividade foi feita empregando-se dois índices validados na literatura: LACC - *Lupus activity control* e SLEDAI - *Systemic lupus erythematosus disease activity index*, detalhados nos Quadros 2 e 3, modificados pela exclusão do anticorpo anti-DNA, objeto de avaliação deste estudo. A classificação dos pacientes em ativos e inativos foi feita através dos critérios do LACC. A mensuração da severidade do lúpus foi estabelecida segundo SLEDAI, que foi também o índice utilizado para comparação do grau de atividade entre os pacientes submetidos a uma segunda avaliação clínica e laboratorial.

Nesse grupo de 28 pacientes, uma segunda amostra de sangue foi colhida com um intervalo que variou de 1 a 23 meses (média= $10,57 \pm 7,12$ meses) quando novos índices de atividade foram atribuídos.

Quadro 2 -LACC (*The Lupus Activity Criteria Count*)

VARIÁVEIS	DEFINIÇÕES
1. artrite	Artrite não erosiva envolvendo 02 ou mais articulações periféricas, caracterizada por dor, edema ou efusão
2. testes laboratoriais anormais célula LE leucopenia < 4000/mm ³ complemento CH50 reduzido complemento C3 reduzido anticorpo anti-DNA	CH50 e C3 reduzidos representam menos que 02 desvios padrões abaixo da média do valor normal Anti-DNA medido pela técnica de Farr com uma ligação maior que 25% do normal
3. <i>Rash</i> , úlceras mucosas, alopecia	Aparecimento de um novo <i>rash</i> , novas úlceras ou alopecia, ou piora dos já existentes
4. Pleurite e pericardite	Pleurite – história convincente de dor pleurítica ou atrito pleural identificado por um médico. Evidência de derrame pleural. Pericardite – atrito detectado por um médico ou alterações sugestivas no ECG ou evidências de derrame pericárdico
5. Convulsões, psicose, síndrome cerebral orgânica, cefaléia lúpica	Convulsões, psicose e síndrome cerebral orgânica na ausência de drogas ou distúrbios metabólicos Cefaléia lúpica – cefaléia severa não usual, intratável e não responsiva aos analgésicos comuns.
6. Vasculite	Vasculite – ulceração de pele ou de dedos ou biópsia mostrando vasculite
7. Hematúria	Hematúria ≥ 5 hemácias/campo

* doença ativa – 02 ou mais variáveis

Quadro 3 - SLEDAI (*SYSTEMIC LUPUS ERITHEMATOSUS DISEASE ACTIVITY INDEX*)

PESO	DESCRITOR	DEFINIÇÃO
8	Convulsão	Recente aparecimento. Excluídas causas metabólicas, infecciosas ou medicamentosa.
8	Psicose	Distúrbio da percepção da realidade, alucinações, incoerência, perda de associações, pensamento ilógico, desorganizado ou catatônico. Excluir uremia ou drogas
8	Síndrome cerebral orgânica	Alteração da função mental com distúrbio da orientação, memória ou outras funções intelectuais.
8	Distúrbio visual	Alterações retinianas. Corpos citóides, hemorragias, exsudatos, hemorragia na coróide ou neurite óptica. Excluir hipertensão, infecção ou outras causas.
8	Desordem de nervo craniano	Neuropatia sensorial ou motora de nervos cranianos de aparecimento recente
8	Cefaléia lúpica	Cefaléia persistente, severa, enxaquecosa mas não responsiva a analgesia com narcóticos
8	AVC	Acidente cerebrovascular recente. Excluir arteriosclerose
8	Vasculite	Úlceras, gangrenas, nódulos digitais dolorosos, infarto periungueais, <i>splinter</i> , biópsia ou angiografia compatível com vasculite
4	Artrite	Mais que 02 articulações com sinais de inflamação
4	Miosite	Fraqueza de mialgia de músculos proximais com elevação da CPK e ou aldolase ou alterações eletromiográficas ou biópsia mostrando miosite.
4	Cilindros urinários	Cilindros hemáticos
4	Hematúria	Mais que 5 hemácias por campo. Excluir cálculos, infecção ou outra causa
4	Proteinúria	Maior que 500mg/24h. Aparecimento recente ou elevação de mais de 500mg /24h
4	Piúria	Maior que 5 piócitos/campo. Excluir infecção.
2	Novo rash	Aparecimento recente ou recorrência do rash inflamatório
2	Alopécia	Aparecimento recente ou recorrência de queda de cabelo em placa ou difusa.
2	Úlceras mucosas	Úlceras orais ou nasais de aparecimento recente ou recorrente
2	Pleurite	Dor torácica pleurítica com atrito ou derrame pleural ou espessamento de pleura.
2	Pericardite	Dor com pelo menos 1 dos seguintes achados :atrito, derrame ou confirmação eletrocardiográfica/ecocardiográfica
2	Redução do complemento	Diminuição do CH50, C3 ou C4 abaixo do limite normal
2	Títulos elevados de anti-DNA	Ligação maior que 25% pela técnica de Farr ou títulos acima do normal para o teste laboratorial empregado
1	Febre	Maior que 38°C. Excluir infecção.
1	Trombocitopenia	<100.000 plaquetas/mm ³
1	Leucopenia	< 3000 leucócitos/mm ³ . Excluir outras causas.

O grupo controle definido para determinação dos níveis de normalidade de cada teste foi constituído de 26 doadores voluntários de sangue cadastrados no Centro de Hemoterapia do Ceará (HEMOCE), sendo a determinação do ponto de corte (*cut-off*) obtida pela média dos títulos de anticorpos acrescida de três desvios padrões.

A mesma metodologia foi empregada após obtenção de soro de dois outros grupos de pacientes, 32 portadores de artrite reumatóide (AR) e 18 portadores de glomerulopatia primária (GP). Os portadores de AR encontravam-se em seguimento ambulatorial no Serviço de Reumatologia do HUWC e preenchiam critérios clínicos para o diagnóstico de AR em atividade. Os portadores de GP, que se encontravam em acompanhamento no Serviço de Nefrologia do HUWC, tinham diagnóstico histológico definido e não apresentavam doença sistêmica. A determinação dos níveis séricos dos anticorpos nesses três grupos teve por finalidade a definição da sensibilidade e da especificidade dos anticorpos anti-dsDNA e anti-nucleossoma no grupo de pacientes lúpicos.

3.2 OBTENÇÃO DE ANTÍGENOS

3.2.1 PREPARAÇÃO DA CROMATINA E DE MONONUCLEOSSOMAS

A cromatina foi preparada no Laboratório da Unidade 25 do INSERM – *Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale*, Hospital Necker, Paris, França, utilizando células eritroleucêmicas de camundongos da linhagem 1210, cultivadas em RPMI diluído em soro fetal bovino a 10%, juntamente com penicilina, estreptomicina (GIBCO) 10.000 UI/ml e glutamina. As seguintes etapas foram seguidas a partir de 4 litros dessas células, numa concentração de 1×10^9 células/L :

- 1) as células foram colocadas dentro de recipientes de 500ml e centrifugadas durante 20 minutos a 3000 rpm;
- 2) com uma pipeta de vidro o precipitado foi recuperado e rediluído em 200ml PBS (sem Ca^{2+} ou Mg^{2+}) pH 7,4, a 4°C e posteriormente distribuído em 06 tubos policarbonados de 40ml;
- 3) nova centrifugação por 10 minutos a 1500 rpm

Para a lise da membrana citoplasmática das células, foi utilizado um tampão composto de:

Tris 15mM
KCl 60mM
NaCl 15mM
Espermina 0,15mM
Espermidina 0,5mM
NP40 0.65% – 26ml
Pmsf 0,17mM – 680µl de pmsf 50 mM
beta mercaptoetanol 14,3mM – 200 µl
Sucrose 8% – 16g
H₂O qsp – 200ml

- 4) o precipitado foi rediluído a seguir com 200 ml do tampão, distribuídos em tubos e submetido a agitação a 4°C durante 10 minutos em banho de gelo.
- 5) nova centrifugação por 10 minutos a 2000 rpm
- 6) procedeu-se à recuperação dos núcleos com micropipetas de 1000µl e lavagem com 150 ml de um tampão de sucrose,

Tampão de sucrose :

sucrose 0,34 M – 23,27g
Tris 15mM
KCl 60mM
NaCl 30mM
espermina 0,15mM
espermidina 0,5mM
beta mercaptoetanol 14,3mM – 200µl.
H₂O qsp 200 ml

- 7) centrifugação por 10 minutos a 2000 rpm ;
- 8) nova recuperação do precipitado em pelo menos 20ml do tampão de sucrose, de forma a se obter uma concentração de cromatina em torno de 1000µg/ml;
- 9) adição de 10 µl dos núcleos a 990µl de PBS 50mM , NaCl 2M (diluição 1/100) para a leitura em densidade óptica (D.O). D.O na faixa (0,300 a 0,260 nm) corresponde a uma concentração de 10µg/ml. Se a D.O estiver acima de 0,300nm, os núcleos são rediluídos para um melhor ação da nuclease que será utilizada posteriormente. Realiza-se uma contagem dos núcleos em azul trypan numa diluição 1/20 (10µl dos núcleos em 190 µl do azul). A concentração final a ser obtida é 1000 µg/ml = 1×10^8 núcleos/ml;
- 10) digestão do núcleos com utilização de nuclease proveniente de *Staphylococcus aureus* (Boehringer Mannheim GmbH , Alemanha). Para cada 10 µl de núcleos são adicionados 250µl de CaCl₂ 0.05M , durante 5 minutos a 37°C;
- 11) adição da nuclease, cujo volume é calculado através da fórmula:

$$\frac{166,66 \times 10\text{ml}(\text{volume núcleos}) \times [\text{cromatina segundo DO}]}{5 \times 1000\mu\text{l}}$$

A adição da nuclease foi feita durante 5 minutos a 37°C, com agitação a cada 30 segundos. A enzima fora previamente tamponada com solução de Tris 10 mM e NaCl 10mM, pH= 7,7 e passagem através de filtro milipore de 0,4µ a 4°C, havendo sido a nuclease diluída na concentração de 15000 UI/ml e conservada a -20°C;

- 12) interrupção da reação com 500 µl de EDTA 0,1M, pH 7,0 a 4°C para

cada 10ml de núcleo;

13) centrifugação por 10 minutos a 5000 rpm;

Para expulsão da cromatina nuclear, recupera-se o precipitado com 1,8ml de EDTA 1mM, pH=7,0 , para cada 10 ml de núcleo e, através de pipeta , com movimentos repetitivos de aspiração e liberação nos tubos, inicia-se a quebra dos núcleos, que é obtida quando se observa uma coloração ligeiramente azul do conteúdo dos tubos;

14) centrifugação por 10 minutos a 5000 rpm ;

15) recuperação do sobrenadante e determinação precisa do volume .

determinação da D.O a 260nm com 10 µl do sobrenadante adicionado a 990 µl de EDTA 1mM (diluição 1/100) e realização do seguinte cálculo:

Valor final da D.O = D.O a 260nm x 100 (diluição) x volume(ml)

16) eliminação da Histona H1 com NaCl 0,55 M, adicionado gota a gota sob agitação;

17) conservação do material nuclear a 4°C até o dia seguinte;

18) lavagem dos núcleos com 1 litro da solução : Tris 10mM-EDTA 1mM final; Pmsf 0,2 mM final ; NaCl 0,55M ; pH 7,5.

19) Separação dos mononucleossomas através de coluna de sefarose,

utilizando bomba com débito de 0,8ml/min, registrador de 1mm/min e 20mV, leitura de 254nm, escala 1 e coletor externo 60.X1.

- 20) Três horas e 30 minutos após a deposição na coluna de sefarose inicia-se a recuperação dos mononucleossomas. As frações obtidas são dialisadas em solução de 2 litros de Tris10mM; EDTA 1mM final; Pmsf 0,2mM final; pH 4.
- 21) Concentração através de filtro Amicon;
- 22) comprovação da pureza da preparação dos mononucleossomas através da extração de DNA e teste em gel de poliacrilamida.

3.2.2 - OUTROS ANTÍGENOS :

O DNA de dupla hélice e histonas totais foram comercialmente adquiridas do Laboratório Boehringer Mannheim (Mannheim, Alemanha)

3.3 PESQUISA DOS ANTICORPOS

Os soros foram testados por método imunoenzimático (*ELISA*), obedecendo as seguintes etapas:

- 1) Os antígenos - nucleossoma, DNA e histonas totais foram depositados em placas de Microtest Luxlon de 96 orifícios (Nemours, França) e deixados a 4°C por 12 horas.

Antes dessa incubação, a placa de DNA havia sido preenchida com 100 µl de poli-L lisina (concentração: 100 µL/ml , conservada a -20°C) na diluição 1/10 em H₂O destilada com permanência de 2 horas em temperatura ambiente. Em seguida o excesso da poli-L lisina era desprezado sem lavagem, adicionando-se 100 µl do DNA numa concentração de 5µg/ml em PBS, seguida por nova incubação por 2 horas em temperatura ambiente .

- 2) Placas semelhantes foram preenchidas separadamente com os nucleossomas e histonas, ambos na concentração de 5µg/ml , através de diluição em PBS , pH=7,2, sendo colocados 100µl em cada orifício. As placas eram em seguida incubadas a 4°C , durante 12 horas.

- 3) Na etapa seguinte, procedia-se a lavagem das placas com solução de Tween 0,05% diluído em PBS com pH= 7,2 , por 3 vezes , seguida de uma saturação com soro fetal bovino diluído a 10% em PBS, pH= 7,2, durante 2 horas em temperatura ambiente, desprezando-se o conteúdo dos orifícios , sem lavagem .

- 4) Diluição dos soros a serem testados em solução de PBS contendo soro fetal bovino a 10% ,Tween a 0,05% em concentração de 1/100 e 1/500 . Incubação por 2 horas a temperatura ambiente e três lavagens com solução de Tween 0,05% em PBS, pH= 7,2. Cada soro foi testado em duplicata, sendo adicionado um controle positivo e um negativo em cada teste.

- 5) Imunoglobulinas humanas do tipo anti-IgG marcadas com peroxidase (Biosys, Compiègne, França) foram adicionadas, após diluição 1/1000 em solução de PBS contendo soro fetal bovino a 10%, Tween a 0,05%. Após incubação por 1h e 30min em temperatura ambiente eram realizadas três lavagens com solução de Tween a 0,05% em PBS, pH= 7,2.

- 6) Para revelação utiliza-se uma solução contendo 200 µl de ABTS, 15mg/ml (Southern Biotechnology, Birmingham, AL); 10ml de ácido cítrico 0.05M (525mg em 50 ml de H₂O, pH= 4, NaOH) e 10 µl de H₂O₂. Após a adição de 100µl da solução de ABTS a cada orifício a placa é incubada por 5 minutos em compartimento escuro. Em seguida a reação era interrompida pela adição de 50 µl/orifício de uma solução de ácido cítrico 0,05M e azida sódica 0,01%.

- 7) Leitura em espectrofotômetro automatizado, 405nm (Dynatech, Alexandria, VA).

3.4 EXPRESSÃO DOS RESULTADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA

As alterações laboratoriais incluídas na determinação dos índices de atividade, SLEDAI e LACC foram assim definidas:

Anemia : hemoglobina/hematócrito < 11,5g/36% para mulheres
< 13,5g/40% para homens

Leucopenia : leucócitos < 4000/ mm³

Linfopenia : linfócitos < 1500/ mm³

Plaquetopenia : plaquetas < 100.000/ mm³

Proteinúria : proteínas > 500mg em urina de 24 horas

Hematúria : hemácias ≥ 5/ por campo;

Piúria : piócitos ≥ 5 /campo

Perda de função renal : creatinina sérica > 1,2 mg/dl

Complemento sérico reduzido : C3 < 64mg/dl (homens)

< 66mg/dl (mulheres)

C4 < 14mg/dl (homens)

<19 mg/dl (mulheres)

CH50 < 100 unidades
hemolíticas

O Teste Exato de Fisher, o Qui-Quadrado de Pearson, o teste do Qui-quadrado e o teste t de Student para igualdade de médias foram utilizados para análise de significância e o Coeficiente de Correlação de Pearson para estudos de correlação. O teste não paramétrico de Kolmogorov-Smirnov também foi empregado para comparação de médias. A significância estatística foi definida por um valor de $p < 0,05$.

A associação entre a presença dos anticorpos anti-dsDNA e anti-nucleossoma e manifestações clínicas e laboratoriais isoladas dos portadores

de LES foi avaliada pela análise univariada.

Para cálculos da sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo, falsos positivos e falsos negativos utilizou-se a tabela 2x2, com emprego das seguintes equações:

$$\text{Sensibilidade} = \frac{\text{verdadeiros positivos (VP)}}{\text{verdadeiros positivos(VP)+falsos negativos (FN)}}$$

$$\text{Especificidade} = \frac{\text{verdadeiros negativos (VN)}}{\text{verdadeiros negativos(VN)+falsos positivos(FP)}}$$

$$\text{Falso positivo} = \frac{\text{FP}}{\text{FP + VN}}$$

$$\text{Falso Negativo} = \frac{\text{FN}}{\text{FN + VP}}$$

$$\text{Valor preditivo positivo} = \frac{\text{VP}}{\text{VP + FP}}$$

$$\text{Valor preditivo negativo} = \frac{\text{VN}}{\text{VN + FN}}$$

Os programas para microcomputadores – Epi Info 6,0, Microsoft Excel 7,0 e SPSS para Windows versão 7,5 foram utilizados para armazenamento do banco de dados, análise dos resultados e execução de tabelas e figuras.

RESULTADOS

RESULTADOS

4. RESULTADOS

Foram estudados 71 pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico, que preenchiam pelo menos quatro critérios do Colégio Americano de Reumatologia, sendo 64 mulheres (90,1%) e 07 homens (9,9%), com idade variando entre 10 e 72 anos, média de $30,01 \pm 11,48$ anos e tempo doença de 1 a 228 meses, com média de $37,7 \pm 47,87$ meses. (Tabela 1)

Tabela 1- Distribuição dos pacientes portadores de LES em Fortaleza, nos hospitais HUWC e HGCC, no período de 1995 a 1997, segundo sexo, idade e tempo de doença.

Sexo		Idade	Tempo da Doença (meses)
FEMININO (n=64)	Média	29,38	35,78
	DP	11,65	44,24
	Mínimo	10	1
	Máximo	72	228
	Mediano	27	19,5
MASCULINO (n=7)	Média	35,86	55,29
	DP	8,21	76,07
	Mínimo	25	1
	Máximo	49	216
	Mediano	37	24

Os 45 (63,4%) pacientes que apresentavam $LACC \geq 2$ foram classificados como ativos e os 26 (36,6%) com $LACC < 2$, como inativos (Tabela 2). Outro critério de classificação empregado foi a presença de envolvimento renal, observada em 55 (77,4%) pacientes como mostra a Tabela 3.

Tabela 2. Distribuição dos portadores de LES em Fortaleza, nos hospitais HUWC e HGCC, no período de 1995 a 1997, segundo a atividade da doença.

Lúpus	nº de indivíduos	%
Inativo	26	36,6
Ativo	45	63,4
Total	71	100,0

Tabela 3. Distribuição dos portadores de LES em Fortaleza, nos hospitais HUWC e HGCC, no período de 1995 a 1997, segundo a presença ou ausência de nefrite.

Lúpus	Nº de indivíduos	%
Com Nefrite	55	77,4
Sem Nefrite	16	22,6
Total	71	100,0

Entre os 55 pacientes que apresentavam comprometimento renal, 33 (60%) haviam realizado biópsia previamente, sendo os achados histológicos classificados segundo os critérios da Organização Mundial da Saúde (OMS), como pode ser visto no Quadro 4.

Quadro 4 – Classificação histológica da biópsia renal segundo critérios da OMS em portadores de LES, em Fortaleza nos hospitais HUWC e HGCC, no período de 1995- 1997.

CLASSIFICAÇÃO DA OMS	NÚMERO DE PACIENTES	%
CLASSE I	01	3,03
CLASSE II	02	6,06
CLASSE III	01	3,03
CLASSE IV	24	72,73
CLASSE V	02	6,06
CLASSE VI	02	6,06

A biópsia de um dos pacientes não pôde ser classificada por apresentar exclusivamente lesão vascular.

A frequência dos achados clínico-laboratoriais nos grupos com e sem nefrite é demonstrada na Tabela 4.

Tabela 4. Frequência das manifestações clínicas e laboratoriais registradas em portadores de LES em Fortaleza, nos hospitais HUWC e HGCC, no período de 1995 a 1997, segundo a presença ou ausência de nefrite.

MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E LABORATORIAIS	PACIENTES COM NEFRITE	PACIENTES SEM NEFRITE
HEMATÚRIA	41/55 (74,5%)	0
PROTEINÚRIA	32/46 (69,5%)	0
ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS	31/55 (56,3%)	8/16 (50,0%)
HIPERTENSÃO ARTERIAL	23/55 (41,8%)	5/16 (31,2%)
PERDA DE FUNÇÃO RENAL	23/55 (41,8%)	0
PIÚRIA	22/55 (40,0%)	3/16 (18,7%)
LESÃO CUTÂNEA	16/55 (29,0%)	9/16 (56,2%)
ARTRITE	15/55 (27,2%)	9/16 (56,2%)
FEBRE	15/55 (27,2%)	7/16 (43,7%)
SEROSITE	11/55 (20,0%)	4/16 (25,0%)
VASCULITE	5/55 (9,0%)	4/16 (25%)
ALTERAÇÕES SNC	4/55 (7,2%)	0/16 (6,2%)

No momento da coleta de amostra de sangue para pesquisa dos anticorpos, o tempo de doença era inferior a 6 meses em 29,5% dos pacientes e superior a 6 meses em 70,5% deles. Em 13 (18,3%) pacientes nenhum tratamento visando o controle do LES havia sido prescrito, enquanto que 58 (81,7%) deles eram tratados com corticoesteróide isoladamente (62%) ou com

imunossupressor associado (38%). A maioria estava sendo tratada há mais de seis meses (72,5%) como pode ser visto na Tabela 5.

Tabela 5. Distribuição dos portadores de LES em Fortaleza, nos hospitais-HUWC e HGCC, no período de 1995 a 1997, segundo o tempo de doença, tempo de tratamento e tipo de tratamento.

TEMPO DE DOENÇA (n=71)		TEMPO DE TRATAMENTO (n=58)		TIPO DE TRATAMENTO (n=58)	
< 6 MESES	≥ 6 MESES	< 6 MESES	≥ 6 MESES	CORTICÓIDE	CORTICÓIDE+ IMUNOSSUPRESSOR
21	50	16	42	36	22
29,5%	70,5%	27,5%	72,5%	62,0%	38,0%

Uma segunda amostra de sangue foi colhida em 28 (39,4%) pacientes, com intervalo médio de 10 meses para determinação dos anticorpos, sendo novamente registrados os índices de atividade da doença.

O limite estabelecido para determinar a positividade dos anticorpos anti-dsDNA e anti-nucleossoma foi obtido a partir da soma da média mais três desvios padrões das determinações obtidas em 26 doadores de sangue, sendo 23 homens (88,5%) e 03 mulheres (11,5%) com idade média de $32,22 \pm 7,53$ anos. O valor encontrado, expresso em Densidade Óptica (DO), para os anticorpos anti-dsDNA foi 0,195 e para os anticorpos anti-nucleossoma, 0,167. Para o cálculo da sensibilidade e especificidade desses anticorpos, foram incluídos 32 portadores de artrite reumatóide (04 homens e 28 mulheres, média de idade = $51,6 \pm 11,1$ anos, tempo médio de doença = $111,8 \pm 93,6$ meses) e 18 pacientes com glomerulopatias primárias (06 homens e 12 mulheres com média de idade = $30,5 \pm 14,7$ anos e tempo médio de doença = $36,5 \pm 40,7$ meses), como demonstrado na Tabela 6.

Tabela 6. Características demográficas dos doadores voluntários de sangue, de portadores de Artrite Reumatóide e de portadores de Glomerulopatia Primária em Fortaleza, nos hospitais HUWC e HGCC, no período de 1995 a 1997.

GRUPOS	N	IDADE (anos)	SEXO (%) feminino	TEMPO DE DOENÇA (meses)
ARTRITE REUMATÓIDE	32	51,6 (28-75)	87,5	111,8 (3-360)
GLOMERULOPATIA	18	30,59 (16-66)	66,6	36,5 (1-144)
DOADOR SANGUE	26	32,27 (21-51)	11,5	---

Os títulos dos anticorpos anti-nucleossoma estiveram elevados em 71,8% dos pacientes com LES, sendo de 43,7% a positividade dos anticorpos anti-dsDNA nesta população, como mostra a Tabela 7, constituindo diferenças estatisticamente significativas a comparação com portadores de artrite reumatóide, glomerulopatia primária e doadores de sangue. A distribuição dos títulos de anticorpos anti-nucleossoma e anti-dsDNA nos diferentes grupos é representada nas Figuras 1 e 2.

Tabela 7. Presença de anticorpos anti-nucleossoma e anticorpos anti-dsDNA nos grupos de portadores de LES, portadores de Artrite Reumatóide, portadores de Glomerulopatia Primária e doadores voluntários de sangue em Fortaleza, nos hospitais HUWC e HGCC, no período de 1995 a 1997.

GRUPO	ANTICORPOS					
	ANTI-NUCLEOSSOMA (*)			ANTICORPO ANTI-dsDNA (**)		
	NEGATIVO	POSITIVO	TOTAL	NEGATIVO	POSITIVO	TOTAL
LÚPUS ERITEMATOSO	20(28,2%)	51(71,8%)	71(100%)	40(50,3%)	31(43,7%)	71(100%)
GLOMERULOPATIA	18(100%)	00	18(100%)	18(100%)	00	18(100%)
ARTRITE REUMATÓIDE	21(65,6%)	11(34,4%)	32(100%)	28(87,5%)	04(12,5%)	32(100%)
DOADOR DE SANGUE	25(96,2%)	01(3,8%)	26(100%)	26(100%)	00	26(100%)

(*) Qui-quadrado de Pearson $p < 0,0001$

(**) Qui-quadrado de Pearson $p < 0,0001$

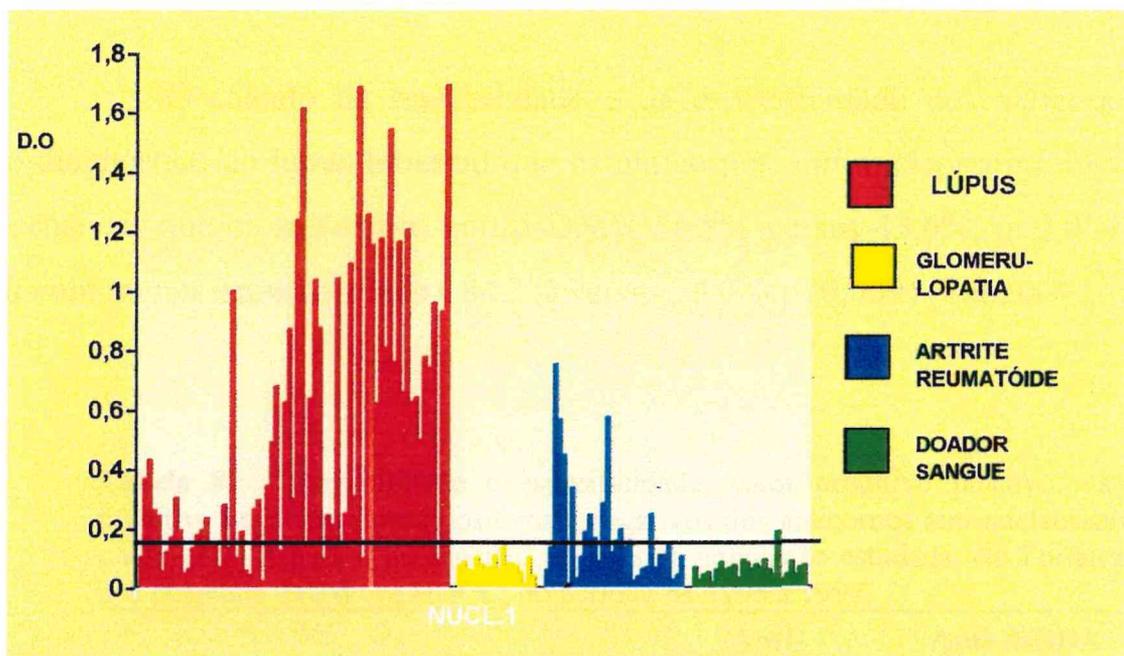


Figura 1. Títulos séricos dos anticorpos anti-nucleossoma, expressos em D.O., nos grupos de portadores de Lúpus Eritematoso Sistêmico, de Glomerulopatia Primária, de Artrite Reumatóide e em doadores voluntários de sangue. O ponto de corte para positividade (—) foi determinado pela soma da média dos valores obtidos em doadores de sangue mais três desvios padrões.

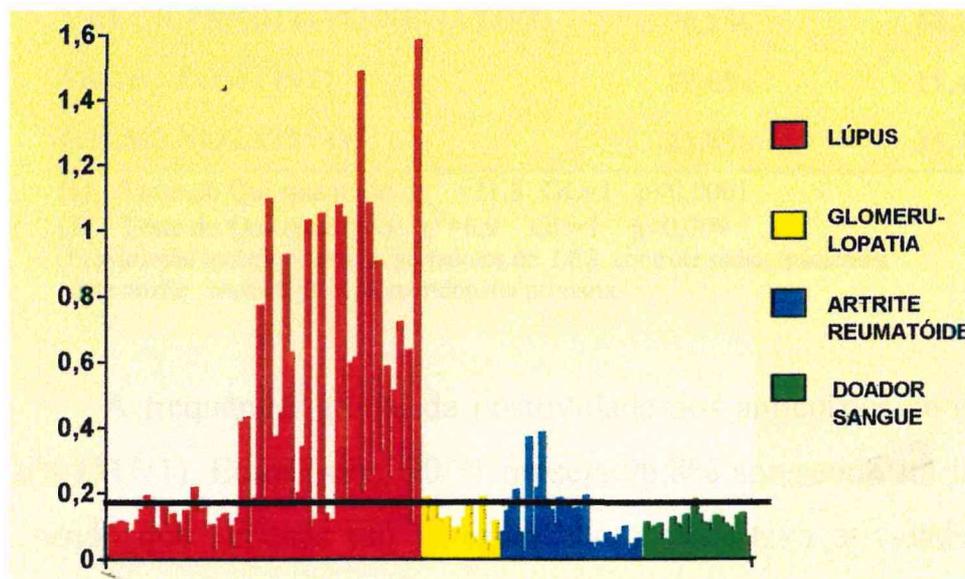


Figura 2. Títulos séricos dos anticorpos anti-dsDNA, expressos em D.O., nos grupos de portadores de Lúpus Eritematoso Sistêmico, de Glomerulopatia Primária, de Artrite Reumatóide e em doadores voluntários de sangue. O ponto de corte para positividade (—) foi determinado pela soma da média dos valores obtidos em doadores de sangue mais três desvios padrões.

O cálculo da sensibilidade e da especificidade dos anticorpos para o diagnóstico do lúpus mostrou que os anticorpos anti-nucleossoma foram mais sensíveis que os anticorpos anti-dsDNA(71,8% versus 43,6%, $p < 0,0001$) porém com menor especificidade (84,2% versus 94,7% $p < 0,009$) (Tabela 8).

Tabela 8. Sensibilidade e especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo, falsos positivos e negativos dos anticorpos anti-nucleossoma e anti-dsDNA para o diagnóstico do LES na população estudada, em Fortaleza, nos hospitais HUWC e HGCC, no período de 1995 a 1997.

	Anti-Nucleossoma	Anti-dsDNA
SENSIBILIDADE (1)	71,8%	43,6%
ESPECIFICIDADE (2)	84,2%	94,7%
VALOR PREDITIVO POSITIVO	80,9%	88,5%
VALOR PREDITIVO NEGATIVO	76,1%	64,2%
FALSO POSITIVO	19,0%	11,4%
FALSO NEGATIVO	23,8%	35,7%

(1) Teste do Qui-quadrado $\chi^2 = 21,8$ GL=1 $p < 0,0001$

(2) Teste do Qui-quadrado $\chi^2 = 6,9$ GL=1 $p < 0,009$

(*) avaliação incluiu o total de portadores de LES, controle sadio, pacientes com artrite reumatóide e glomerulopatia primária.

A frequência global da positividade dos anticorpos anti-dsDNA foi de 43,6% (31/71). Entre esses, 30/31 ou seja 96,8% apresentavam lúpus em atividade, sendo que apenas um paciente não manifestava atividade clínica (3,2%). Os anticorpos anti-nucleossoma por sua vez foram positivos em 71,8% (51/71) dos pacientes lúpicos, predominando igualmente naqueles com doença ativa (74,5%), sendo também detectados em 25,5% dos pacientes classificados como inativos (Tabela 9) . Ambos os anticorpos , como mostra a Tabela 9, estiveram associados de modo significativo com a atividade do LES,

apresentando também correlação linear, pelo coeficiente de Pearson, com os índices de atividade de doença como demonstrado nas figuras 3, 4, 5 e 6 .

Tabela 9. Distribuição dos portadores de LES em função da presença dos anticorpos anti-nucleossoma e anti-dsDNA, em Fortaleza, nos hospitais HUWC e HGCC, no período de 1995 a 1997, segundo a atividade clínica.

ANTICORPOS		ATIVIDADE DO LÚPUS					TESTE EXATO DE FISHER
		INATIVO		ATIVO		TOTAL	
ANTI-NUCLEOSSOMA	AUSENTE	13	65,0%	07	35,0%	20(100%)	p=0,003
	PRESENTE	13	25,5%	38	74,5%	51(100%)	
ANTI-dsDNA	AUSENTE	25	62,5%	15	37,5%	40(100%)	P<0,0001
	PRESENTE	01	3,2%	30	96,8%	31(100%)	

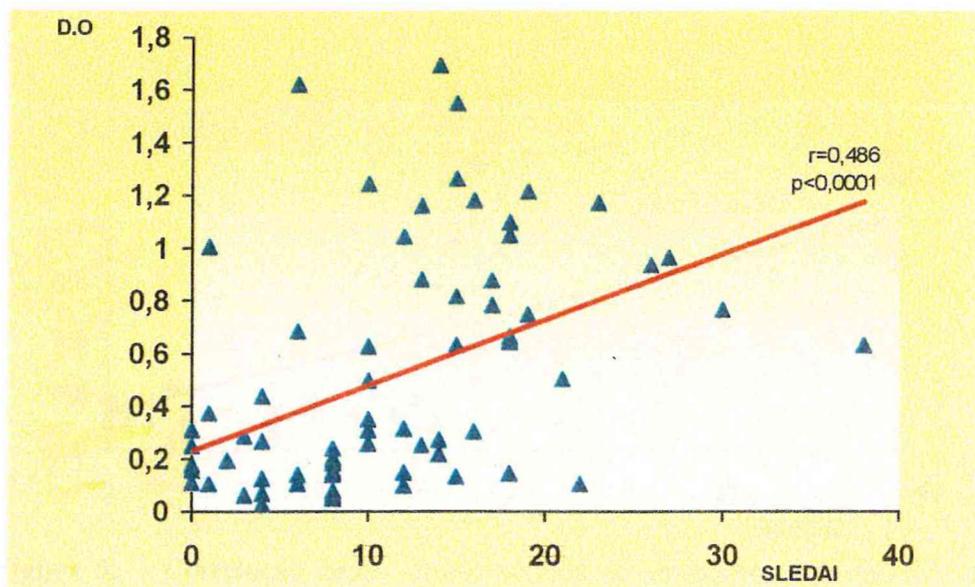


Figura 3. Correlação entre títulos séricos de anticorpos anti-nucleossoma e SLEDAI, avaliada pelo coeficiente de correlação de Pearson.

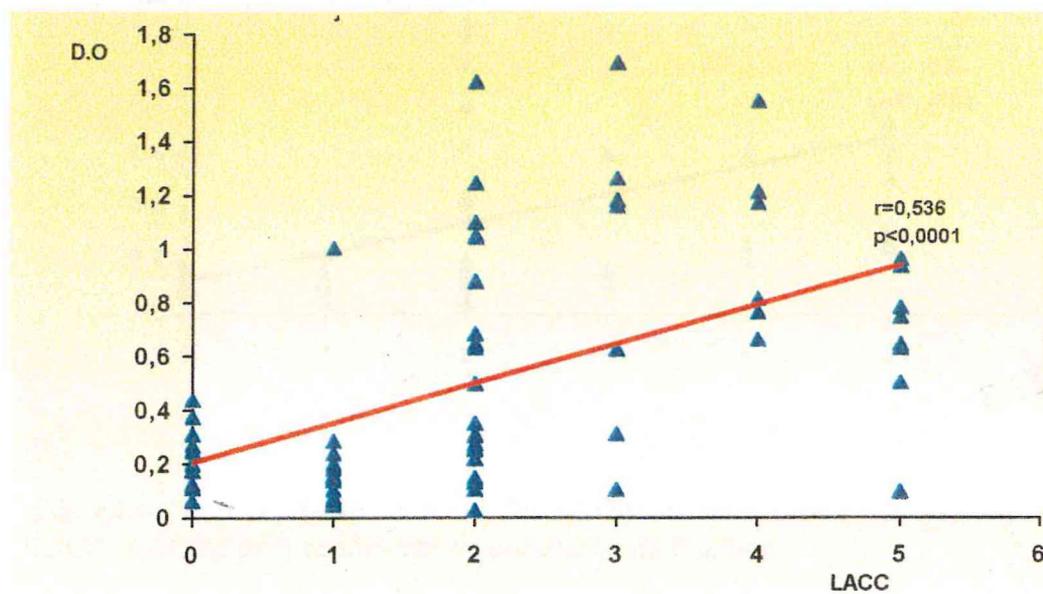


Figura 4. Correlação entre títulos séricos de anticorpos anti-nucleossoma e LACC, avaliada pelo coeficiente de correlação de Pearson.

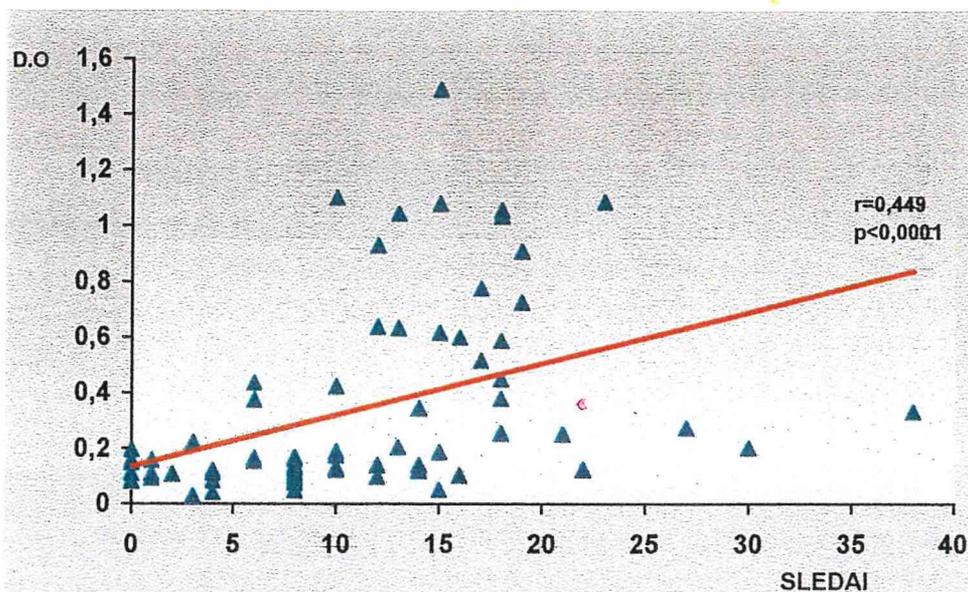


Figura 5. Correlação entre títulos séricos de anticorpos anti-dsDNA e SLEDAI, avaliada pelo coeficiente de correlação de Pearson.

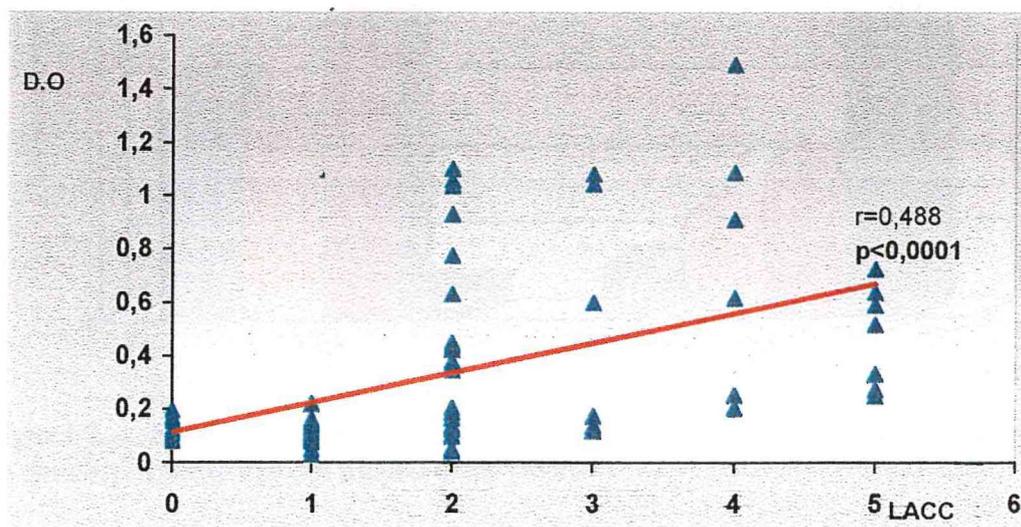


Figura 6. Correlação entre títulos séricos de anticorpos anti-dsDNA e LACC, avaliada pelo coeficiente de correlação de Pearson.

Como pode ser visto na Figura 7, verificamos com frequência mais elevada nos portadores de lúpus em atividade, a ocorrência simultânea de um terceiro anticorpo, o anticorpo anti-histona, associado aos anticorpos anti-nucleossoma e anti-dsDNA.

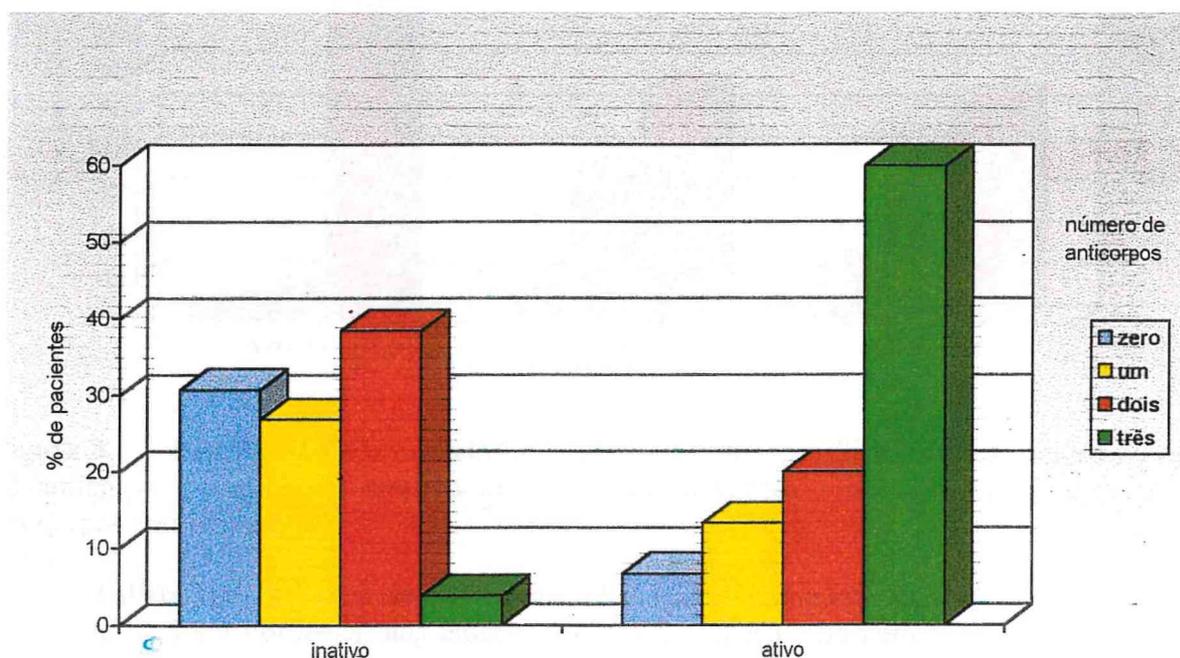


Figura 7. Distribuição dos portadores de Lúpus Eritematosos Sistêmico segundo o número de anticorpos presentes em função da atividade.

Os anticorpos anti-dsDNA em portadores de Lúpus estiveram associados, em 90% dos casos, aos anticorpos anti-nucleossoma e anti-histona e foram encontrados isoladamente em apenas 01 paciente (3,3%). Os anticorpos anti-nucleossoma, por sua vez, estiveram combinados aos anticorpos anti-dsDNA e anti-histona em 54,8% dos casos, sendo detectados como os únicos anticorpos em 5 pacientes, representando 10% da população em que estes

anticorpos estavam presentes, como mostra a Figura 8. Três destes pacientes apresentavam lúpus em atividade e dois, doença inativa (Tabela 10). Em quatro deles observaram-se títulos elevados de anticorpos e a ocorrência de doença renal. Esses dados são mostrados na Tabela 11.

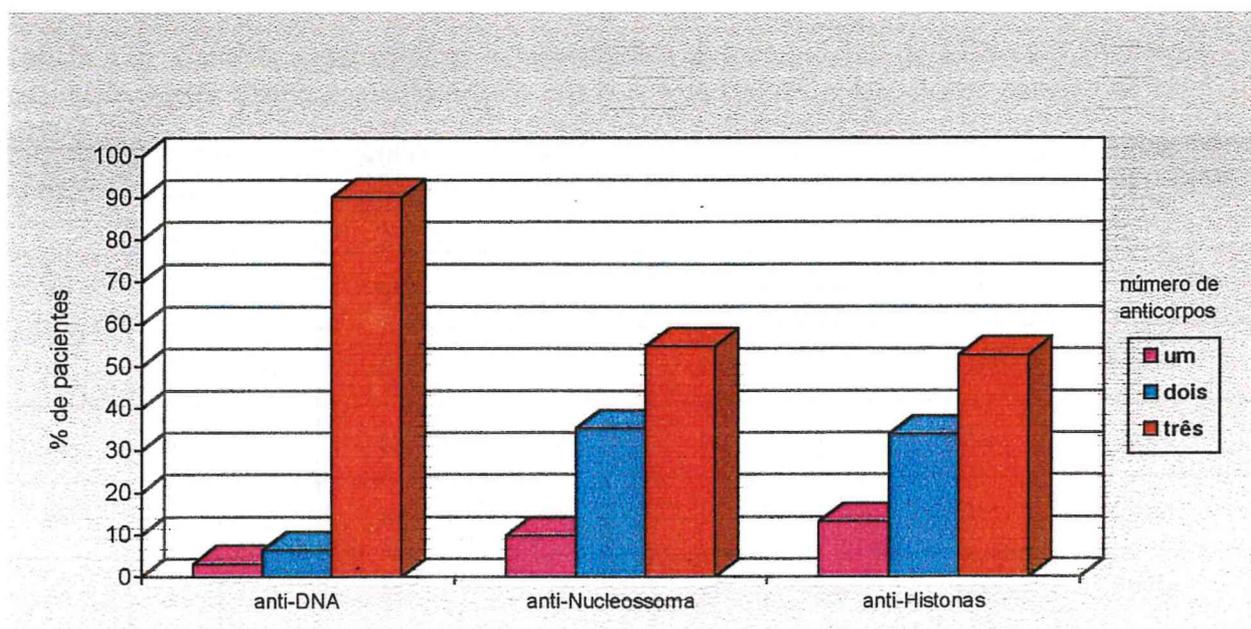


Figura 8. Distribuição dos portadores de Lúpus Eritematoso Sistêmico em função do tipo de anticorpo e segundo o número de anticorpos presentes, incluindo-se a pesquisa de anticorpos anti-histona.

Tabela 10. Presença de anticorpos anti-nucleossoma e anti-dsDNA em portadores de LES em Fortaleza, nos Hospitais HUWC e HGCC, no período de 1995 a 1997, em função da atividade e do número de anticorpos presentes, incluindo-se a pesquisa dos anticorpos anti-histona.

ANTICORPOS	ATIVIDADE	NÚMERO DE ANTICORPOS		
		01	02	03
Anti-Nucleossoma	ATIVA	3/38 (7,8%)	8/38 (21,1%)	27/38 (71,1%)
	INATIVA	2/13 (15,4%)	10/13 (76,9%)	1/13 (7,7%)
Anti-dsDNA	ATIVA	1/30 (3,3%)	2/30 (6,7%)	27/30 (90%)
	INATIVA	0	0	1/1 (100%)

Tabela 11. Características clínicas e laboratoriais dos portadores de LES com anticorpos anti-nucleossoma restritos, em Fortaleza, nos hospitais HUWC e HGCC, no período de 1995 a 1997.

PACIENTE	SEXO	IDADE (anos)	TEMPO DE DOENÇA (meses)	TEMPO DE TRATAMENTO (meses)	SLEDAI	NEFRITE	ANTI-dsDNA (D.O)	ANTI- NUCLEOSSOMA (D.O)
01	F	24	48	06	01	Não	0,107	0,370
02	F	31	30	26	08	Sim	0,107	0,180
03	F	27	03	03	16	Sim	0,100	0,300
04	F	27	108	108	10	Sim	0,127	0,347
05	F	27	05	05	12	Sim	0,137	0,310

D.O = densidade óptica

Entre os pacientes que apresentavam comprometimento renal havia um maior deles com anticorpos presentes se a doença estava em atividade, quando comparados àqueles com doença inativa (anti-dsDNA $p < 0,0001$, anti-nucleossoma $p = 0,021$), como pode ser visto na Tabela 12. Nos indivíduos com manifestação extra-renal somente os anticorpos anti-dsDNA se associaram com atividade do LES ($p = 0,026$), não sendo observada essa associação com os anticorpos anti-nucleossoma neste grupo de pacientes, como se verifica na Tabela 13.

Tabela 12. Presença dos anticorpos anti-nucleossoma e anti-dsDNA em portadores de LES com manifestações renais presentes, em Fortaleza, nos hospitais HUWC e HGCC, no período de 1995 a 1997, segundo a atividade clínica.

ANTICORPOS		PACIENTES COM MANIFESTAÇÕES RENAIS			
		ATIVIDADE DO LÚPUS			
		INATIVO		ATIVO	
ANTI-NUCLEOSSOMA	AUSENTE	09	50,0%	06	16,2%
	PRESENTE	09	50,0%	31	83,8%
	TOTAL	18	100,0%	37	100,0%
	p	p=0,021			
ANTI-dsDNA	AUSENTE	17	94,4%	12	32,4%
	PRESENTE	01	5,6%	25	67,6%
	TOTAL	18	100,0%	37	100,0%
	p	P<0,0001			

Teste exato de Fisher

Tabela 13. Presença dos anticorpos anti-nucleossoma e anti-dsDNA em portadores de LES sem manifestações renais, em Fortaleza, nos hospitais HUWC e HGCC, no período de 1995 a 1997, segundo a atividade clínica.

ANTICORPOS		PACIENTES SEM MANIFESTAÇÕES RENAIS			
		ATIVIDADE DO LÚPUS			
		INATIVO		ATIVO	
ANTI-NUCLEOSSOMA	AUSENTE	04	50,0%	01	12,5%
	PRESENTE	04	50,0%	07	87,5%
	TOTAL	08	100,0%	08	100,0%
	p	p=0,282			
ANTI-dsDNA	AUSENTE	08	100,0%	03	37,5%
	PRESENTE	00	0,0%	05	62,5%
	TOTAL	08	100,0%	08	100,0%
	p	p=0,026			

Teste exato de Fisher

O número de manifestações clínico-laboratoriais segundo a presença ou não de atividade definida pelos critérios do LACC é descrito na tabela 14 e representado na figura 9. O comportamento dos dois grupos apresentou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$), sendo observada uma maior frequência de duas dessas manifestações no grupo de pacientes sem atividade da doença (42,3%) e de seis e sete manifestações naqueles com doença ativa (22,2% e 20% respectivamente). A positividade dos anticorpos anti-nucleossoma e anti-dsDNA também foi mais frequente quando seis dessas manifestações estavam presentes, devendo-se ressaltar que os anticorpos anti-nucleossoma também estiveram presentes em 9/51 pacientes (17,6%) que apresentavam apenas duas manifestações clínicas, como demonstrado na Tabela 15.

Nenhuma associação, através de análise univariada, foi observada entre os anticorpos anti-dsDNA e anti-nucleossoma e sintomas isolados do lúpus ou alterações laboratoriais em pacientes com atividade lúpica, como pode ser observado nas Tabelas 16 e 17.

Tabela 14. Distribuição dos portadores de LES em função da atividade, em Fortaleza, nos hospitais HUWC e HGCC, no período de 1995 a 1997, segundo o número de manifestações clínicas e laboratoriais presentes.

NÚMERO DE MANIFESTAÇÕES PRESENTES	ATIVIDADE			
	AUSENTE		PRESENTE	
	N	%	N	%
0	2	7,70
1	3	11,50
2	11	42,30	3	6,70
3	4	15,40	5	11,10
4	3	11,50	3	6,70
5	3	11,50	6	13,30
6	10	22,20
7	9	20,00
8	4	8,90
9	2	4,40
10	2	4,40
11
12	1	2,20
Total	26	100,0	45	100,00

(*) Manifestações clínico-laboratoriais incluídas: proteinúria, hematúria, piúria, hipertensão arterial, artrite, serosite, vasculite, febre, insuficiência renal, alterações sistema nervoso central, lesão cutânea e complemento sérico reduzido

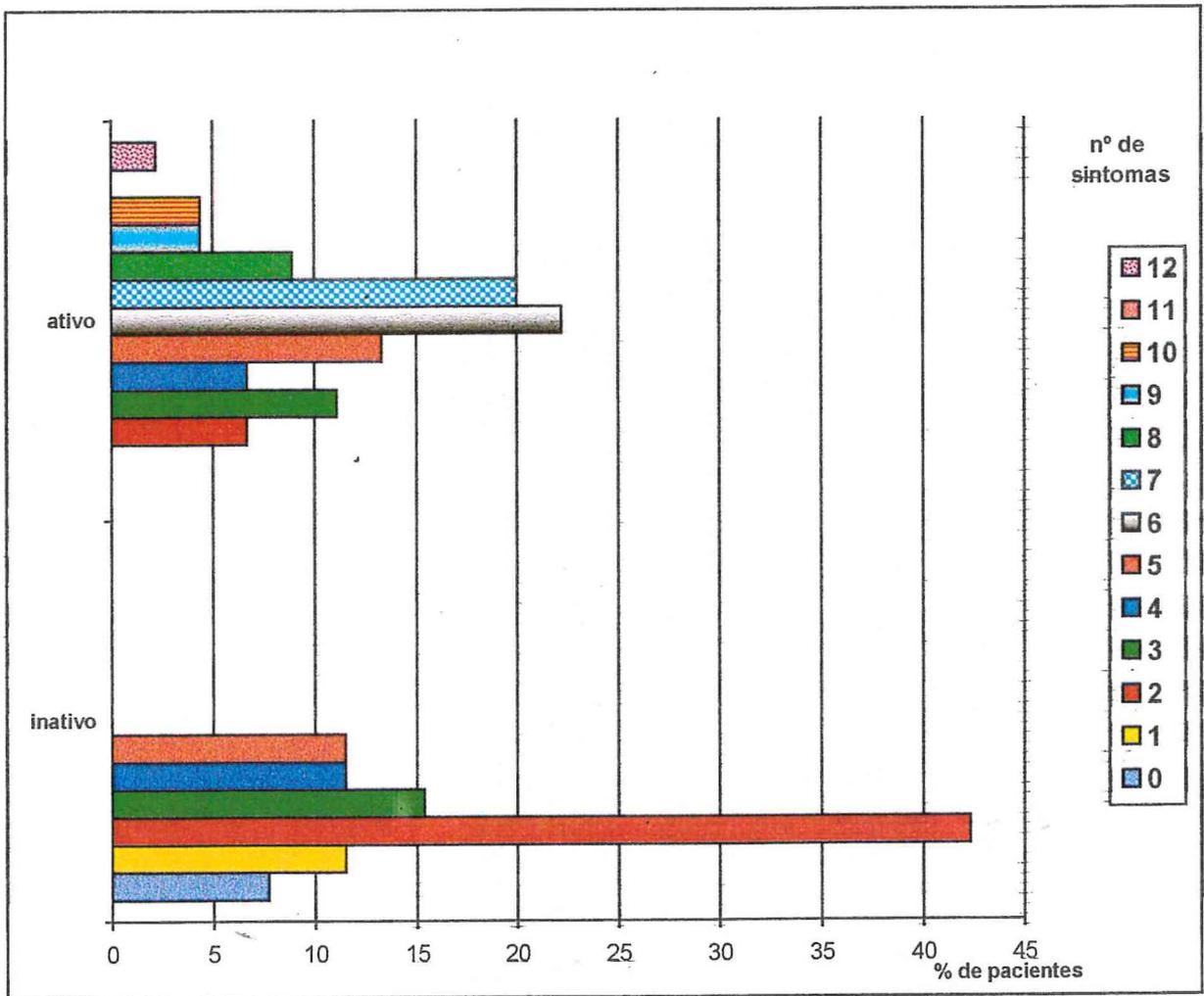


Figura 9. Distribuição dos portadores de Lúpus Eritematoso Sistêmico em função da atividade e segundo o número de manifestações clínicas e laboratoriais presentes.

Tabela 15. Distribuição dos portadores de LES em função da presença de anticorpos anti-nucleossoma e anti-dsDNA, em Fortaleza, nos hospitais HUWC e HGCC, no período de 1995 a 1997, segundo o número de manifestações clínicas e laboratoriais presentes.

ANTICORPOS		NUMERO DE MANIFESTAÇÕES CLÍNICO-LABORATORIAIS (*)												
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ANTI-NUCLEOS-SOMA	NEGATIVO	1/20 (5,0%)	1/20 (5,0%)	5/20 (25,0%)	3/20 (15,0%)	3/20 (15,0%)	3/20 (15,0%)	...	2/20 (10,0%)	1/20 (5,0%)	1/20 (5,0%)
	POSITIVO	1/51 (2,0%)	2/51 (3,9%)	9/51 (17,6%)	6/51 (11,8%)	3/51 (5,9%)	6/51 (11,8%)	10/51 (19,6%)	7/51 (13,7%)	3/51 (5,9%)	2/51 (3,9%)	2/51 (3,9%)
ANTI-dsDNA	NEGATIVO	2/40 (5,0%)	3/40 (7,5%)	13/40 (32,5%)	5/40 (12,5%)	4/40 (10,0%)	4/40 (10,0%)	...	5/40 (12,5%)	3/40 (7,5%)	...	1/40 (2,5%)
	POSITIVO	1/31 (3,2%)	4/31 (12,9%)	2/31 (6,5%)	5/31 (16,1%)	10/31 (32,3%)	4/31 (12,9%)	1/31 (3,2%)	2/31 (6,5%)	1/31 (3,2%)	...	1/31 (3,2%)

(*) Manifestações clínico-laboratoriais incluídas: proteinúria, hematúria, piúria, hipertensão arterial, artrite, serosite, vasculite, febre, insuficiência renal, alterações sistema nervoso central, lesão cutânea e complemento sérico reduzido

Tabela 16. Resultado da análise univariada para investigar a associação entre a presença dos anticorpos anti-dsDNA e as manifestações clínicas e laboratoriais dos portadores de LES ativo, em Fortaleza, nos hospitais HUWC e HGCC, no período de 1995 a 1997.

MANIFESTAÇÕES CLÍNICO-LABORATORIAIS		ANTICORPOS ANTI-dsDNA		
		NEGATIVO	POSITIVO	TOTAL
HEMATÚRIA	AUSENTE	6 (42,9%)	8 (57,1%)	14 (100%)
	PRESENTE	9 (29,0%)	22 (71,0%)	31 (100%)
	p	p=0,497		
PIÚRIA	AUSENTE	8 (32,0%)	17 (68,0%)	25 (100%)
	PRESENTE	7 (35,0%)	13 (65,0%)	20 (100%)
	p	p= 1,000		
PROTEINÚRIA	AUSENTE	2 (22,2%)	7 (77,8%)	9 (100%)
	PRESENTE	7 (33,3%)	14 (66,7%)	21 (100%)
	p	p=0,681		
COMPLEMENTO REDUZIDO	AUSENTE	3 (37,5%)	5 (62,5%)	8 (100%)
	PRESENTE	11 (30,6%)	25 (69,4%)	36 (100%)
	p	p=0,695		
FEBRE	AUSENTE	11 (42,3%)	15 (57,7%)	26 (100%)
	PRESENTE	4 (21,1%)	15 (78,9%)	19 (100%)
	p	p=0,203		
HIPERTENSÃO ARTERIAL	AUSENTE	8 (25,8%)	23 (74,2%)	31 (100%)
	PRESENTE	7 (50,0%)	7 (50,0%)	14 (100%)
	p	p=0,172		
INSUFICIÊNCIA RENAL	AUSENTE	5 (20,8%)	19 (79,2%)	24 (100%)
	PRESENTE	9 (50,0%)	9 (50,0%)	18 (100%)
	p	p=0,096		
ALTERAÇÃO SNC	AUSENTE	13 (32,5%)	27 (67,5%)	40 (100%)
	PRESENTE	2 (40,0%)	3 (60,0%)	5 (100%)
	p	p=1,000		
ARTRITE	AUSENTE	8 (38,1%)	13 (61,9%)	21 (100%)
	PRESENTE	7 (29,2%)	17 (70,8%)	24 (100%)
	p	p=0,546		
SEROSITE	AUSENTE	8 (26,7%)	22 (73,3%)	30 (100%)
	PRESENTE	7 (46,7%)	8 (53,3%)	15 (100%)
	p	p=0,200		
VASCULITE	AUSENTE	14 (38,9%)	22 (61,1%)	36 (100%)
	PRESENTE	1 (11,1%)	8 (88,9%)	9 (100%)
	p	p=0,234		
LESÃO CUTÂNEA	AUSENTE	10 (43,5%)	13 (56,5%)	23 (100%)
	PRESENTE	5 (22,7%)	17 (77,3%)	22 (100%)
	p	p=0,208		

Teste exato de Fisher

Tabela 17. Resultado da análise univariada para investigar a associação entre a presença dos anticorpos anti-nucleossoma e as manifestações clínicas e laboratoriais dos portadores de LES ativo, em Fortaleza, nos hospitais HUWC e HGCC, no período de 1995 a 1997.

MANIFESTAÇÕES CLÍNICO-LABORATORIAIS		ANTICORPOS ANTI-NUCLEOSSOMA		
		NEGATIVO	POSITIVO	TOTAL
HEMATÚRIA	AUSENTE	2 (14,3%)	12 (85,7%)	14 (100%)
	PRESENTE	5 (16,1%)	26 (83,9%)	31 (100%)
	P	p=1,000		
PIÚRIA	AUSENTE	3 (12,0%)	22 (88,0%)	25 (100%)
	PRESENTE	4 (20,0%)	16 (80,0%)	20 (100%)
	P	p=0,682		
PROTEINÚRIA	AUSENTE	2 (22,2%)	7 (77,8%)	9 (100%)
	PRESENTE	3 (14,3%)	18 (85,7%)	21 (100%)
	P	P=0,622		
COMPLEMENTO REDUZIDO	AUSENTE	1 (12,5%)	7 (87,5%)	8 (100%)
	PRESENTE	5 (13,9%)	31 (86,1%)	36 (100%)
	P	p=1,000		
FEBRE	AUSENTE	5 (19,2%)	21 (80,8%)	26 (100%)
	PRESENTE	2 (10,5%)	17 (89,5%)	19 (100%)
	P	p=0,687		
HIPERTENSÃO ARTERIAL	AUSENTE	4 (12,9%)	27 (87,1%)	31 (100%)
	PRESENTE	3 (21,4%)	11 (78,6%)	14 (100%)
	P	p=0,208		
INSUFICIÊNCIA RENAL	AUSENTE	2 (8,3%)	22 (91,7%)	24 (100%)
	PRESENTE	4 (22,2%)	14 (77,8%)	18 (100%)
	P	p=0,375		
ALTERAÇÃO SNC	AUSENTE	5 (12,5%)	35 (87,5%)	40 (100%)
	PRESENTE	2 (40,0%)	3 (60,0%)	5 (100%)
	P	p=0,166		
ARTRITE	AUSENTE	3 (14,3%)	18 (85,7%)	21 (100%)
	PRESENTE	4 (16,7%)	20 (83,3%)	24 (100%)
	P	p=1,000		
SEROSITE	AUSENTE	4 (13,3%)	26 (86,7%)	30 (100%)
	PRESENTE	3 (20,0%)	12 (80,0%)	15 (100%)
	P	p=0,680		
VASCULITE	AUSENTE	6 (16,7%)	30 (83,3%)	36 (100%)
	PRESENTE	1 (11,1%)	8 (88,9%)	9 (100%)
	P	p=1,000		
LESÃO CUTÂNEA	AUSENTE	4 (17,4%)	19 (82,6%)	23 (100%)
	PRESENTE	3 (13,6%)	19 (86,4%)	22 (100%)
	P	p=1,000		

Teste exato de Fisher

Um número maior de pacientes com anticorpos anti-nucleossoma e anticorpos anti-dsDNA positivos foi encontrado entre pacientes com tempo de doença menor que 6 meses (Figura 10), constituindo diferença estatisticamente significativa quando comparados àqueles com tempo de doença maior ou igual a 6 meses (Tabela 18). O mesmo foi observado em relação ao tempo de tratamento (Tabela 19).

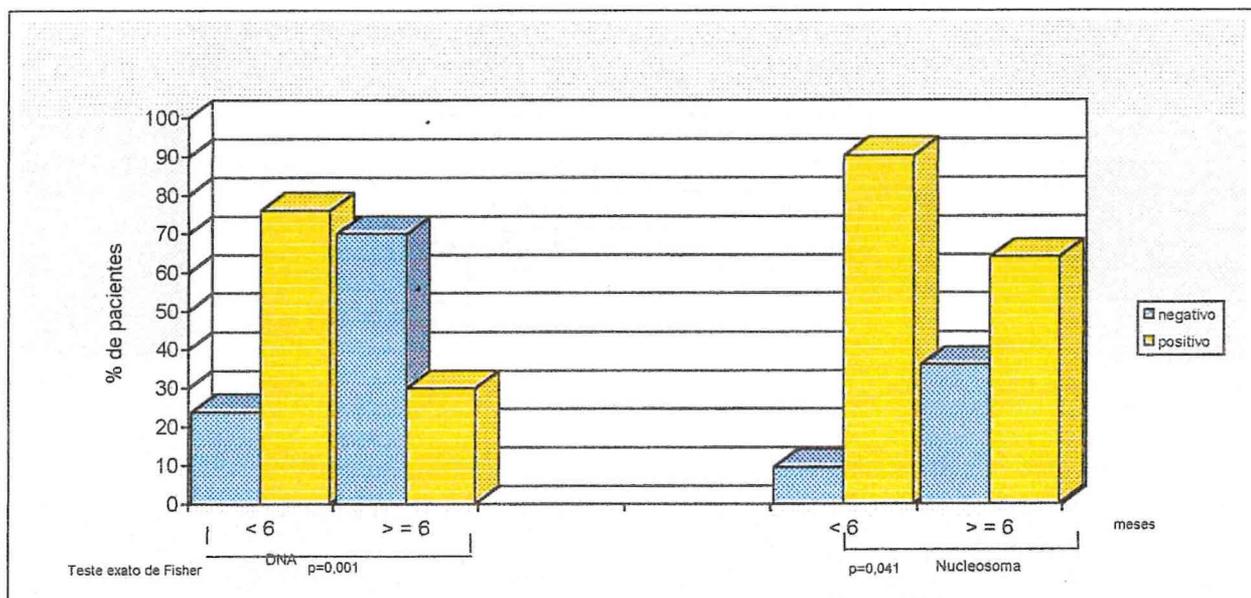


Figura 10. Distribuição dos portadores de Lúpus Eritematoso Sistêmico em função do tempo de doença e segundo a presença dos anticorpos.

Tabela 18. Distribuição dos portadores de LES em função do tempo de doença, em Fortaleza, nos hospitais HUWC e HGCC, no período 1995 a 1997, segundo a presença ou ausência dos anticorpos anti-nucleossoma e anti-dsDNA.

ANTICORPOS		MENOR QUE 6 MESES	MAIOR OU IGUAL A 6 MESES
ANTI- NUCLEOSSOMA	NEGATIVO	02(9,5%)	18(36,0%)
	POSITIVO	19(90,5%)	32(64,0%)
	TOTAL	21(100,0%)	50(100,0%)
	p=0,041		
ANTI-dsDNA	NEGATIVO	05(23,8%)	35 (70,0%)
	POSITIVO	16(76,2%)	15(30,0%)
	TOTAL	21(100,0%)	50(100,0%)
	p=0,001		

Teste exato de Fisher

Tabela 19. Distribuição dos portadores de LES em função do tempo de tratamento, em Fortaleza nos HUWC e HGCC, no período de 1995 a 1997, segundo a presença ou ausência dos anticorpos anti-nucleossoma e anti-dsDNA.

ANTICORPOS		MENOR QUE 6 MESES	MAIOR OU IGUAL A 6 MESES
ANTI- NUCLEOSSOMA	NEGATIVO	0	16(38,1%)
	POSITIVO	16 (100%)	28 (61,9%)
	TOTAL	16 (100%)	42 (100%)
	P= 0,003		
ANTI-dsDNA	NEGATIVO	5 (31,3%)	31 (73,8%)
	POSITIVO	11 (68,8%)	11 (26,2%)
	TOTAL	16 (100%)	42 (100%)
	P= 0,005		

Teste exato de Fisher

A média dos anticorpos no grupo tratado foi inferior, constituindo entretanto diferença não significativa em relação aos doentes não tratados (Tabela 20).

Tabela 20. Média dos títulos séricos dos anticorpos anti-nucleossoma e anti-dsDNA, expressa em densidade óptica, em portadores de LES, em Fortaleza nos hospitais HUWC e HGCC, no período de 1995 a 1997, em função da presença ou ausência de tratamento.

	n	Anti-nucleossoma(*) D.O	Anti-dsDNA (**) D.O
LUPUS NÃO TRATADO	13	0,724+/-0,513	0,595+/-0,473
LUPUS TRATADO	58	0,476+/-0,437	0,295+/-0,316

Teste t de Student para igualdade de médias * p=0,137
** p=0,080

Um número significativamente superior de pacientes com positividade anti-nucleossômica e anti-dsDNA (p=0,034 e p=0,001, respectivamente) foi encontrado entre aqueles em uso de corticosteróide como terapêutica única e com tempo de doença menor que 6 meses quando comparado àqueles pacientes com pelo menos 6 meses de doença, recebendo o mesmo tratamento (Tabela 21). A mesma observação foi constatada ao agrupar-se estes pacientes em tratamento exclusivamente com corticosteróide, segundo o tempo inferior a 6 meses ou de pelo menos seis meses de tratamento (Tabela 22).

No grupo que recebeu imunossupressor associado ao corticóide não foram observadas diferenças quanto aos títulos dos anticorpos, independente do tempo de doença e de tratamento.

Tabela 21. Distribuição dos portadores de LES em função do tempo de doença e do tipo de tratamento, em Fortaleza, nos hospitais HUWC e HGCC, no período de 1995 a 1997, segundo a presença ou ausência dos anticorpos anti-nucleossoma e anti-dsDNA.

		SEM TRATAMENTO		CORTICOÍDE		CORTICOÍDE+IMUNOSUPRESSOR	
		TEMPO DE DOENÇA		TEMPO DE DOENÇA		TEMPO DE DOENÇA	
		Menor que 6 meses	Maior ou igual a 6 meses	Menor que 6 meses	Maior ou igual a 6 meses	Menor que 6 meses	Maior ou igual a 6 meses
Anti-Nucleossoma	Negativo	02 (28,6%)	02 (33,3%)	0 (0,0%)	09 (36,0%)	0 (0,0%)	07 (36,8%)
	Positivo	05 (71,4%)	04 (66,7%)	11 (100,0%)	16 (64,0%)	03 (100,0%)	12 (63,2%)
	Total	07 (100,0%)	06 (100,0%)	11 (100,0%)	25 (100,0%)	03 (100,0%)	19 (100,0%)
	p	p=1,000		p=0,034		p=0,523	
Anti-dsDNA	Negativo	01 (14,3%)	03 (50,0%)	02 (18,2%)	20 (80,0%)	02 (66,7%)	12 (63,2%)
	Positivo	06 (85,7%)	03 (50,0%)	09 (81,8%)	05 (20,0%)	01 (33,3%)	07 (36,8%)
	Total	07 (100,0%)	06 (100,0%)	11 (100,0%)	25 (100,0%)	03 (100,0%)	19 (100,0%)
	p	p=0,266		p=0,001		p=1,000	

Teste exato de Fisher

Tabela 22. Distribuição dos portadores de LES em função do tempo de tratamento e tipo de tratamento, em Fortaleza, nos hospitais HUWC e HGCC, no período de 1995 a 1997, segundo a presença ou ausência dos anticorpos anti-nucleossoma e anti-dsDNA.

ANTICORPOS		CORTICÓSTERÓIDE		CORTICÓIDE+IMUNOSUPRESSOR	
		TEMPO DE TRATAMENTO		TEMPO DE TRATAMENTO	
		Menor que 6 meses	Maior ou igual a 6 meses	Menor que 6 meses	Maior ou igual a 6 meses
Anti-Nucleossoma	Negativo	0 (0,0%)	09 (37,5%)	0 (0,0%)	07 (38,9%)
	Positivo	12 (100,0%)	15 (62,5%)	04 (100,0%)	11 (61,1%)
	Total	12 (100,0%)	24 (100,0%)	04 (100,0%)	18 (100,0%)
	p	p=0,016		P=0,263	
Anti-dsDNA	Negativo	03 (25,0%)	19 (79,2%)	02 (50,0%)	12 (66,7%)
	Positivo	09 (75,0%)	05 (20,8%)	02 (50,0%)	06 (33,3%)
	Total	12 (100,0%)	24 (100,0%)	04 (100,0%)	18 (100,0%)
	p	p=0,003		P=0,602	

Teste exato de Fisher

Dos 28 pacientes em que foi possível uma segunda determinação de anticorpos, 15(53,5%) mantinham a mesma atividade clínica e 13 (46,5%) não mais manifestavam a atividade da doença (Tabela 23). O teste não paramétrico de Kolmogorov-Smirnov para verificar a diferença dos valores médios dos anticorpos da primeira e segunda amostras mostrou que a positividade dos anticorpos anti-nucleossoma e dos anticorpos anti-dsDNA variou significativamente entre as amostras ($p=0,009$ e $p=0,002$, respectivamente) e o estudo da correlação entre a variação do índice de atividade (SLEDAI) e da titulação dos anticorpos na primeira e segunda amostras alcançou significância

no modelo linear para o anti-dsDNA ($r=0,51873$, $p=0,0047$) e para o anti-nucleossoma($r=0,57338$, $p=0,0014$) (figuras 11 e 12)

Tabela 23. Valores médios de SLEDAI, média dos títulos dos anticorpos anti-nucleossoma e anti-dsDNA obtidos na primeira (1) e na segunda(2) avaliação de 28 portadores de LES em Fortaleza, nos hospitais HUWC e HGCC, no período de 1995 a 1997, segundo a mudança ou manutenção da atividade clínica.

	MANUTENÇÃO DE ATIVIDADE		MUDANÇA DE ATIVIDADE
	inativos(n=06)	ativos(n=09)	n=13
SLEDAI 1	3,8±3,9	14,2±6,7	16,9±3,4
SLEDAI 2	2,6±4,1	12,4±1,3	4,6±2,6
ANTI-NUCLEOSSOMA 1	0,435±0,589	0,793±0,488	0,682±0,357
ANTI-NUCLEOSSOMA2	0,360±0,398	0,725±0,321	0,380±0,210
ANTI-dsDNA 1	0,141±0,117	0,635±0,506	0,540±0,366
ANTI-dsDNA 2	0,122±0,043	0,322±0,232	0,205±0,109

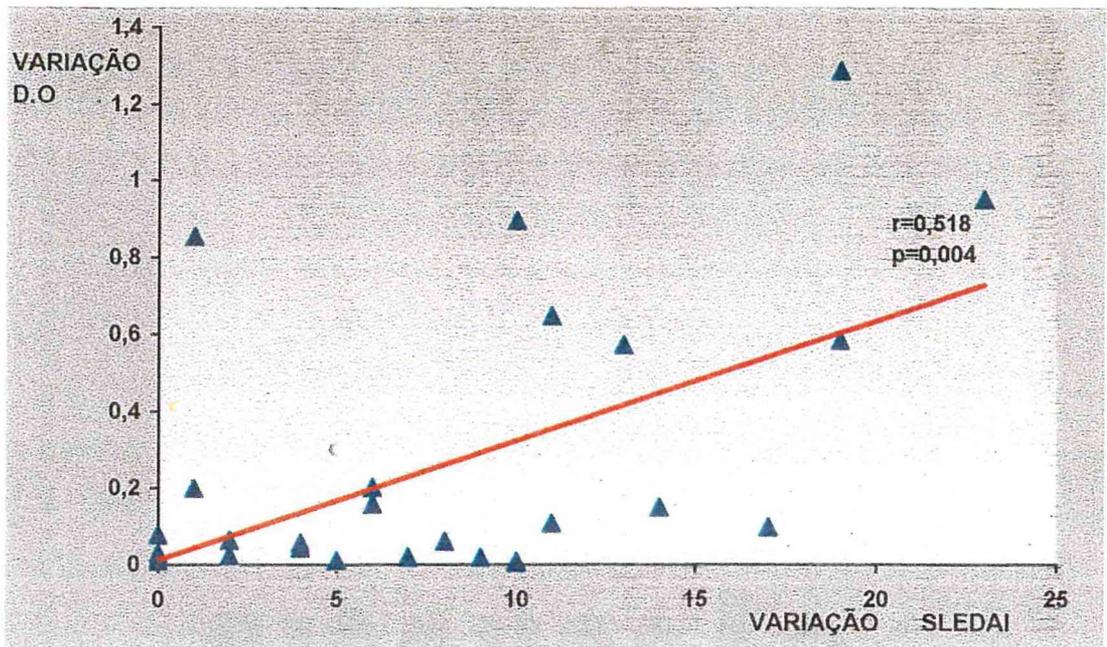


Figura 11. Correlação entre a variação do SLEDAI e a variação dos títulos séricos dos anticorpos anti-dsDNA (D.O) em 28 portadores de Lúpus Eritematoso Sistêmico submetidos a uma segunda avaliação.

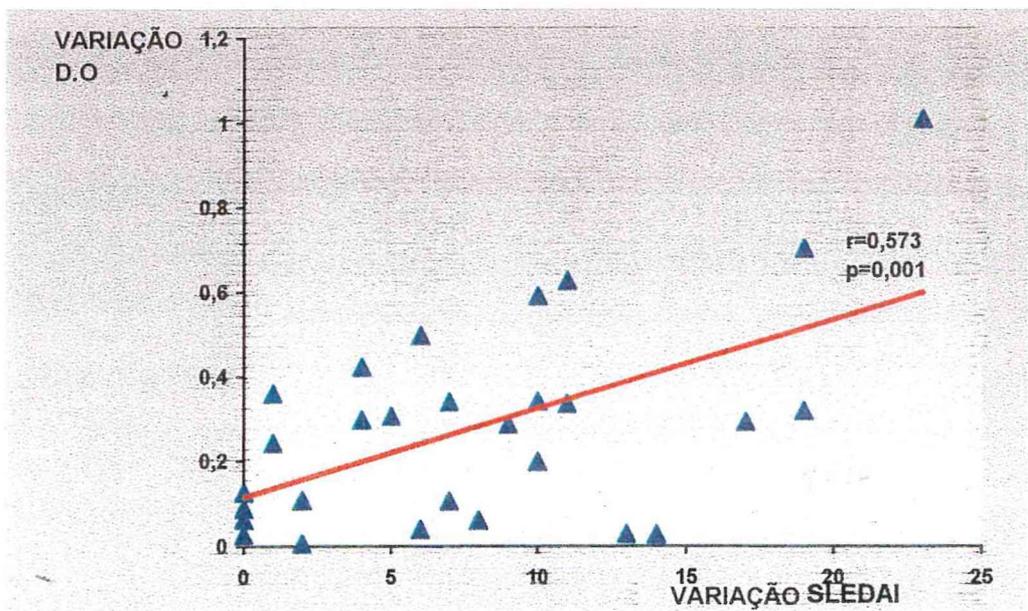


Figura 12. Correlação entre a variação do SLEDAI e a variação dos títulos séricos dos anticorpos anti-nucleossoma (D.O) em 28 portadores de Lúpus Eritematoso Sistêmico submetidos a uma segunda avaliação.

DISCUSSÃO

5.0 DISCUSSÃO

Estudos realizados na última década por MOHAN et al.(1993) propõem que o nucleossoma é o principal antígeno desencadeador da resposta autoimune no lúpus. Fortalecendo essa hipótese; as pesquisas sobre a cinética de surgimento dos anticorpos anti-nucleares em animais espontaneamente lúpicos, de autoria de BURLINGAME et al.(1993) e de AMOURA et al.(1994), demonstraram que os anticorpos anti-nucleossoma surgem mais precocemente que os anticorpos anti-dsDNA e anti-histonas, indicando que a perda da tolerância ao nucleossoma é um evento inicial no lúpus.

Essa mesma hipótese havia sido considerada por RUMORE & STEINMAN em 1990, ao demonstrarem que o DNA não circulava de forma isolada no sangue de pacientes lúpicos, mas associado a histonas e que essas moléculas correspondiam aos oligonucleossomas, como sugerido anteriormente por outros investigadores (McCOUBREY-HOYER et al.,1984 ; LI & STEINMAN, 1989). A presença do DNA nesta configuração sugere que a fonte geradora dos nucleossomas é a apoptose , um processo de morte celular programada que remove as células indesejáveis e se inicia com a clivagem internucleossomal da cromatina (COHEN, 1993 ; SCHWARTZ & OSBORNE, 1993). Normalmente, quando as células se tornam apoptóticas, são rapidamente fagocitadas por macrófagos, impedindo que os constituintes nucleares sejam liberados (SAVIL, et al., 1993). Alguns relatos de anormalidades neste processo têm sido descritos em pacientes lúpicos e é possível que um defeito no *clearance* da cromatina favoreça uma maior exposição de imunógenos capazes de induzir a resposta autoimune (ROBEY et al., 1985).

Em camundongos lúpicos portadores do gene *lpr* se constatou uma expressão reduzida de uma proteína na superfície celular, denominada Fas , que tem a função de induzir a apoptose celular. Entre os mecanismos de apoptose dos linfócitos, além da ativação de receptores CD3 em células T, está a ligação do receptor Fas ao seu ligante (MOUNTZ et al., 1995). A ausência de expressão do Fas nesses animais implica na persistência de linfócitos auto-reativos (WATANABE-FUKUNAGA et al., 1992) e a correção desse defeito em animais transgênicos preveniu o desenvolvimento de autoimunidade (WU et al., 1994). Em humanos portadores de LES a expressão do Fas é normal, embora alguns pesquisadores reportem um aumento na concentração do Fas solúvel, capaz de inibir a apoptose dos linfócitos (CHENG, 1994), achado não confirmado por outros (GOEL, 1995).

Outra alteração identificada em células T de pacientes lúpicos é uma maior expressão da proteína *bcl-2* (ARINGER et al., 1994), um inibidor fisiológico da apoptose. Por outro lado, observações em experimentos realizados *in vitro* demonstraram uma elevada frequência de apoptose em linfócitos de pacientes lúpicos, determinando um aumento na quantidade de nucleossoma intacto no sobrenadante (EMLEN et al., 1994). Admitindo-se que estes registros possam ser extrapolados para o que ocorre *in vivo*, uma grande quantidade de nucleossoma poderia ser liberada na corrente sanguínea destes pacientes. Outros estudiosos reproduziram estas observações em pesquisas envolvendo culturas de linfócitos humanos, esplenócitos murinos e hibridomas, confirmando a liberação do nucleossoma em consequência da morte celular (BELL et al., 1990 , BELL & MORRISON, 1991 , FRANEK & DOLNIKOVA, 1991). Um reforço para essa hipótese advém da detecção de formação de complexos imunes quando hibridomas secretantes de anticorpos anti-dsDNA e anti-histonas foram cultivados

concomitantemente com aquelas células (BRINKMAN et al., 1989 , TERMAAT et al., 1990).

Estes distúrbios na apoptose podem ter duas consequências de grande significado. Além da persistência de células T auto-reativas (MARRACK et al., 1993) , verifica-se também a liberação de nucleossoma qualitativa e quantitativamente alterados, capazes de estimular a resposta autoimune. CABRESPINES et al. (1998), estudando a natureza e composição dos nucleossomas apoptóticos *in vitro* , encontraram uma degradação das histonas H3 e H4, que foi dramaticamente exacerbada com a presença dos anticorpos anti-nucleossoma, sugerindo que essa modificação nas histonas favoreça a exposição de peptídeos presentes na molécula complexada, que passam a ser reconhecidos como não próprios pelo sistema imune. Recentemente, o grupo da Universidade de Chicago localizou três regiões situadas nas histonas H2B e H4 do nucleossoma que agem como epítomos para linfócitos T *helper* patogênicos (KALIYAPERUMAL et al., 1996).

Essa nova população de anticorpos que reage com a molécula complexada de DNA e histonas foi evidenciada em estudos animais (LOSMAN et al., 1992 e 1993 ; BURLINGAME et al., 1993 ; AMOURA et al., 1994) e também em humanos (BURLINGAME et al., 1994 ; CHABRE et al., 1995), recebendo a denominação de anticorpos anti-nucleossoma restritos por se ligarem exclusivamente à estrutura quaternária do nucleossoma e não aos seus constituintes individuais, histonas e DNA nativo. Infelizmente , os testes de rotina para detecção dos anticorpos anti-DNA e anti-histonas utilizam essencialmente histonas e DNA isolados e são incapazes de identificar a presença dos anticorpos contra epítomos conformacionais do nucleossoma. Através do método imunoenzimático (ELISA) , utilizando-se como substrato o nucleossoma, se conseguiu detectar facilmente estes

anticorpos , trazendo grandes perspectivas para um melhor conhecimento da patogenia do LES. Entretanto, a sua importância clínica ainda permanece insuficientemente explorada.

Com base neste novo enfoque fisiopatogênico do LES é que elaboramos este estudo clínico , sendo esta a primeira pesquisa de anticorpos anti-nucleossoma numa população brasileira, envolvendo um número expressivo de portadores de lúpus. Esses pacientes foram divididos em grupo clinicamente ativo ou inativo segundo dois índices utilizados e validados na literatura, SLEDAI (BOMBARDIER et al., 1992) e LACC (UROWITZ et al., 1984), havendo predominância de indivíduos com lúpus em atividade (Tabela 2). A correlação encontrada entre os índices aplicados ($r= 0,818$) confirma a validade de ambos os métodos na mensuração da atividade lúpica.

A presença de envolvimento renal foi registrada em 75% de nossos casos, indicando que havia uma predominância de formas graves da doença nesta população, já que a nefrite é considerada um fator de pior prognóstico no LES (BALOW et al., 1987). Entre os pacientes que realizaram biópsia renal, o achado histológico mais frequente foi a glomerulonefrite mesangiocapilar classe IV da OMS(Quadro 4), em concordância com os registros de outros autores que também relatam uma predominância deste tipo histológico em suas séries (CAMERON, 1999). O maior número de pacientes com doença renal em nossa casuística reflete provavelmente uma maior gravidade do LES na população brasileira como evidenciada por JOHNSON et al. (1994) que, através de um estudo comparativo com pacientes britânicos e suecos, observaram que entre os brasileiros havia maior incidência de nefrite e que estes pacientes apresentavam doença de maior gravidade que os outros grupos estudados, quando avaliados pelo índice BILAG.

Nossa população é característica quanto à predominância do sexo feminino e média de idade de maior incidência do LES (Tabela 1), assemelhando-se à maioria dos relatos estatísticos que registram uma predominância desta patologia entre mulheres em idade fértil. Em alguns países europeus, o pico de incidência é registrado preferencialmente em mulheres mais idosas (HOPKINSON, 1992). Por tratar-se de um grupo de pacientes com tempo médio de doença e tempo médio de tratamento superior a 6 meses (Tabela 5) e, na sua maioria, em uso de corticoesteróides e/ou imunossupressores, a frequência das manifestações clínicas e laboratoriais encontradas diferiu daquela relatada na literatura, onde o quadro articular é descrito em cerca de 95% dos casos e o dermatológico em 85% destes (ROTHFIELD, 1989). As manifestações mais encontradas em nossa população revelaram a predominância de envolvimento renal, sendo a hematúria e a proteinúria os achados mais frequentes (Tabela 4).

O diagnóstico do LES baseado em critérios clínicos e laboratoriais, nem sempre é feito sem dificuldades. Sendo o lúpus uma doença que se caracteriza pela presença de múltiplos anticorpos e acomete diversos órgãos e sistemas, torna-se importante a identificação de melhores marcadores imunológicos que possibilitem, além de um diagnóstico precoce, um melhor controle de atividade em períodos de remissão e recaídas. A frequência dos dois anticorpos mais específicos, o anti-dsDNA e o anti-Sm , em pacientes lúpicos não tratados varia de 40 a 90% e de 5 a 30% , respectivamente (CAMERON, 1999). Em nosso estudo, a sensibilidade dos anticorpos avaliados, incluindo todos os pacientes, independente do tratamento e da atividade, foi de 43,5% para o anti-dsDNA e de 71,8% para o anti-nucleossoma. Os anticorpos anti-nucleossoma mostraram-se significativamente mais sensíveis que os anticorpos anti-dsDNA ($p < 0,001$) e, quando comparados com dados da literatura, a sua sensibilidade também foi maior

do que a estimada para os anticorpos anti-Sm e anti-Ro (CAMERON, 1999). Esses dois anticorpos são úteis no diagnóstico da doença, o anticorpo anti-Ro principalmente nos casos de LES com ANA negativo e o anticorpo anti-Sm por sua excelente especificidade (von MÜHLEN & TAN, 1995). Os anticorpos anti-dsDNA apresentaram uma especificidade de 94,7% , o que confirma a sua importância no diagnóstico do LES (von MÜHLEN & TAN, 1995). Embora a especificidade dos anticorpos anti-nucleossoma, 84,2% (Tabela 8), tenha sido inferior àquela registrada para os anticorpos anti-dsDNA, foi semelhante à relatada para os anticorpos anti-Ro, anti-La e anti-RNP (SANCHEZ-GUERRERO et al., 1996), apresentando no entanto uma maior sensibilidade, o que poderá representar um recurso diagnóstico suplementar. Uma vez que para determinação da sensibilidade e da especificidade em nosso estudo foram incluídos pacientes cronicamente enfermos e tratados, é provável que os valores encontrados se modifiquem com a seleção de indivíduos com menor tempo de doença e isentos de tratamento, o que poderá contribuir para confirmar a sua importância para o diagnóstico.

A presença dos anticorpos anti-nucleossoma entre os autoanticorpos é reportada com uma frequência elevada na literatura (BERDEN & SMEENK, 1996) e ocorre em cerca de 80% dos portadores de lúpus (BURLINGAME et al., 1994 ; CHABRE et al., 1995), podendo ser os únicos anticorpos anti-cromatina identificados nos soros destes pacientes. Em 10% dos nossos pacientes que apresentavam anticorpos anti-nucleossoma, a sua presença ocorreu de forma isolada, sem a concomitância dos anticorpos anti-histonas e anti-dsDNA. Este achado confirma relatos de outros autores que também identificaram estes anticorpos, que se fixam exclusivamente a epítomos conformacionais na molécula complexada (BURLINGAME et al., 1993 e 1994 ; AMOURA et al.,

1994) e não aos componentes individuais do nucleossoma. CHABRE et al. (1995) relataram a sua presença em 16% dos seus pacientes e BURLINGAME et al. (1994) em 30% de sua casuística. Considerando os dados anteriores que revelam uma melhor sensibilidade dos anticorpos anti-nucleossoma, a sua boa especificidade e, sobretudo, a possibilidade de serem os únicos anticorpos anti-cromatina presentes, é que sugerimos que a pesquisa desses anticorpos deva ser um teste útil no diagnóstico do LES.

Ambos os anticorpos, anti-dsDNA e anti-nucleossoma, foram detectados de forma significativamente mais importante nos doentes com lúpus, embora reatividade tenha sido observada na artrite reumatóide com menor frequência, sobretudo para os anticorpos anti-nucleossoma (Tabela 7). A ocorrência de baixos títulos de anti-dsDNA é ocasionalmente encontrada em patologias como a artrite reumatóide, hepatite crônica ativa, Síndrome de Sjögren, *miastenia gravis* e certas infecções (TOMER et al., 1993 ; von MÜHLEN, 1995) Uma justificativa para esse achado pode ser a contaminação com ss-DNA, (TOMER et al., 1993) encontrada sobretudo quando se utiliza para identificação o método imunoenzimático (von MÜHLEN & TAN, 1995) .

Os anticorpos anti-nucleossoma presentes nos portadores de artrite reumatóide estiveram sempre associados aos anticorpos anti-histona e/ou anti-dsDNA . Algumas possibilidades podem ser inferidas para justificar a ocorrência daqueles anticorpos em portadores de AR, embora de modo não significativo em relação ao LES. A primeira é que anticorpos anti-histonas foram encontrados em 56,2% dos portadores de AR e, como as histonas participam da composição do nucleossoma, é possível que parte dessa reatividade seja devida a esses anticorpos. Eles estão presentes em 15% das formas não complicadas de artrite reumatóide ,

em 83% dos doentes com síndrome de Felty e em 75% da artrite reumatóide associada a vasculites (COHEN et al., 1992). Faz-se necessário um estudo de adsorção dos anticorpos anti-histonas para verificar a persistência ou não da positividade dos anticorpos anti-nucleossoma neste grupo de indivíduos. Outra possibilidade é que esse achado reflita a associação de AR e LES, vista em alguns casos. Em um dos nossos pacientes pudemos detectar posteriormente o anticorpo anti-Sm, confirmando a associação entre as duas patologias. Finalmente, uma questão especulativa é se os anticorpos anti-nucleossoma estariam também relacionados à patogênese da AR, cuja etiologia ainda não foi bem definida. YU et al. (1997) estudando o fluido sinovial de pacientes que apresentavam processo inflamatório articular, principalmente portadores de AR, identificaram um aumento de oligonucleossomas, semelhante àqueles produzidos durante a apoptose. Uma variedade de atividades biológicas envolvendo oligonucleossomas, incluindo a liberação de interleucina 6, a estimulação de proliferação linfocitária e a síntese de IgG são relatadas *in vitro* (BELL et al., 1990 ; BELL & MORRINSON , 1991; HEFENEIDER & BENNET , 1992), sendo portanto admissível que a presença desses oligonucleossomas no líquido sinovial tenha significado patogênico, a exemplo do que tem sido observado na nefrite lúpica (MOHAN et al., 1993).

Embora a maioria dos estudos registre a associação entre a atividade lúpica e elevação dos títulos de anticorpos anti-dsDNA (SCHUR & SANDSON, 1968 ; PISETSKY , 1992 ; OHAMURA et al., 1993) encontram-se igualmente relatos discordantes na literatura (GLADMAN et al., 1979 ; ISENBERG et al., 1984). Em nossa casuística observamos tal associação ($p < 0,0001$), estando anticorpos anti-dsDNA presentes em apenas um paciente com doença inativa (Tabela 9). É possível que estes achados discordantes possam ser

explicados pela existência de anticorpos anti-dsDNA de natureza não patogênica, pela variabilidade entre os diferentes métodos laboratoriais de detecção dos anticorpos ou que outros anticorpos tenham papel igualmente relevante no desenvolvimento da reatividade lúpica. Comumente os anticorpos anti-dsDNA se associam a manifestações mais severas do LES como, por exemplo, a ocorrência de nefrite (SCHUR & SANDSON, 1968 ; OKAMURA et al., 1993). Essa associação é registrada principalmente, embora de modo não exclusivo, quando se utiliza a técnica de Farr, (LIGHTFOOT et al., 1975) capaz de detectar anticorpos de alta avidéz (SMEENK et al., 1981) que ocorrem sobretudo quando existe envolvimento renal (GERSWIN & STEINBERG, 1974 ; LEON et al., 1977). Em nossa pesquisa utilizamos o método imunoenzimático (ELISA) e com esse teste pudemos verificar uma associação dos anticorpos anti-dsDNA com atividade clínica, inclusive nos pacientes sem envolvimento renal (Tabela 13). O teste ELISA é capaz de detectar anticorpos de avidéz intermediária (SMEENK et al., 1981) que, como relatado por GERSWIN & STEINBERG (1974), podem estar presentes nos portadores de lúpus sem doença renal. Talvez seja esta a justificativa para a associação por nós registrada entre a presença dos anticorpos anti-dsDNA e atividade da doença, no grupo sem nefrite. É importante também observar que alguns pacientes incluídos no grupo com manifestações extra-renais apresentavam outras formas igualmente graves da doença, como a presença de vasculite cutânea, vasculite do SNC e serosites (Tabela 4) . ROTHFIELD (1989) assinala a existência de outros parâmetros que também permitem classificar os pacientes como portadores de doença mais severa. Entre esses estão a presença de trombocitopenia, anemia hemolítica, convulsões, doença cerebral orgânica, vasculite de pele e outros órgãos e serosites.

Verificamos em nosso estudo a associação entre anticorpos anti-nucleossoma e lúpus em atividade, bem como correlação com os índices de atividade (Tabela 9 , Figuras 3 e 4), a exemplo do que foi relatado por outros investigadores (CHABRE et al., 1995 ; MASSA et al., 1994).

AMOURA et al.(1997) por sua vez verificaram que 16% dos pacientes com doença ativa e 24% daqueles com doença inativa apresentavam títulos elevados de nucleossoma circulante, evidenciando uma correlação inversa entre o antígeno e os anticorpos anti-nucleossoma. Essa correlação inversa pode sugerir que os anticorpos anti-nucleossoma possam ser retirados rapidamente da circulação com a formação de imunocomplexos. Nenhuma associação foi registrada, neste estudo, entre o nucleossoma circulante e SLEDAI ou C3. Em nossa pesquisa a presença dos anticorpos anti-nucleossoma, se correlacionou significativamente com aquele índice de atividade ($r= 0,486$ $p<0,0001$). Ao contrário do observado com os anticorpos anti-dsDNA, 25% dos pacientes com anticorpos anti-nucleossoma positivos encontravam-se em remissão. A identificação desses anticorpos em períodos de inatividade da doença é um dado interessante e não tem sido verificado em outros estudos (MASSA e al., 1994). Algumas questões poderiam ser formuladas: a reatividade anti-nucleossômica seria decorrente da presença dos anticorpos anti-histonas, também registrada em 30,2% dos pacientes sem atividade clínica ? A terapêutica com drogas imunossupressoras utilizada teria sido incapaz de reduzir os títulos desses anticorpos ou essa positividade representaria um indicador de recidiva iminente ?

Entre os 13 pacientes inativos com anticorpos anti-nucleossoma presentes, 70% pertenciam ao grupo com nefrite e ainda apresentavam algumas alterações laboratoriais como hematúria (45%) ou proteinúria (77,7%). A presença de hematúria em pacientes sem atividade clínica é valorizada por alguns estudiosos

como um sinal precoce de reativação de nefrite lúpica (HEBERT, 1995). Dos três pacientes em que foi obtido um soro controle, em dois houve redução dos títulos em concordância com a redução do SLEDAI e no outro, um aumento do título dos anticorpos anti-nucleossoma e também do índice de atividade. Como é pequeno o número de observações, a utilidade desses anticorpos como preditor de recidiva clínica deverá ser determinado por um estudo longitudinal.

É improvável que a positividade dos anticorpos anti-nucleossoma nos doentes inativos ocorra exclusivamente pela presença dos anticorpos anti-histonas. Estudos de adsorção em coluna de sefarose comprovam a persistência dos anticorpos anti-nucleossoma mesmo após a retirada dos anticorpos anti-dsDNA e anti-histonas (CHABRE et al., 1995). BURLINGAME et al. (1994) mostraram que menos de 25% da atividade anti-nucleossoma dos seus pacientes lúpicos era devida aos anticorpos anti-dsDNA, permitindo concluir que os anticorpos anti-nucleossoma restritos representavam a fração majoritária da atividade anti-nucleossômica observada nestes pacientes. Além do que, em nossa pesquisa os anticorpos anti-histonas não se associaram com atividade do lúpus (dados não apresentados), como evidenciado com os anticorpos anti-nucleossoma.

É interessante observar que a associação dos anticorpos anti-nucleossoma com a atividade do lúpus foi observada em nosso estudo quando os pacientes foram avaliados conjuntamente. Quando eles foram classificados segundo a presença ou ausência de envolvimento renal pudemos constatar que a associação com atividade persistia no grupo com nefrite ($p=0,021$) mas não naqueles com manifestações extra renais ($p=0,282$), diferindo dos anticorpos anti-dsDNA, que se associaram com atividade nos dois grupos. Este comportamento diferente dos anticorpos anti-nucleossoma, quando comparado aos anticorpos anti-dsDNA nesta análise, confirma que a reatividade anti-nucleossômica é devida a esta nova

população de anticorpos anti-cromatina. Este achado clínico pode representar uma confirmação dos relatos experimentais que demonstram a importância dos anticorpos anti-nucleossoma no processo nefritogênico (KRAMERS et al., 1994). AMOURA et al.(1994), estudando eluatos renais de camundongos da linhagem lpr/lpr, identificaram tanto anticorpos anti-dsDNA como anticorpos anti-nucleossoma. Após adsorção dos anticorpos anti-dsDNA registraram uma manutenção de 40% da atividade anti-nucleossômica, sugerindo que esses anticorpos possam ter participação fundamental na patogênese da nefrite lúpica. Posteriormente a esse relato, van BRUGGEN et al.(1997) relataram a presença do nucleossoma nos depósitos imunes glomerulares em 45% das biópsias renais de pacientes com glomerulonefrite proliferativa difusa, classe IV da OMS. Outros estudos informam que os anticorpos ligados a epítomos da cromatina, como o dímero H2A-H2B com ou sem DNA, se associam melhor à nefrite do que os anticorpos anti-dsDNA em pacientes lúpicos (BURLINGAME et al.,1994). Um dos mecanismos de ligação do nucleossoma à membrana basal é a interação entre a porção catiônica das histonas com o sulfato de heparan, constituinte aniônico da membrana glomerular. A importância das histonas nesse processo foi comprovada nos experimentos de SCHMIEDEKE et al. (1989) que, após perfundi-las em rins de rato, confirmaram sua alta afinidade pela membrana basal, observando que também mediavam a ligação do DNA. Os anticorpos anti-dsDNA e anti-nucleossoma quando perfundidos isoladamente por van BRUGGEN et al.(1994), não se ligaram ao tecido renal, contrariando a teoria de reação cruzada dos anticorpos anti-nucleares com antígenos renais, sugerida por alguns investigadores (EILAT,1985). CORITSIDIS et al.(1995) acreditam que parte da concentração dos oligonucleossomas no glomérulo é feita por um receptor presente em células mensageiras, ao demonstrarem que essas células em cultura eram capazes de fixar

os oligonucleossomas de uma forma saturável. KOUTOUZOV et al.(1996) também identificaram a presença de receptor de nucleossoma em superfície celular.

Contudo, os poucos dados clínicos registrados até o momento são insuficientes para se concluir de modo definitivo que os anticorpos anti-nucleossoma estejam associados a manifestações específicas do lúpus , sobretudo à nefrite, como já identificado em alguns estudos (BURLINGAME et al., 1994 ; SUENAGA et al., 1996). Estes achados só foram contestados até o momento por MASSA et al. (1994), que não conseguiram demonstrá-los no lúpus juvenil.

A exemplo de outros autores (CHABRE e al., 1995), através de análise univariada também não demonstramos nenhuma associação entre a presença dos anticorpos anti-nucleossoma ou anticorpos anti-dsDNA com manifestações clínicas e laboratoriais isoladas do LES (Tabela 16 e 17).

Um maior número de pacientes com anticorpos presentes foi encontrado entre aqueles com tempo de doença ou tempo de tratamento menor que seis meses (Tabelas 18 e 19). Os que tinham maior tempo de doença ou de tratamento haviam também recebido maior intervenção terapêutica com drogas imunossupressoras capazes de reduzir os títulos de anticorpos.

O número de pacientes não tratados foi pequeno em nossa série (n=13), quando comparado àqueles tratados (n=58). A média dos títulos séricos dos anticorpos anti-nucleossoma e anti-dsDNA foi superior no grupo sem tratamento, não atingindo porém diferença estatisticamente significativa em comparação aos pacientes tratados (Tabela 20). Estes achados se assemelham ao que foi descrito por BURLINGAME et al.(1994) mas diferem dos relatos de MASSA et al.(1995), que identificaram diferenças nos títulos desses anticorpos , entre pacientes tratados e não tratados, numa população lúpica juvenil.

A análise do tipo de tratamento, corticosteróide isolado ou associado a imunossupressor, em função do tempo de doença e do tempo de tratamento, evidenciou que o número de pacientes em uso de corticosteróide como terapêutica única e com tempo de doença ou de tratamento menor que 6 meses, com ambos os anticorpos presentes, anti-nucleossoma e anti-dsDNA, era significativamente superior em relação àqueles com maior tempo de doença ou de tratamento (Tabelas 21 e 22). É provável que a monoterapia com esteróides seja insuficiente para uma redução mais precoce dos títulos dos anticorpos nesta população estudada, apresentando predomínio de formas mais graves do lúpus. Essa hipótese é reforçada pelos achados de BURLINGAME et al.(1994) que também constataram que seus pacientes tratados com prednisona apresentavam títulos de anticorpos anti-nucleossoma e anti-dsDNA semelhantes aos de pacientes não tratados.

Ao avaliarmos em nossa casuística os pacientes cujo tratamento também incluía o emprego de imunossupressor, não se verifica diferença estatisticamente significativa na positividade dos anticorpos em função do tempo de doença ou de tratamento, embora se observe em um percentual considerável de pacientes tratados por mais de 6 meses a persistência de um dos anticorpos. Nossa observação pode decorrer do pequeno número de pacientes que compõe cada um desses subgrupos. Entretanto é lícito supor que como os anticorpos anti-nucleossoma e anti-dsDNA estiveram associados à atividade clínica do lúpus nesta população, a instituição de uma terapêutica mais agressiva favoreça a redução dos títulos desses anticorpos e também uma remissão mais rápida e duradoura da doença. Isso foi demonstrado por BALLOW et al.(1984) em portadores de nefrite lúpica tratados com o emprego de ciclofosfamida venosa.

Nosso estudo sugere uma aplicabilidade clínica para a pesquisa de anticorpos anti-nucleossoma em portadores de LES, uma vez que títulos séricos desses anticorpos estiveram associados à atividade da doença, notadamente nas formas em que ocorreu comprometimento renal.

A identificação desses anticorpos pode também contribuir para uma melhor definição da etiopatogenia do lúpus. Considerando-se a possibilidade de que vários distúrbios no LES resultem em alterações do processo de apoptose, gerando nucleossomas capazes de induzir auto-imunidade, deve-se admitir igualmente o significado patogênico dos anticorpos anti-nucleossoma como marcadores do processo de morte celular. A confirmação dessa hipótese poderá contribuir para que se estabeleçam novas abordagens terapêuticas e um controle mais efetivo das manifestações clínicas do lúpus.

CONCLUSÕES

6.0 CONCLUSÕES

Nosso estudo, realizado em 71 pacientes portadores de LES, permitiu as seguintes conclusões:

1. Portadores de LES apresentaram anticorpos anti-nucleossoma com frequência significativamente maior (71,8%) em comparação a um grupo controle de indivíduos sadios (3,8%) e a portadores de artrite reumatóide (34,4%) ou de glomerulopatias primárias (0 %), ($p < 0,0001$).
2. Os anticorpos anti-nucleossoma foram identificados nos portadores de LES com frequência superior àquela em que foram observados anticorpos anti-dsDNA (71,8% vs. 43,6% , $p < 0,0001$), exibindo no entanto menor especificidade (84,2% vs. 94,7%, $p < 0,009$) . O mesmo verificou-se em relação ao anticorpo anti-Sm , comparando-se aos dados referidos na literatura.
3. A reatividade anti-nucleossômica foi observada no grupo de portadores de LES sem atividade clínica numa frequência maior do que os anticorpos anti-dsDNA. Entre os pacientes lúpicos que não apresentavam doença em atividade, anticorpos anti-nucleossoma foram identificados em 13 deles, representando 25,5% do total de pacientes com aqueles anticorpos presentes. Os anticorpos anti-dsDNA , por sua vez, foram identificados em apenas um paciente com doença inativa, ou seja 3,2% dos casos em que estiveram presentes.

4. A presença de anticorpos anti-nucleossoma mostrou correlação com os índices de atividade lúpica, SLEDAI e LACC ($r=0,486$, $p<0,0001$; $r=0,536$, $p<0,0001$, respectivamente). O mesmo foi observado em relação aos anticorpos anti-dsDNA ($r=0,449$, $p<0,0001$; $r=0,488$, $p<0,0001$, respectivamente).

5. Em 28 pacientes portadores de LES submetidos a uma segunda avaliação clínica, verificou-se a manutenção da correlação entre os títulos de anticorpos anti-nucleossoma e a variação da atividade lúpica, avaliada através do índice SLEDAI ($r=0,573$, $p=0,001$), sendo a mesma observação verificada em relação aos títulos dos anticorpos anti-dsDNA ($r=0,518$, $p=0,004$).

6. A presença dos anticorpos anti-nucleossoma esteve associada à ocorrência de nefrite no grupo de pacientes com LES em atividade ($p=0,021$), o que também se verificou em relação aos anticorpos anti-dsDNA ($p<0,0001$). Entretanto, apenas os anticorpos anti-dsDNA tiveram sua detecção associada à atividade lúpica na ausência de nefrite ($p=0,026$).

7. Nenhuma associação foi verificada, através de análise univariada, entre a presença dos anticorpos anti-nucleossoma ou anticorpos anti-dsDNA e manifestações clínicas e laboratoriais isoladas do LES.

8. Anticorpos anti-nucleossoma, ditos restritos, foram detectados em 5 dos 51 portadores do LES (10%) que apresentavam reatividade anti-nucleossômica.

9. Tempo de doença inferior a 6 meses esteve associado a presença de maior número de pacientes com positividade dos anticorpos anti-nucleossoma e anti-dsDNA quando comparados aos portadores de LES com maior tempo de doença ($p=0,041$ e $p=0,001$, respectivamente). O mesmo foi verificado para tempo de tratamento inferior a 6 meses ($p=0,003$ e $p=0,005$, respectivamente).

10. Títulos séricos médios de anticorpos anti-nucleossoma e de anticorpos anti-dsDNA foram mais elevados em pacientes lúpicos não tratados, não mostrando no entanto diferença significativa em relação aos pacientes tratados ($p=0,137$ e $p=0,08$, respectivamente).

11. Um maior número de pacientes com anticorpos anti-nucleossoma e anticorpos anti-dsDNA foi observado entre aqueles tratados apenas com corticosteróides e com tempo de doença ($p=0,034$ e $p=0,001$) ou de tratamento inferior a 6 meses ($p=0,016$ e $p=0,003$) o que não foi verificado no grupo em tratamento com terapêutica combinada de corticosteróides e imunossuppressores.

BIBLIOGRAFIA

7.0 BIBLIOGRAFIA

ABRASS, C.K., NIES, K.M., LOUIE, J.S., BORDER, W.A., GLASSOCK, R.J. Correlation and predictive accuracy of circulating immune complexes with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum.**, v.23, p.273-282, 1980.

ALARCON-SEGOVIA, D., ABUD-MENDONZA, C., DIAZ-JOUANEN, E., IGLESIAS, A., DELOS REYES, V., HERNANDEZ-ORTIZ, J. Deforming arthropathy of the hands in SLE. **J. Rheumatol.**, v.15, p. 65-69 , 1988.

ALEXOPOULOS, E., SERON, D., HARTLEY, R.B., CAMERON, J.S. Lupus Nephritis: correlation of interstitial cells with glomerular function. **Kidney Int.**, v.37, p.100-109, 1990.

AMOURA, Z., CHABRE, H., KOUTOUZOV, S., CABRESPINES, A., BACH, J-F., JACOB, L. Nucleosome restricted antibodies are detected before anti-dsDNA and/or antihistones antibodies in serum of MRL-Mp lpr/lpr and +/+ mice, and are present in kidney eluates of lupus mice with proteinuria. **Arthritis Rheum.**, v. 37, p. 1684-1688, 1994.

AMOURA, A., PIETTE, J-C., CHABRE, H., CACOUB, P., PAPO, T., WECHSLER, B., BACH, J-F., KOUTOUZOV, S. Circulating plasma levels of nucleosomes in patients with systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum.** , v.40, p.2217-2225,1997.

APPEL, A.E., SABLAY, L.B., GOLDEN, R.A., BARLAND, P., GRAYZEL, A.I., BANK, N. The effect of normalization of serum complement and anti-DNA antibody on the course of lupus nephritis. **Am. J. Med.**, v. 64, p.274-283, 1978.

ARANA, R., SELIGMANN, M. Antibodies to native and denatured deoxyribonucleic acid in systemic lupus erythematosus. **J. Clin. Invest.**, v.46, p.1867-1882, 1967.

ARENTS, G., BURLINGAME, R.W., WANG, B.C., LOVE, W.E., MOUDRIANAKIS, E.N. The nucleosomal core histone octamer at 3.1 Å resolution: a tripartite protein assembly and left-handed superhelix. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 88, p. 10148-10152, 1991.

ARINGER, M., WINTERSBERGER, W., STEINER, C.W., KIENER, H., PRESTERL, E., JALGER, V., SMOLEN, J.S., GRANINGER, W.B. High levels of bcl-2 protein in circulating T lymphocytes, but not in B lymphocytes of patients with systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum.**, v.37, p.1423-1430, 1994.

ARNETT, F.C., REVEILL, J.D., WILSON, R.W. Systemic Lupus Erythematosus: Current state of the genetic hypothesis. **Semin. Arthritis Rheum.**, v.14, p.24-35, 1984.

ATKINSON, M.J., BELL, D.A., SINGHAL, S.K. A naturally occurring polyclonal B cell activator of normal and autoantibody responses. **J. Immunol.**, v.135, p.2524-2533, 1985.

BAEHR G., KLEMPERER P., SCHIFRIN A . A diffuse disease of peripheral circulation usually associated with lupus erythematosus and endocarditis. **Trans.Assoc. Am. Physicians**, v.50, p.139, 1935.

BALLOU, S.P. , KHAN, M.A , KUSHNER, I. Clinical features of systemic lupus erythematosus. Differences related to race and age of onset. **Arthritis and Rheum.**, v.25, p.55-60, 1982.

BALLOW, J.E., AUSTIN, H.A. III, MUENZ, L.R., JOYCE, R.M., ANTONOVYCH, T.T., KLIPPEL, J.H., STEINBERG, A.D., PLOTZ, P.H., DECKER, J.L. Effect of treatment on the evolution of renal abnormalities in lupus nephritis. **N. Engl. J. Med.**, v.311, p.491-495, 1984.

BALLOW, J.E., AUSTIN, H.A., TSOKOS, G.C., ANTONOVYCH, T.T., STEINBERG, A.D., KLIPPEL, J.H. Lupus Nephritis. **Ann. Int.Med.**, v.106, 79-94, 1987.

BARZIZZA, F., VENCO, A ., GRANDI, M., FINARDI, G. Mitral valve prolapse in systemic lupus erythematosus. **Clin. Exp. Rheumatol.**, v.5, p.59-62, 1987.

BELL, D.A ., MORRISON, B., van DEN BYGAART, P. Immunogenic DNA-related factors: nucleosomes spontaneously released from normal murine

lymphoid cells stimulate proliferation and immunoglobulin synthesis of normal mouse lymphocytes. **J. Clin. Invest.**, V. 85, p. 1487-1496, 1990.

BELL, D.A., MORRINSON, B. The spontaneous apoptotic cell death of normal human lymphocytes in vitro: the release of, and immunoproliferative response to nucleosomes in vitro. **Clin. Immunol. Immunopathol.**, v. 60, p. 13-26, 1991.

BEN-CHETRIT, E. The molecular basis of the SSA/Ro antigens and the clinical significance of their autoantibodies. **Br. J. Rheumatol.**, v. 32, p. 396-402, 1993.

BERDEN, J.H.M., SMEENK, R.J.T. Nucleosome-specific auto-antibodies, in **Autoantibodies**, edited by Peter, J.B., Shoenfeld, Y. Amsterdam, Elsevier, p.574, 1996.

BLOCK, S.R., WINFIELD, J.B., LOCKSHIN, M.D. Studies of twin in systemic lupus erythematosus. A review of the literature and presentation of 12 additional sets. **Am. J. Med.**, v. 59, p. 533-552, 1975.

BLOTZWER, J.W. Systemic Lupus erythematosus I: Historical Aspects. **Md. State Med. J.**, v.32, p.439-441, 1983.

BOMBARDIER, C., GLADMAN, D.D., UROWITZ, M.B., CARON, D., CHANG, C.H., and THE COMMITTEE ON PROGNOSIS STUDIES IN SLE: Derivation of SLEDAI : a disease activity index for lupus patients. **Arthritis Rheum.**, v.35, p. 630-640, 1992.

BOUMPAS, D.T., BAREZ, S., KLIPPEL, J.H., BALLOW, J.E. Intermittent cyclophosphamide for the treatment of autoimmune thrombocytopenia in Systemic Lupus Erythematosus. **Ann. Intern. Med.**, v.112, p.674-677, 1990.

BOUMPAS, D.T., AUSTIN, H.A., VAUGHN, E.M., e al. Controlled trial of pulse methylprednisolone versus two regimens of pulse cyclophosphamide in severe lupus nephritis. **Lancet**, v.340, p.741-745,1992.

BRINKMAN, K. , TERMAAT, R.M., DE JONG, J., van DEN BRINK, H.G., BERDEN, J.H.M., SMEENK, R.J.T. Crossreactive binding patterns of monoclonal antibodies to DNA are often caused by DNA/anti-DNA immune complexes . **Res. Immunol.** , v.140, p.594-612, 1989.

BRINKMAN, K., TERMAAT, R.M., BERDEN, J.H.M., SMEENK, R.J.T. Anti-DNA antibodies and lupus nephritis: the complexity of crossreactivity. **Immunol. Today**, v.11, p.232-234, 1990.

BURLINGAME, R.W., RUBIN, R.L. Drug-induced anti-histone autoantibodies display two patterns of reactivity with substructures of chromatin . **J. Clin. Invest.**, v. 88, p.680-690, 1991.

BURLINGAME, R.W., RUBIN, R.L., BALDERAS, R.S., THEOFILOPOULOS, N.A. Genesis and evolution of antichromatin autoantibodies in murine lupus implicates T-dependent immunization with self antigen. **J. Clin. Invest.**, v. 91, p.1687-1696, 1993.

BURLINGAME, R.W., BOEY, M.L., RUBIN, R.L. The central role of chromatin in autoimmune responses to histones and dsDNA in systemic lupus erythematosus. **J. Clin. Invest.**, v. 94, p.184-192, 1994.

BUYON, J.P., TAMERIUS, J., BELMONT, H.M., ABRAMSON, S.B. Assessment of disease activity and impending flare in patients with systemic lupus erythematosus: comparison of the use of complement split products and conventional measurements of complement. **Arthritis Rheum.**, v.35, p.1028-1037, 1992.

CABRESPINES, A., LADERACH, D., LEBOSSÉ, C., BACH, J.F., KOUTOUZOV, S. Isolation and characterization of apoptotic nucleosomes, free and complexed with lupus autoantibody generated during hybridoma B-Cell apoptosis. **J. Autoimm.**, v. 11 p.19-27, 1998.

CALLAHAN, L.F., PINCUS, T. Associations between clinical status questionnaire scores and formal education level in persons with SLE. **Arthritis Rheum.**, v.33, p.407-411, 1990.

CAMERON, J.S. Lupus nephritis. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v.10, p.1-21, 1999.

CHABRE, H., AMOURA, Z., PIETTE, J-C., GODEAU, P., BACH, J-F., KOUTOUZ, S. Presence of nucleosome restricted antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum.**, v. 38, p.1485-1491, 1995.

CHENG, J., ZHOU, T., LIU, C., SHAPIRO, J.P., BRAUER, M.J., KIEFER, M.C., BARR, P.J., MOUNTZ, J.D. Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. **Science**, v.263, p.1759-1762, 1994.

CHU, E.B., ERNST, D.N., HOBBS, M.V., WEIGLE, W.O., Maturation changes in CD4 cell subsets and lymphokine production in BXSB mice. **J. Immunol.**, v. 152, p.4129-4138, 1994.

CHUSED, T.M., STEINBERG, A.D., TALAL, N. The clearance and localization of nucleic acid by New Zealand and normal mice. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 12, p.465-476, 1972.

CHRISTIAN, C.L. Prognosis and therapeutic implications of immunologic test results in rheumatic disease. **Hum. Pathol.**, v. 14, p.446-448, 1983.

CRAFT, J. Antibodies to SnRNPs in systemic lupus erythematosus. **Rheum. Dis. Clin. North Am.**, v.18, p.311-335, 1992.

COHEN, P.L., ZIFF, M. Abnormal polyclonal B cell activation in NZB/NZW F1 mice. **J. Immunol.**, v. 119, p.1534-1537, 1977.

COHEN, M.G., POLLARD, K.M., WEBB, J. Antibodies to histones in systemic lupus erythematosus: prevalence, specificity, and relationship to clinical and laboratory features. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 51, p.61-66, 1992.

COHEN, J. Apoptosis. **Immunol. Today**, v.14, p.126-130, 1993.

CORITSIDIS, G.N., BEERS, P.C., RUMORE, P. Glomerular uptake of nucleosomes: evidence for receptor-mediated mesangial cell binding. **Kidney Int.**, v. 47, p.1258-1265, 1995.

DATTA, S.K. , PATEL, H. , BERRY, D. Induction of a cationic shift in IgG anti-DNA autoantibodies: Role of T helper cells with classical and novel phenotypes in three murine models of lupus nephritis. **J. Exp. Med.** , v.165, p.1252-1268, 1987.

DAUPHINEE, M.J., KIPPER, S.B., WOFSKY, D. , TALAL, N. Interleukin deficiency is a common feature of autoimmune mice. **J. Immunol.**, v. 127, p.2483-2487, 1981.

DEAPEN, D.M., WEINRIB, L., LANGHOLZ, B., HORWITZ, D.A, MACK, T.M. A revised estimate of twin concordance in SLE : A survey of 138 pairs. **Arthritis Rheum.**,v. 29, p.S26, 1986.

DEICHER, H.R., HOLMAN H.R., KUNKEL H.G. The precipitin reaction between DNA and serum factor in SLE. **J.Exp.Med.**, v.109 , p.97, 1959.

CORITSIDIS, G.N., BEERS, P.C., RUMORE, P. Glomerular uptake of nucleosomes: evidence for receptor-mediated mesangial cell binding. **Kidney Int.**, v. 47, p.1258-1265, 1995.

DATTA, S.K. , PATEL, H. , BERRY, D. Induction of a cationic shift in IgG anti-DNA autoantibodies: Role of T helper cells with classical and novel phenotypes in three murine models of lupus nephritis. **J. Exp. Med.** , v.165, p.1252-1268, 1987.

DAUPHINEE, M.J., KIPPER, S.B., WOFKY, D. , TALAL, N. Interleukin deficiency is a common feature of autoimmune mice. **J. Immunol.**, v. 127, p.2483-2487, 1981.

DEAPEN, D.M., WEINRIB, L., LANGHOLZ, B., HORWITZ, D.A, MACK, T.M. A revised estimate of twin concordance in SLE : A survey of 138 pairs. **Arthritis Rheum.**,v. 29, p.S26, 1986.

DEICHER, H.R., HOLMAN H.R., KUNKEL H.G. The precipitin reaction between DNA and serum factor in SLE. **J.Exp.Med.**, v.109 , p.97, 1959.

DUBOIS, E.L., WALLACE, D.J. Clinical and laboratory manifestations of SLE. In Wallace, D.J. and Dubois, E.L. (eds.) **Lupus Erythematosus**. Philadelphia, Lea & Febiger, p.317-449, 1987.

EAGEN, J.W., MEMOLI, V.A., ROBERTS, J.L., MATHEW, G.R., SCHWARTZ, M.M., LEWIS, E.J. Pulmonary hemorrhage in SLE. **Medicine**, v.57, p.545-560, 1978.

EILAT, D., FISCHER, R., ZLOTNICK, A. Autoantibodies to anti-DNA with anti-allotypic and anti-idiotypic specificities in (NZB X NZW) F1 mice. **Eur. J. Immunol.**, v.15, p.375-381, 1985.

EISER, A. R., SHANIES, H.M. Treatment of lupus interstitial lung disease with intravenous cyclophosphamide. **Arthritis Rheum.**, v.37, p.428-431, 1994.

EMLLEN, W., MANNIK, M. Effect of DNA size and strandedness on the in vitro clearance and organ localization of DNA. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 56, p.185-192, 1984.

EMLLEN, W., NIEBUR, J.A., KADERA, R. Accelerated in vitro apoptosis of lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. **J. Immunol.**, v. 152, p.3685-3692, 1994.

EMLLEN, W., O'NEILL, L. Clinical significance of antinuclear antibodies. **Arthritis Rheum.**, v.40, p.1612-1618, 1997.

ESDAILE, J.M., SAMPALIS, J.S., LaCAILLE , D., DANOFF, D. The relationship of socioeconomic status to subsequent health status in systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum.**, v.31, p.423-427, 1988.

ESDAILE, J.M., JOSEPH, L., ABRAHAMOWICZ, L. Y., DANOFF, D. , CLARKE, A.E. Routine immunologic tests in systemic lupus erythematosus : is there a need for more studies ? **J. Rheumatol.**, v. 23, p.1891-1896, 1996 a.

ESDAILE, J.M., ABRAHAMOWICZ, M., JOSEPH, L., MACKENZIE, T., LI, Y, DANOFF, D. Laboratory tests as predictors of disease exacerbations in systemic lupus erythematosus. Why some tests fail. **Arthritis Rheum.** , v.39, p.370-378, 1996 b.

FAABER, P., RIJKE, T.P.M., van DE PUTTE, L.B.A ., CAPEL, P.J.A ., BERDEN, J.H.M. Cross-reactivity of human and murine anti-DNA antibodies with heparan sulphate, the major glycosaminoglycan in glomerulo basement membranes. **J. Clin. Invest.**, v. 77, p.1824-1830, 1986.

FAUCI, A.S., MOUTSOPOULOS, H.M. Polyclonal triggered B cells in the peripheral blood and bone marrow of normal individuals and in patients with systemic lupus erythematosus and Sjogren syndrome . **Arthritis Rheum.**, v. 24(4), p. 577-583, 1981.

FELDMAN, M.D., HUSTON, D.P., KARSH, J., BALOW, J.E., KLIMA, E.Y., STEINBERG, A.D. Correlation of serum IgG, IgM , and anti-native-DNA

antibodies with renal and clinical indexes of activity in systemic lupus erythematosus. **J. Rheumatol.**, v 9, p.52-58,1982.

FESSEL, W.J. Epidemiology of systemic lupus erythematosus. **Rheum. Dis.Clin. North Am.**, v.14, p.15-23, 1988.

FISHER, C.L., EISENBERG, R.A., COHEN, P.L. Quantification and IgG subclass distribution of antichromatin autoantibodies in LE mice . **Clin. Immunol. Immunopathol.**, v. 46, p. 205-213, 1988.

FRONEK, Z. , TIMMERMAN, L.A , ALPER, C. A , HAHN, B. H. , KALUNIAN, K. , PETERLIN, B.M., McDEVITT, H.O Major histocompatibility complex genes and susceptibility to systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum.**, v. 37, p. 1542, 1990.

FRIIOU G.J. Clinical application of lupus serum nucleoprotein reaction using fluorescent antibody technique. **J.Clin.Invest.**, v.36, p.890, 1957.

FRITZLER, M.J., TAN, E.M. Antibodies to histones in drug-induced and idiopathic lupus erythematosus. **J. Clin. Invest.**, v. 62, p. 560-567, 1978.

FRITZLER, M.J. Clinical relevance of autoantibodies in systemic rheumatic diseases. **Mol. Biol. Rep.**,v. 23, p.133-145, 1996.

FRANEK, F., DOLNIKOVA, J. Nucleosomes occurring in protein- free hybridoma cell-culture: evidence for programmed cell death. **FEBS lett.**, v. 284, p.285-287,1991.

GAVALCHIN, J., DATTA, S.K. The NZB x SWR model of lupus nephritis.II. Autoantibodies deposite in renal lesions show a distinctive and restricted idiotypic diversity. **J. Immunol.**, v. 138, p.138-148,1987.

GERSHWIN, M.E., STEINBERG, A. D. Qualitative characteristics of anti-DNA antibodies in lupus nephritis. **Arthritis Rheum.**, v.17, p. 947-954, 1974.

GOHILL, J., CARY, P.D., COUPEZ, M. , FRITZLER, M.J. Antibodies from patients with drug-induced and idiopathic lupus erythematosus react with epitopes restricted to the amino and carboxil termini of histone. **J. Immunol.**, v. 135, p.3116-3121, 1985.

GILKESON, G. S., PIPPEN, A.M., PITSETSKY, D.S. Induction of cross-reactive anti-dsDNA antibodies in preautoimmune NZB/NZW mice by immunization with bacterial DNA. **J. Clin Invest.**, v.95, p.1398-1402, 1995.

GLADMAN, D.D, UROWITZ, M.B., KEYSTONE, E.C. Sorologically active clinically quiescent systemic lupus erythematosus: a discordance between clinical and serological features. **Am J. Med.** , v.66, p.210-215, 1979.

GLADMAN, D.D., GOLDSMITH, C.H., UROWITZ, M.B., BACON, P., BOMBARDIER, C., ISENBERG, D., KALUNIAN, K., LIANG, M.H., MADDISON, P, NIVEDO, RICHTER, M., SNAITH, M., SYMMONS, D., ZOMA, A. Sensitivity to change of 3 systemic lupus erythematosus disease activity indices: International validation. **J. Rheumatol.**, v. 21. P.1468-1471, 1994.

GOEL, N., ULRICH, D.T., St CLAIR, E.W., FLEMING, J.A., LYNCH, D.H., SELDIN, M.F. Lack of correlation between serum soluble Fas/APO-1 levels and autoimmune disease. **Arthritis Rheum.**, v.38, p.1738-1743, 1995.

GUTIERREZ-RAMOS, J.C., ANDREU, J. L., REVILLA, Y., VINUELA, E., MARTINEZ, A C. Recovery from autoimmunity of MRL/lpr mice after infection with na interleukin-2/vaccinia recombinant virus. **Nature**, v.346, p.271-274, 1990.

GUERNE, P.A., CARSON, D.A., LOTZ, M. IL-6 production by human articular chondrocytes. Modulation of its synthesis by cytokines, growth factors , and hormones in vitro. **J. Immunol.** , v.144, p. 499-505, 1990.

HARRIS, E.N., GHARAVI, A E., BOEY, M.L Anticardiolipin antibodies: detection by radioimmunoassay and association with trombosis in systemic lupus erythematosus. **Lancet**, v.2, p. 1211-1214, 1983.

HARLEY, J.B., GAITHER, K.K. Autoantibodies. **Clin. Rheum. Dis.**, v. 14, p. 43-56, 1988.

HARGRAVES M.M., RICHMOND H., MORTON R. Presentation of two bone marrow elements: The tart cell and the LE cell. **Proc. Staff. Meet. Mayo Clin.**, v.23, p.25, 1948.

HECHT, B., SIEGEL, N., ADLER, M., KASHGARIAN, M., HAYSLETT, J.P. Prognostic indices in lupus nephritis . **Medicine** (Baltimore), v. 55, p.163-181,1976.

HEFENEIDER, S.H., BENNETT, R.M. Nucleosomes and DNA bind to specific cell-surface molecules on murine cells and induce cytokine production. **Clin. Immunol. Immunopathol.**, v. 63(3), p.245-251,1992.

HEBERT, L.A., DILLON, J.J., MIDDENDORF, D.F., LEWIS, E.J., PETER, J.B. Relationship between appearance of urinary red blood cell/white blood cell casts and the onset of renal relapse in systemic lupus erythematosus. **Am. J. Kidney Dis.**,v.26, p.432-438,1995.

HOCHBERG, M.C. The history of lupus erythematosus. **Md.Med.J**, v.40, p.871-873,1991.

HOPKINSON, N. Epidemiology of systemic lupus erythematosus. **Annals of Rheumatic. Dis.**,v.51, p.1292-1294, 1992.

HUGHES, G.R.V. Trombosis, abortion, cerebral disease and lupus anticoagulant. **Brithis Med. J.**, v.287, p.1088-1089, 1983.

ISENBERG, D.A., SHOENFELD, Y., SCHWARTZ, R.S. Multiple serological reactions and their relationship to clinical activity in systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum.**, v.27, p.132-138, 1984.

IZUI, S., LAMBERT, P.H., MIESCHER, P.A. Failure to detect circulating DNA-Anti-DNA complexes by four radioimmunological methods in patients with systemic lupus erythematosus. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 30, p.384-392, 1977.

IZUI, S., MCCONAHEY, P.J., DIXON, F..J. Increasead spontaneous polyclonal activation of B lymphocytes in mice with spontaneous autoimmune disease. **J. Immunol.**, v. 121, p.2213-2219, 1978.

IZUI, S., KELLEY, V.E., MASUDA, K., YOSHIDA, H., ROTHS, J.B., MURPHY, E.D. Induction of various autoantibodies by mutant gene *lpr* in several strains of mice. **J. Immunol.**, v. 133, p.227-233, 1984.

JACOB, L., VIARD, J.D., ALLENET, B., ANIN, M.F., SLAMA, F.B.H., VANDERKERCKHOVE, J., PRIMO, J., MARKOVITS, J., JACOB, F., BACH, J.F., LE PECO, J.B., LOUVARD, D. A monoclonal anti-double-stranded DNA autoantibody binds to a 94-kDa cell-surface protein on various cells types via nucleosomes or a DNA-histone complex. **Proc.Natl.Acad.Sci.USA**, v.86, p.4669-4673, 1989.

JASKOWSKI, T.D., SCHRODER, C., MARTINS, T.B., MOURITSEN, C.L, LITWIN, C.M., HILL, H.R. Screening for antinuclear antibodies by enzyme immunoassay. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 105, p.468-473, 1996.

JOHNSON, A E., CAVALCANTI, F.S., GORDON, C., NIVED, O , PALMER, R.G., STURFELT, G., VINER, N.J., BACON, P.A Cross-Sectional analysis of the differences between patients with systemic lupus erythematosus in England, Brazil and Sweden. **Lupus**, v.3, p .501-506,1994.

JUBY, A .G., DAVIS, P. , McELHANEY, J.E., GRAVENSTEIN, S. Prevalence of selected autoantibodies in different elderly subpopulations. **Brithis J. Rheumatol.** , v. 33 , p.1121-1124, 1994.

KALUNIAN, K.C., PANOSIAN-SAHAKIAN, N., EBLING, F.M. Idiotypic characteristics of immonoglobulins associated with systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum.**, v. 32, p.513-522, 1989.

KALIYAPERUMAL, A., MOHAN, C., WU, W., DATTA, S. Nucleosoma peptide epitopes for nephritis-inducing T helper cells of murine lupus. **J. Exp. Med.**, v. 183, p.2459-2469,1996.

KAUFMAN, I.D., GOMEZ-REINO, J.J., HEINICKE, M. H., GOREVIC, P.D., Male lupus : Retrospective analysis of the clinical and laboratory features of 52 patients, with a review of the literature. **Semin. Arthritis Rheum.**, v.18, p.189-197, 1989.

KIMBERLY, R.P. Corticosteroids and anti-inflamatory drugs (review). **Rheum. Dis. North Am.**, v.14, p.203-221, 1988.

KITANI, A., HARA, M., HIROSE, T., HARIGAI, K., SUZUKI, M., KAWAKAMI, Y., KAWAGUCHI, T., HIDAKA, M., KAWAGOE, M., NAKAMURA, H. Autostimulatory effects of Il-6 on excessive B cell differentiation in patients with systemic lupus erythematosus: Analysis of interleukin-6 production and IL-6 expression. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 88, p.75-83, 1992.

KLEMPERER P., POLLACK AD., BAEHR G., Pathology of disseminated lupus erythematosus. **Arch. Pathol.**(Chicago), v.32, p.569, 1941.

KLINMAN, D.M., STEINBERG, A.D. Systemic autoimmune disease arise from polyclonal B cell activation. **J. Exp. Med.**, v. 165, p.1755-1760, 1987.

KLINMAN, D.M. Polyclonal B cell activation in lupus prone mice precedes and predicts the development of autoimmune disease. **J. Clin. Invest.**, v. 86, p.1249-1254, 1990.

KLINMAN, D.M., SHIRAI, A , CONOVER, J., STEINBERG, A D. Cross-reactivity of IgG anti-DNA secreting B cells in patients with systemic lupus erythematosus. **Eur.J.Immunol.**, v.24, p.53-58, 1994.

KOFFLER, D., AGNELLO ,V., THOBURN, R., KUNKEL, H.G. Systemic lupus erythematosus, prototype of immune complex nephritis in man. **J. Exp. Med.**, v. 134, p.169S-179S, 1971.

KOUTOUZOV, S., CABRESPINES, A., AMOURA, Z., CHABRE, H., LOTTON, C., BACH, JF. Binding of nucleosomes to a cell surface receptor: redistribution and endocytosis in the presence of lupus antibodies. **Eur. J. Immunol.**, v.26, p 472-486, 1996.

KRAMERS, C., HYLKEMA, M.N., ASSMAN, K.J.M.,SMEENK, R.J.T., BERDEN, J.H.M. Anti-nucleosome antibodies complexed to nucleosomal antigens show anti-DNA reactivity and bind to rat glomerular basement in vivo. **J. Clin. Invest.**, v. 94, p.568-577,1994.

KRIPPNER, H., SPRINGER, B., MERLE, S., PIRLET, K. Antibodies to histones of the IgG and IgM class in systemic lupus erythematosus. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 58, p.49-56, 1984.

LAFER, E.M., RAUCH, J., ANDRZEJEWSKY, C. JR., MUDD, D., FURIE, B., SCHWARTZ, R.S., SOTLLAR, D.B. Polyspecific monoclonal lupus autoantibodies reactive with both polynucleotides and phospholipids. **J. Exp. Med.**, v.153, p. 897-909, 1981.

LAWRENCE, R.C., HOCHBERG, M.C. , KELSEY, J.L. , McDUFFIE, E.C. , MEDSGER, T.A , FELTZ, W.R. , SHULMAN, L.E. Estimates of prevalence of selected arthritis and musculoskeletal diseases in the United States. **J. Rheumatol.**, v.14, p.427, 1989.

LEFKOWITH, J-B., KIEHL, M., RUBINSTEIN, J., DI VALERIO, R., BERNSTEIN, K.A., KAHL, L., RUBIN, R.L.,GOURLEY, M. Heterogeneity

and clinical significance of glomerular-binding antibodies in systemic lupus erythematosus. **J. Clin. Invest.**, v. 98, p.1373-1380, 1996.

LEON, A.S., GREEN, A., EHRLICH, G.E., POLAND, M., SHAPIRO, B. Avidity of antibodies in SLE. **Arthritis Rheum.**, v. 20, p.23-29, 1977.

LIANG, M.H., SOCHER, A.S., LARSON, M.G., SCHUR, P.H. Reliability and validity of six systems for the clinical assesment of disease activity in systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum.**,v.32, p.1107-1118, 1989.

LIBMAN, E . , SACKS, B. A hitherto undercribed form of volvular and mural endocardite. **Arch.Intern.Med.**, v.33, p. 701, 1924.

LIGHFOOT, R.W., REDECHA, P.B., LEVESANOS, N. Longitudinal studies of anti-DNA antibody levels in SLE. **Scand. J. Rheumatol.** , v.11, p. 52-58, 1975.

LI, J.Z., STEINMAN, C. R. Plasma DNA in systemic lupus erythematosus-characterization of cloned base sequences. **Arthritis Rheum.** , v.32, p.726-733, 1989.

LINKER-ISRAELI, M. Cytokine abnormalities in human lupus. **Clin. Immunol. Immunopathol.**, v. 63, p.10-12,1992.

LINKER-ISRAELI, M., PREHN, J., WALLACE, D.J., LI, L., KLINENBERG, J.R. Study of an IL-6 gene XBAI restriction fragment associated with systemic lupus erythematosus(SLE) : **Arthritis Rheum.**, v.36, S.111, 1994 (Abstract).

LLOYD, W., SCHUR, P.H. Immune complexes, complement, and anti-DNA in exacerbations of systemic lupus erythematosus. **Medicine** (Baltimore), v. 60, p.208-217,1981.

LOSMAN, M.J., FASY, T.M., NOVIK, K.E., MONESTIER, M. Monoclonal autoantibodies to subnucleosomes from MRL/Mp-+/+ mouse. Oligoclonality of the response and recognition of a determinant composed of histones H2A, H2B and DNA . **J. Immunol.**, v. 148, p.1561-69,1992.

LOSMAN, J.A., FASY, T.M., NOVICK, K.E., MASSA, M., MONESTIER, M. Nucleosome-specific antibody from na autoimmune MRL/Mp-lpr/lpr mouse. **Arthritis Rheum.**, v. 36, p.552-560, 1993.

MADAIO, M.P., HÓDER S., SCHWARTZ, R.S., SOTOLLAR, B.D. Responsiveness of autoimmune and normal mice to nucleic acid antigens **J. Immunol.**, v.132, p.872-876, 1984.

MADAIO, M.P., CARLSON, J., CATALDO, J. , UCCI, A., MIGLIORINI, P., PANKEWYCS, O. Murine monoclonal anti-DNA antibodies bind directly to glomerular antigens and form imune deposits. **J. Immunol.**, v. 138, p.2883-2889,1987.

MANOUSSAKIS, M.N., TZIOFAS, A . G., SILIS, M. P., PANGE, P.G.E., GOUDEVENOS, -J., MOUTSOPOULOS, H.M. High prevalence of anti-

cardiolipin and other autoantibodies in a healthy elderly population. **Clin. Exp. Immunol.**, v.69, p.557-565, 1987.

MANZI, S., RAIRIE, J.E., CARPENTER, A. B., KELLY, R.H., JAGARLAPUDI, S.P., SEREIKA, S.M., MEDSGER Jr, T.A., RAMSEY-GOLDMAN, R. Sensitivity and specificity of plasma and urine complement split products as indicators of lupus disease activity. **Arthritis Rheum.**, v.39, p.1178-1188, 1996.

MARRACK, P., HUGO, P., McCORMACKC, J., KAPPLER, J. Death and T cells. **Immunol. Ver.**, v.133, p.119-129, 1993.

MASSA, M., BENEDETTI, F., PIGNATTI, P., ALBANI, S., DI FUCCIA, G., MONESTIER, M., MARTINI, A. Anti-double stranded DNA, anti-histone, and anti-nucleosome IgG reactivities in children with systemic lupus erythematosus. **Clin. Exp. Rheumatol.**, v. 12, p.219-225, 1994.

McCOUBREY-HOYER, A., OKAMURA, T.B., HOLMAN, H.R. Partial purification and characterization of plasma DNA and its relation to disease activity in systemic lupus erythematosus. **Am. J. Med.**, v.77, p.23-34, 1984.

McGHEE, J., FELSENFELD, G. Nucleosome structure. **Ann.Ver. Biochem.**, v. 49, p.1115-1156, 1980.

MERINO, R., FOSSATI, L., LACOUR, M., IZUI, S. Selective autoantibody production by Yaa+ B cells in autoimmune Yaa+Yaa- bone marrow chimeric mice. **J. Exp. Med.**, v. 174, p.1023-1029,1991.

MILLER, T.E., LAHITA, R.G., ZARRO, V.J., MACWILIAM, J., KOFFLER, D. Clinical significance of anti-double-stranded DNA antibodies detected by a solid phase enzyme immunoassay. **Arthritis Rheum.**, v. 24, p. 602-610,1981.

MOHAN, C., ADAMS, S., STANIK, V., DATTA, S.K. Nucleosome : a major immunogen for pathogenic autoantibody-inducing T cells of lupus. **J. Exp. Med.**, v. 177, p.1367-1381, 1993.

MOHAN, C.,DATTA S.K. Lupus : Key pathogenic mecanisms and contributing factors. **Clin. Immunol.Immunopathol.**, v.77, p.209-220, 1995.

MONESTIER, M. , KOTZIN, B.L. Antibodies to histones in systemic lupus erythematosus and drug-induced lupus syndromes. **Rheumatic. Dis. Clin. North. Am.**, v 18, p.415-436, 1992.

MOORE J.E., LUTZ W.B. The natural history of systemic lupus erythematosus: An approach to its study through chronic biological false positive reactions. **J. Chron. Dis.**, v.2, p.297, 1955.

MOSMANN, T.R., COFFMAN, R.L. TH1 and TH2 cells: Different patterns of lymphokin secretion lead to different functional properties. **Annu. Ver. Immunol.**, v.7, p.147-173, 1989.

MOUTSOPOULOS, H.M., BEEHM-TRUITT, M., KASSAN, S.S., CHUSED, T.M. Demonstration of activation of B lymphocytes in NZB mice at birth by an

immunoradiometric assay for murine IgM. **J. Immunol.**, v. 119, p. 1639-1644,1977.

MOUNTZ, J.D., ZHOU, T., WU, J., WANG, W., SU, X., CHENG, J. Regulation of apoptosis in immune cells. **J. Clin. Immunol.**, v.15, p.1-16, 1995.

NAGAFUCHI, H., SUZUKI, N., MIZUSHIMA, Y., SAKANE, T. Constitutive expression of IL-6 receptors and their role in the excessive B cell function in patients with systemic lupus erythematosus. **J. Immunol.**, v. 151, p. 6525-6534, 1993.

NEMAZEE, D., GUIET, C., BUERKIK, MARSHAK-ROTHSTEIN,A. B lymphocytes from the autoimmune prone mouse strain MRL/lpr manifest an intrinsic defect in tetraparental MRL/lpr-DBA/2 chimeras. **J. Immunol.**,v. 147, p.2536-2539,1991.

NEUWELT, C.M., LACKS, S., KAYE, B.R., e al. Role of intravenous cyclophosphamide in the treatment of severe neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. **Am. J. Med.**, v. 98, p.32-41,1995.

NORTHWAY, J.D., TAN, E.M. Differentiation of anti-nuclear antibodies giving speckled staining patterns in immunofluorescence. **Clin Immunol. Immunopathol**, v.1, p.140-154, 1972.

OKAMURA, M., KANAYAMA, Y., AMASTU, K., NEGOR, N., KOHDA, S., TAKEDA, T., INOUE, T. Significance of enzyme linked immunosorbent assay

(ELISA) for antibodies to double stranded DNA in patients with lupus nephritis : correlation with severity of renal histology. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 52, p.14-20, 1993.

PANUSH, R.S., GREER, J.M., MORSHEDIAN, K.K. What is lupus ? What is not lupus (review) ? **Rheum. Dis. Clin. North Am.**, v.19, p.223-234, 1993.

PARK, M.H., D'AGATI, V., APPEL, G.B., PIRANI, C.L. Tubulointerstitial disease in lupus nephritis: Relationship to immune deposits, interstitial inflammation, glomerular changes, renal function, and prognosis. **Nephron**, v.44, p.309, 1986.

PASSAS, C.M., WONG, R.L., PETERSON, M. A comparison of the specificity of the 1971 and 1982 American Rheumatism Association criteria for the classification of systemic lupus erythematosus . **Arthritis Rheum.**,v.28, p.620-623, 1985.

PERKINS, D.L., GLASER, R.N., MAHON, C.A, MICHAELSO, J., MARSHAK-ROTHSTEIN, A: Evidence for an intrinsic B cells defect in lpr/lpr mice apparent in neonatal chimeras. **J. Immunol.**, v. 142, p.549-555, 1990.

PETRI, M., HELLMANN, D., HOCHBERG, M. Validity and reliability of the lupus activity measures in the routine clinic setting. **J. Rheumatol.**, v. 19, p.53-59, 1992.

PINCUS, T., SCHUR, P.H., ROSE, J.A. DECKER, J.L., TALA, N. Measurement of serum DNA-binding activity in systemic lupus erythematosus. **N. Engl. J. Med.**, v.281, p.701-705,1969.

PISETSKY, D.S. Anti-DNA antibodies in systemic lupus erythematosus. *Rheum. Dis. Clin. North Am.*,v. 18, p.437-454, 1992.

PORTANOVA, J.P., ARNDT, R.E., TAN, E.M. , KOTZIN, B.L. Anti-histone antibodies in idiopathic and drug induced lupus recognize distinct intrahistone regions. **J. Immunol.**, v. 138, p.446-51, 1987.

PORCEL, J.M., ORDI, J., CASTRO-SALOMO, A., VILARDELL, M., RODRIGO, M.J., GENE, T., WARBURTON, F., KRAUS, M., VERGATNI, D. The value of complement activation products in the assessment of systemic lupus erythematosus flares. **Clin. Immunol. Immunopathol.**, v.74, p.283-288, 1995.

REVEILLE, J.D., BARTOLUCCI, A , ALARCON, G.S. Prognosis in SLE. Negative impact of increasing age at onset, black race, and thrombocytopenia, as well as cause of death. **Arthritis Rheum.** , v.33, p.37-48, 1990.

ROBEY , F.A. C-reactive protein mediates the solubilization of nuclear DNA by complement in vitro. **J. Exp. Med.**, v.161, p.1344-1356 , 1985.

ROTHFIELD, N.F. Clinical features of systemic lupus erythematosus. In Kelley, W. N., Harris, E.D., Ruddy, S., Sledge, C.B. (eds.): **Textbook of Rheumatology**, Philadelphia , W.B. Saunders Company, 1981.

ROTHFIELD, N.F. Systemic lupus erythematosus: Clinical aspects and treatment. In *Arthritis and Allied Conditions: A Textbook of Rheumatology*. 11th Ed. Edited by D.J. MacCarty. Philadelphia, Lea & Febiger, p.1022-1048, 1989.

RUBIN, L.A . , UROWITZ, M. B. Scrinking lung syndrome in SLE - A clinical pathologic study. **J. Rheumatol.**, v.10, p.973-976, 1983.

RUBIN, R.L., MCNALLY, E.M., NUSINOW, S.R., ROBINSON, C.A ., TAN, E.M. IgG antibodies to the histone complex H2A-H2B characterize procainamide-induced lupus. **Clin. Immunol. Immunopathol.**,v. 36, p.49-59, 1985.

RUMORE, P.M., STEINMAN, C.R. Endogenous circulating DNA in systemic lupus erythematosus: occurrence as multimeric complexes bound to histones . **J. Clin. Invest.**, v. 86, p. 471-477, 1990.

SABBAGA, J., PERES LINE, S.R., POTOENJAK, P., MADAIO, M.P. A murine nephritogenic monoclonal anti-DNA autoantibody binds directly to mouse laminin, the major non-collagenous protein component of the glomerular basement membrane. **Eur. J. Immunol.**, v. 19, p.137-143, 1989.

SANCHEZ-GUERRERO, J., LEW, R.A ., FOSSEL, A .H., SCHUR, P.H. Utility of anti-Sm , Anti-RNP, Anti-Ro/SS-A, and Anti-La/SS-B(extractable nuclear antigens) detected by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the diagnosis of systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum.**, v. 39, p.1055-1061,1996.

SAKANE, T., SUZUKI, N., TAKADA, S., UEDA, Y., MURAKAWA, Y., TSUCHIDA, T., YAMAUCHI, Y., KISHIMOTO, T. Bel cell hyperactivity and its relation to distinct features and the degree of disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum.**, v. 31(1), p. 80-87, 1988.

SAVIL, J., FADOK, V. , HENSON, P., HASLETT, C. Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. **Immunol. Today**, v.14, p.131-136, 1993.

SCHALLER, J. Lupus in childhood. **Clin. Rheumatol.Dis.**,v.8, p. 219-228, 1982.

SCHMIEDEKE, T.M.J., STOCKL, F.W., WEBER, R., SUGISAKI, Y.,BATSFORD, S.R., VOGT, A . Histones have high affinity for the glomerular basement membrane: relevance for immune complex formation in lupus nephritis. **J. Exp. Med.**, v. 169, p.1879-1894, 1989

SCHWARTZ, L., OSBORNE, B. Programmed cell death, apoptosis and killer genes. **Immunol Today**, v. 14, p.582-590,1993.

SCHWARTZ, R.S., STOLLAR, B.D. Origins of anti-DNA autoantibodies . **J. Clin. Invest.**, v. 75, p. 321-327, 1985.

SCHUR. P.H., SANDSON, J. Immunologic factors and clinical activity in systemic lupus erythematosus. **N. Engl. J. Med.**, v. 278, 533-538, 1968.

SCHUR, P.H., MEYER, I., GAROVOY, M. Associations between systemic lupus erythematosus and the major histocompatibility complex: Clinical and immunological considerations. **Clin. Immunol. Immunopathol.**, v. 24, p.263-275, 1982.

SCHUR, P.H., MARCUS-BAGLEY, D., AWDEH, Z., YUNIS, E.J, ALPER, C.A . The effect of ethnicity on major histocompatibility complex complement allotypes and extended haplotypes in patients with systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum.**, v. 33, p.985-992, 1990.

SENECAL, J.L. , OLIVER, J. M., ROTHFIELD, N. Anticytoskeletal autoantibodies in the connective tissue diseases. **Arthritis Rheum.** , v.28, p.889-898, 1985.

SHOENFELD, Y., SŁOŃ, H., SHAFRIR, S., KRAUSE, I., GRANADOS, J., VILLAREAL, G., ALARCÓN-SEGOVIA, D. Diversity and pattern of inheritance of autoantibodies in families with multiple cases of systemic lupus erythematosus. **Annals Rheum. Dis.**, v. 51, p.611-618, 1992.

SIEGEL, M. SEELLENFREUND, M. Racial and social factors in systemic lupus erythematosus. **JAMA** , v. 191, p.77-80, 1965.

SIERGERT, C., DAHA, M., WESTEDT, M., van der VOORT, E., BREEDVELD, F. IgG autoantibodies against C1q are correlated with nephritis , hypocomplementemia and dsDNA antibodies in systemic lupus erythematosus. **J. Rheumatol.**,v. 18, p.230-234, 1991

SINGER, G.G. , CARRERA, A .C., MARSHAK-ROTHSTEIN, A ., MARTINEZ, C., ABBAS, A .K. Apoptosis, Fas and systemic autoimmunity: the MRL lpr/lpr model. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 6, p.913-920, 1994.

SMEENK, R. , van der LELIJ, G., AARDEN, L. ·Avidity of antibodies to dsDNA: comparasion of IFT on Crithidia lucilliae, Farr assay and PEG assay. **J. Immunol.**, v.128, p.73-78, 1981.

SOBEL, E.S., KATAGIRI, T., KATAGIRI, K., MORRIS, S.C., COHEN, P.L., EISENBERG, R.A . An intrinsec B cell defects is required for the production of autoantibodies in lpr model of murine systemic autoimmunity. **J. Exp. Med.**, v. 173, p.1441-1449,1991.

SONTHEIMER, R.D., 'GILLIAM. J.N. DNA antibody class, subclass and complement fixation in systemic lupus erythematosus with and without nephritis. **Clin. Immunol. Immunopathol.** , v.10, p.495-497, 1978.

SPRONK, P.E., TER BORG, E.J., LIMBURG, P.C., KALLENBERG, C.G.M. Plasma concentration of interleukin-6 in systemic lupus erythematosus: An indicator of disease activity? **Clin. Exp. Immunol.**,v. 90, p.106-110,1992.

SPRONK, P.E., LIMBURG, P.C., KALLENBERG, C.G. Serological markers of disease activity in systemic lupus erythematosus. **Lupus**, v. 4, p.86-94, 1995.

STAFFORD-BRADY, F.J. , UROWITZ, M.B. , GLADMAN, D.D. ,
EASTERBROOK, M. Lupus retinopathy: Patterns, association, and prognosis.
Arthritis Rheum. V.31, p.1105-1109, 1988.

STRAATON, K.V., CHATAHAM, W.W., REVELLE, J.D., KOOPMAN, W.J.,
SMITH, S.H. Clinically significant valvular heart disease in systemic lupus
erythematosus. **Am. J. Med.**, v.85, p.645-650, 1988.

SUENAGA, R.,ABDOU, N. Anti-(DNA-Histone) antibodies in active lupus
nephritis. **J. Rheumatol.**, v. 23, p.279-285, 1996.

SULLIVAN, K.E., WISNIESKI, J.J., WINKELSTEIN, J. A., LOUIE, J., SACHS,
E., CHOI, R., VERKSLER, E., GOLDMAN, D., PETRI, M. Serum complement
determinations in patients with quiescent systemic lupus erythematosus. **J.**
Rheumatol., v. 23, p.2063-2067, 1996.

SUZUKI, N., HARADA, T., MIZUSHIMA, Y.,SAKANE, T. Possible pathogenic
role of cationic anti-Dna autoantibodies in the development of nephritis in patients
with systemic lupus erythematosus. **J. Immunol.**, v. 115, p.1128-1136,1993.

SWAAK, A.J., AARDEN, L.A, STATIUS VAN EPS, L.W., FELTKAMP,
T.E.W. Anti-dsDNA and complement profiles as prognostic guides in SLE.
Arthritis Rheum., v.22, p.226-235, 1979.

SWAAK, A .J., GROENWOLD, J., AARDEN, L.A ., STATIUS VAN EPS L.W., FELTKAMP, T.E.W. Prognosis value of anti-dsDNA in SLE. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 41, p.388-395,1982.

SWAAK,A.J., GROENWOLD, J., BRONSVELD, W. Predictive value of complement profiles and anti-dsDNA in systemic lupus erythematosus. **Ann. Rheum. Dis.**, v.45, p.359-366, 1986.

TAN E.M., KUNKEL H.G. Characteristics of a soluble nuclear antigen precipitin with sera of patients with systemic lupus erythematosus. **J. Immunol.**, v.96 , p.464-471 , 1966.

TAN, E.M., NATALI, P.G. Comparative study of antibodies to nature and denatured DNA. **J. Immunol.**, v. 104, p.902-906,1970.

TAN, E.M., COHEN, A .S., FRIES, J.F., MASI, A .T., MACSHANE, D.J., ROTHFIELD, N.F., SCHALLER, J.G., TALAL, N., WINCHESTER, R.J. The 1982 revised criteria of classification of systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum.**, v. 25, p.1271-1277, 1982.

TAN, E.M., Antinuclear antibodies: Diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for all biology. **Adv. Immunol.**, v. 44 , p.93-151, 1989.

TAX, W.J.M., KRAMERS, C., VAN BRUGGEN, M.C.J., BERDEN, J.H.M. Apoptosis, nucleosomes , and SLE nephritis. **Kidney Int.**, v. 48, p.666-673, 1995.

TERMAAT, R.M., BRINKMAN, K., VAN GOMPEL, F., VAN DE HEUVEL, L.P.W.J., VEERKAMP, J.H., SMEENK, R.J.T., BERDEN, J.H.M. Crossreactivity of monoclonal anti-DNA antibodies with heparan sulfate is mediated via bound DNA/histones complexes. **J. Autoimmun.**, v.3, p. 531-545,1990.

TERMAAT, R.M., ASSMANN, H.J.M., van SON, J.P.H.F., DIJKMAN, H.B.P.M., KOENE, R.A .P., BERDEN, J.H.M. Antigens-specificity of antibodies bound to glomeruli of mice with systemic lupus erythematosus-like syndromes. **Lab. Invest.**,v.68, p.164-173, 1993.

ter BORG, E.J., HORST, G., HUMMEL, E.J., LIMBURG, P.C., KALLENBERG, C.G.M. Measurement of increase in anti-double stranded DNA antibody levels as a predictor of disease exacerbation in systemic lupus erythematosus: a long-term, prospective study . **Arthritis Rheum.**, v. 33 , p.634-643, 1990 a.

ter BORG, E.J., HORST, G., LIMBURG, P.C., KALLENBERG,C.G.M. Changes in plasma levels of interleukin-2 receptor in relation to disease exacerbations and levels of anti-dsDNA and complement in systemic lupus erythematosus. **Clin.Exp.Immunol.**, v.82, p.21-26,1990 b.

THOMAS, J.O ., ILSON, C.M., HARDIN, J. A . The major core histone antigenic determinants in systemic lupus erythematosus are in the trypsin-sensitive regions. **FEBS(Fed. Eur. Bioch. Soc.)Lett.**, v. 169, p.90-96, 1984.

TOMER, Y., BUSKILA, D., SHOENFELD, Y. Pathogenic significance and diagnostic value of lupus autoantibodies. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, v. 100, p.293-306, 1993.

UROWITZ, M.B., GLADMAN, D.D., TOGNAN, E.C.S., GOLDSMITZ, C.H. Lupus activity criteria count (LACC). **J. Rheumatol.**, v. 11, p.783-7, 1984.

Van BRUGGEN, M.C.J. , KRAMERS, C. , HYLKEMA, M.N., SMEENK, R.J.T., BERDEN, J.H.M. Pathophysiology of lupus nephritis: the role of nucleosomes. **Neth. J. Med.**, v. 45, p.273-279, 1994.

Van BRUGGEN, M.C.J., KRAMERS, C.,BERDEN, J.H.M. Autoimmunity against nucleosomes and lupus nephritis. **Ann. Med. Interne**, v. 147 (7), p.485-489, 1996.

Van BRUGGEN, M.C.J., KRAMERS, C., WALGREEN, B., ELEMA, J.D., KALLENBERG, C.G.M., van DEN BORN, J., SMEENK, R.J.T., ASMANN, K.J.M., MULLER, S., MONESTIER, M., BEREDN, J.H.M. Nucleosomes and histones are present in glomerular deposits in human lupus nephriis. **Nephrol. Dial. Transplant.**, v. 12, p.57-66, 1997.

Von MÜHLEN, C.A . , TAN, E.M. Autoantiboides in the diagnosis of systemic rheumatic diseases. **Sem. Arthr. Rheum.**, v. 24, p.323-358, 1995.

WARD, M.M., POËISSON, R.P. A meta-analysis of the clinical manifestations of older onset SLE. **Arthritis Rheum.**, v.32, p.1226, 1989.

WALLACE, D.J., DUBOIS, E.L. Definition, classification, and epidemiology of systemic lupus erythematosus. In Wallace, D.J. and Dubois, E.L.(eds.): **Lupus Erythematosus**. 3rd ed. Philadelphia, Lea and Fegiber, 1987.

WATANABE-FUKUNAGA, R., BRANNAN, C.I., COPELAND, N.G., JEKINS, N.A., NAGATE, S. Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. **Nature**, v.356, p.314-317,1992.

WALZ LeBLANC, B.A .E., GLADMAN, D.D., UROWITZ, M.B. Serologically active clinical quiescent systemic lupus erythematosus: predictors of clinical flares. **J.Rheumatol.**, v. 21, p.2239-2241, 1994.

WINFIELD, J.B., FAIFERMAN, I., KOFFLER, D. Avidity of anti-DNA antibodies in serum and IgG glomerular eluates from patients with systemic lupus erythematosus. **J. Clin. Invest.**, v. 59, p.90-96,1977.

WU, J., ZHOU, T., ZHANG, J., HE, J., GAUSE, W.C., MOUNTZ, J.D. Correction of accelerated autoimmune disease by early replacement of the mutated *lpr* gene with the normal Fas apoptosis gene in the T cells of transgenic MRL-*lpr/lpr* mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.91, p.2344-2348, 1994.

YASUMA, M., TAKASAKI, Y., MATSUMOTO, K. Clinical significance of IgG anti-Sm-specific antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. **J. Rheumatol.**, v.17, p.469-475, 1990.

YOSHIDA, H., KOHNO, A ., OHTA, K., HIROSE, S., MARUYAMA, N., SHIRAI, T. Genetic studies of autoimmunity in New Zealand mice. III. Associations among anti-DNA antibodies, NTA , and renal disease in (NZB x NZW) F1 X NZW backcross mice. **J. Immunol.**, v. 127, p.433-437,1981.

YU, D., RUMORE, P.M., LIU, Q., STEINMAN; C.R. Soluble oligonucleosomal complexes in synovial fluid from inflamed joints. **Arthritis Rheum.**, v.40, p648-654, 1997.