

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde
Área de Concentração em Clínica Médica
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ISOTIPOS IgG E IgM ANTI-dsDNA EM PACIENTES COM
LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO

BRIELE KEISERMAN

PORTO ALEGRE
2012

FACULDADE DE MEDICINA

AUTORA: BRIELE KEISERMAN

ISOTIPOS IgG E IgM ANTI-dsDNA EM PACIENTES
COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO

Dissertação apresentada à Pontifícia Universidade
Católica do Rio Grande do Sul para obtenção do
título de Mestre em Medicina e Ciências da
Saúde – Área de Concentração: Clínica Médica.

ORIENTADOR: PROF. DR. HENRIQUE LUIZ STAUB

PORTO ALEGRE

2012

FICHA CATALOGRÁFICA

K27i Keiserman, Briele
 Isotipos IgG e IgM anti-DSDNA em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico / Briele Keiserman. - Porto Alegre : PUCRS, 2012.

91 f. : il. tab. Inclui um artigo científico para submissão à publicação.

Orientador: Prof. Dr. Henrique Luiz Staub.

Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Mestrado em Medicina e Ciências da Saúde. Área de Concentração: Clínica Médica.

1. LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO. 2. NEFRITE LÚPICA.
3. IMUNOGLOBULINA G. 4. IMUNOGLOBULINA M. 5. ANTICORPOS.
6. ESTUDOS TRANSVERSAIS. I. Staub, Henrique Luiz. II. Título.

C.D.D. 616.77
C.D.U. 616.51(043.3)
N.L.M. WD380

Ao meu marido Odirlei, que está sempre ao meu lado,
apoiando e incentivando meus ideais.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todas aquelas pessoas especiais que muito me ajudaram nessa importante conquista profissional.

Inicialmente agradeço à minha querida família, em especial ao meu marido Odirlei, pelo amor, companheirismo e paciência. Aos meus pais, Edison e Aidê, pela educação, amor, incentivo e exemplo que sempre me deram. À minha irmã Daiana, ao meu cunhado Eduardo e à minha afilhada Rafaela por todo o carinho e compreensão pelos momentos em que não pude estar presente. Ao meu avô Leôncio, que mesmo ausente sempre participa da minha vida.

Ao Dr. Henrique, meu orientador, pela paciência e ajuda incondicional durante todas as fases desse trabalho.

A todos os colegas da pesquisa clínica e do Serviço de Reumatologia do Hospital São Lucas, especialmente à Desiree e à Soili, que estiveram sempre disponíveis para me ajudar.

Aos residentes Caroline, Aline, Fábio, Cristina, Deonilson e Melissa que muito contribuíram nesse trabalho. Aos preceptores do Serviço de Reumatologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, especialmente ao tio Mauro pelo carinho e incentivo à pesquisa.

À acadêmica Maria Rita Ronchetti, pela ajuda constante no recrutamento dos pacientes.

À equipe do Laboratório Metanalysis de Porto Alegre, pelo auxílio na realização dos testes sorológicos.

Ao CNPq, pela bolsa de incentivo à pesquisa.

Enfim, a todas as pessoas que não foram citadas aqui, mas que de alguma maneira contribuíram para a realização desse trabalho, muito obrigada.

RESUMO

Anticorpos IgG anti-dsDNA se associam à ocorrência de nefrite lúpica. Relatos recentes sugerem que o isotipo IgM anti-dsDNA seja nefroprotetor. Avaliamos frequência de IgG anti-dsDNA em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES), e averiguamos a relação entre proporção IgG/IgM anti-dsDNA e manifestações clínicas da doença. O estudo, transversal, incluiu 137 pacientes com LES de acordo com os critérios tradicionais (92,5% mulheres, 79,5% raça branca) e uma população de 58 casos de LES (93,1% mulheres, 81% raça branca) selecionados por positividade para IgG anti-dsDNA. Anticorpos IgG e IgM anti-dsDNA foram detectados por imunofluorescência indireta com *Crithidia luciliae*, com ponto de corte na diluição 1/10. A presença de IgG anti-dsDNA se associou à presença de anemia hemolítica, leucolinfopenia e depleção de Complemento ($p < 0,001$). Dos 58 pacientes com teste positivo para IgG anti-dsDNA, 15 foram também positivos para o isotipo IgM. O grupo com ambos os isotipos teve frequência significativamente menor de sedimento urinário ativo quando comparado ao grupo com IgG anti-dsDNA isolado (6,7% versus 34,9%, $p = 0,046$). A distribuição da proporção IgG/IgM anti-dsDNA evidenciou tendência de medianas mais elevadas na presença de artrite e leucolinfopenia [4 (2-8) versus 1 (1-2), $p = 0,070$ e 4 (3-8) versus 1 (1-4), $p = 0,066$, respectivamente]. Em suma, a frequência de IgG anti-dsDNA foi relevante em nossa casuística. A subpopulação positiva para ambos IgG e IgM anti-dsDNA foi menos propensa a alterações de sedimento urinário do que aquela com IgG anti-dsDNA isolado. Estes dados sugerem um comportamento biológico distinto para o isotipo IgM anti-dsDNA.

Palavras-chave

Lúpus eritematoso sistêmico, nefrite lúpica, anticorpos anti-dsDNA, isotipos IgG e IgM anti-dsDNA.

ABSTRACT

IgG anti-dsDNA antibodies are associated to lupus nephritis. Recent data suggest that IgM isotype is nephroprotector. We evaluated the frequency of IgG anti-dsDNA in patients with Systemic lupus erythemathosus (SLE) and its relation between IgG/IgM proportion and clinical manifestations of the disease. This transversal study included 137 SLE patients according to traditional criteria (92.5% female, 79.5% Caucasian) and 58 SLE individual (93.1% female, 81% Caucasian) selected by positivity for IgG anti-dsDNA. IgG and IgM anti-dsDNA antibodies were detected by *Chrithidia luciliae* indirect immunofluorescence with cut point 1/10 dilution. The presence of IgG anti-dsDNA was associated to the presence of hemolytic anemia, leukopenia/lymphopenia and Complement depletion ($p < 0.001$). Of the 58 patients positive for IgG anti-dsDNA 15 were also positive for IgM anti-dsDNA. The group presenting both isotypes showed significant less frequency of active urinary sediment when compared to isolated IgG anti-dsDNA (6.7% versus 34.9%, $p = 0.046$). IgG/IgM proportion distribution evidenced a trend of higher medians in the presence of arthritis and leukopenia/lymphopenia [4 (2-8) versus 1 (1-2), $p = 0.070$ and 4 (3-8) versus 1 (1-4), $p = 0.066$, respectively]. Summarizing, the frequency of IG anti-dsDNA was relevant in our casuistic. Positive subpopulation for both IgG/IgM isotypes anti-dsDNA was less willing to urinary sediment alterations than IgG anti-dsDNA isolated population. These data suggest a distinct biologic behavior for IgM anti-dsDNA.

Keywords: Systemic lupus erythemathosus, lupus nephritis, anti-dsDNA antibodies, IgG/IgM isotypes anti-dsDNA.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	9
1 INTRODUÇÃO	10
1.1 Definição de Lúpus Eritematoso Sistêmico	10
1.2 Epidemiologia do Lúpus Eritematoso Sistêmico	11
1.3 Etiologia e patogênese do Lúpus Eritematoso Sistêmico	13
1.4 Manifestações clínicas	14
1.5 Nefrite Lúpica	16
1.6 Anticorpos Anti-DNA	17
1.7 Associação entre nefrite lúpica e anticorpos anti-dsDNA	19
2 OBJETIVO.....	20
3 HIPÓTESE OPERACIONAL.....	20
4 HIPÓTESE CONCEITUAL	20
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	21
6 ARTIGO EM PORTUGUÊS	29
7 ARTIGO EM INGLÊS	49
8 ARTIGO SUBMETIDO	68
9 ANEXOS	85
9.1 Anexo I - Critérios de Classificação do Lúpus Eritematoso Sistêmico	85
9.2 Anexo II - Protocolo de acompanhamento do ambulatório de LES - PUCRS	87
9.3 Anexo III - Protocolo de avaliação de atividade de doença - SLEDAI	89
9.4 Anexo IV - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	90

LISTA DE ABREVIATURAS

aCL - Anticorpos anticardiolipinas

ACR - *American College of Rheumatology*

AL - Anticoagulante lúpico

Anti-dsDNA - anti-*double stranded DNA* (anti-DNA de dupla hélice)

Anti-ssDNA - Anti-*single stranded DNA* (anti-DNA de hélice simples)

BILAG - *British Isles Lupus Assessment Group*

CLIF - *Chrithidia luciliae immunofluorescence*

DNA - Ácido desoxirribonucléico

ELISA - *Enzyme-linked immunosorbent assay*

IPC - Índice Proteinúria/Creatinúria de amostra

LES - Lúpus eritematoso sistêmico

PCR - Proteína C reativa

PUCRS - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

RNA - Ácido ribonucléico

SLAM - *Systemic Lupus Activity Measure*

SLEDAI - *Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index*

SLICC/ACR - *Systemic Lupus International Collaborating Clinics/ American College of Rheumatology*

SPSS - *Statistical package for the social sciences*

VHS - Velocidade de hemossedimentação

TLR - *Toll-like receptors*

VDRL - *Venereal disease research laboratory test*

1 INTRODUÇÃO

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença crônica que, apesar da baixa incidência e prevalência, apresenta grande morbidade e mortalidade, principalmente nos pacientes que apresentam acometimento renal e do sistema nervoso central. Neste contexto, é importante dispormos de marcadores sorológicos que nos permitam a identificação precoce da doença e de potenciais riscos para complicações graves. Além disso, tais marcadores poderiam orientar a terapia medicamentosa adequada, antes mesmo das alterações clínicas e laboratoriais surgirem, como no caso da nefrite lúpica, onde a positividade do anti-dsDNA pode preceder as alterações do sedimento urinário e da função renal. Desta forma, conhecer melhor o papel dos isotipos IgG e IgM do anticorpo anti-dsDNA no LES pode trazer grande benefício aos pacientes.

Dados recentes da literatura evidenciam a associação entre a relação IgG/IgM do anticorpo anti-dsDNA com acometimento renal nos pacientes com LES. A importância destes anticorpos na avaliação de atividade e diagnóstico da nefrite lúpica, entretanto, depende de vários aspectos relacionados à etnia, quantidade de anticorpos, isotipo, especificidade e afinidade. Diante disso, é relevante o fato de estudarmos diferentes populações. Dispondo de evidências do alto grau de miscigenação genética da população brasileira, há necessidade de melhor conhecimento do papel dos isotipos IgG e IgM do anti-dsDNA em pacientes com LES no nosso meio.

1.1 Definição de Lúpus Eritematoso Sistêmico

O LES é uma doença inflamatória crônica autoimune com envolvimento de múltiplos órgãos e sistemas. Caracteriza-se pela produção de anticorpos auto-reativos dirigidos especialmente contra antígenos nucleares e formação de imunocomplexos, os quais se depositam, levando à intensa inflamação sistêmica e dano a múltiplos órgãos. Sua etiologia ainda é pouco conhecida, porém sabe-se da importante participação de fatores genéticos e ambientais para o desencadeamento da doença. A evolução da doença costuma ser crônica, com períodos de

exacerbação e remissão. Suas manifestações clínicas podem cursar com artrite, serosite, nefrite, vasculite, miosite, manifestações mucocutâneas, hemocitopenias imunológicas, diversos quadros neuropsiquiátricos, hiperatividade reticuloendotelial e pneumonite, entre outros. Diante disso, convencionou-se realizar seu diagnóstico através da associação de achados clínicos e laboratoriais, conforme os critérios de classificação propostos pelo Colégio Americano de Reumatologia (ACR - *American College of Rheumatology*) em 1982 e revisados em 1997, detalhados no anexo I [1-3].

1.2 Epidemiologia do Lúpus Eritematoso Sistêmico

A incidência do LES é de aproximadamente 1 a 22 casos para cada 100000 pessoas por ano em diferentes locais do mundo e a prevalência pode variar de 7 a 160 casos para cada 100000 pessoas [4-7]. Estudos epidemiológicos de pacientes lúpicos são complexos devido a sua baixa frequência na população, à diversidade das apresentações clínicas da doença e pela definição do diagnóstico depender de critérios de classificação. A prevalência do LES na população norte-americana é de aproximadamente 40-50 casos para cada 100000 pessoas [4]. Estimativas de incidência norte-americana variam cerca de 2 a 8 casos para cada 100000 pessoas por ano, sendo que nos últimos 40 anos, provavelmente devido à detecção mais precoce da doença, houve um aumento da incidência de até três vezes [5-7]. No Brasil, estima-se uma incidência de LES em torno de 8,7 casos para cada 100000 pessoas por ano, sendo que em homens é de 2,2 casos para cada 100000 pessoas por ano e em mulheres esta estimativa é de 14 casos para cada 100000 pessoas por ano [8].

O LES é mais comum nas mulheres, numa proporção de aproximadamente 9:1, principalmente na idade reprodutiva. Em crianças, essa razão é de 3:1; em adultos jovens chega a 15:1 e nos indivíduos de mais idade, novamente tende a ser menor, em torno de 8:1. Este fato é devido a fatores hormonais [9]. Nos Estados Unidos, mulheres afrodescendentes apresentam maior prevalência de LES [10]. A incidência de LES ajustada para sexo e raça para cada 100000 pessoas

por ano é cerca de 0,4 para homens eurodescendentes, 3,5 para mulheres eurodescendentes, 0,7 para homens afrodescendentes e 9,2 para mulheres afrodescendentes [11]. O surgimento da doença ocorre geralmente entre 16 -55 anos em 65% dos casos, abaixo dos 16 anos em 20% e acima dos 55 anos em 15% dos casos [12, 13].

A sobrevida dos pacientes com LES tem melhorado muito nos últimos anos. Na década de 50, a sobrevida média em cinco anos era de somente 50%, enquanto na última década, a sobrevida média em dez anos alcançou 80 a 90% [14-19]. Vários fatores contribuíram para isso, principalmente o melhor entendimento da fisiopatologia da doença e as melhores condições de tratamento, com otimização do uso de glicocorticóides e drogas imunossupressoras, antibioticoterapia, suporte dialítico, transplante renal e melhor manejo dos fatores de risco cardiovasculares [14, 17, 20, 21]. Entretanto, a mortalidade continua sendo de três a cinco vezes maior em relação à população geral [22]. O prognóstico da doença tende a ser menos favorável em afrodescendentes, quando comparado com eurodescendentes, assim como em populações com baixo nível socioeconômico e em crianças [12, 23, 24]. Outros fatores de mau prognóstico são nefrite, cerebrite e plaquetopenia. Em crianças, a doença costuma ser mais grave, havendo maior incidência de manifestações cutâneas, glomerulonefrite, pericardite, hepatoesplenomegalia e alterações hematológicas [12, 25]. Nos homens, o diagnóstico é mais tardio e a mortalidade dentro do primeiro ano da doença é maior [26], havendo maior incidência de nefrite, manifestações cutâneas, citopenias, serosites, envolvimento neurológico, trombozes, doença cardiovascular e hipertensão, quando comparados com as mulheres [27]. Nos idosos, o surgimento e a evolução da doença assemelham-se ao lúpus induzido por drogas, com maior prevalência de síndrome sicca, serosite, envolvimento pulmonar e manifestações musculoesqueléticas. Há menor frequência de acometimento neurológico e renal, mesmo assim, ocorre diminuição da sobrevida [28, 29].

A mortalidade no LES segue um padrão bimodal [30]. Deve-se primariamente à atividade da doença, especialmente quando há nefrite e acometimento do sistema nervoso central e ao maior risco de infecções graves decorrentes da imunossupressão. Dados de um estudo brasileiro

mostraram que até 58% das mortes em pacientes com LES resultaram de infecções [31]. Tardiamente, resulta de complicações do próprio LES e do tratamento, sendo a doença cardiovascular um dos mais importantes fatores de morbidade e mortalidade nestes pacientes [18, 20, 21, 32, 33].

1.3 Etiologia e patogênese do Lúpus Eritematoso Sistêmico

A etiologia do LES ainda é pouco conhecida, mas possivelmente é multifatorial, envolvendo fatores imunológicos, hormonais, genéticos e ambientais. A participação de agentes infecciosos, algumas medicações, a radiação solar e hormônios, atuando em um indivíduo geneticamente predisposto, proporcionam o reconhecimento anormal de autoantígenos pelo sistema imune e a perda da tolerância imunológica, que está associada à falha nos mecanismos supressores e de imunorregulação, com subsequente ativação policlonal de linfócitos B e produção de autoanticorpos. Assim, ocorre ativação da imunidade inata e adaptativa. Em relação à imunidade inata, é importante salientar o papel da interação dos receptores toll like (TLR – toll-like receptors) 7 e 9 com autoantígenos derivados de ácido ribonucléico (RNA) e desoxirribonucléico (DNA), respectivamente, provenientes de células apoptóticas. Da imunidade adaptativa, destaca-se a participação de células B e T ativadas a partir da interação com estes autoantígenos. A formação e deposição de imunocomplexos com a ativação do sistema complemento e consequente processo inflamatório, desencadeiam lesão tecidual. Um exemplo disso é o acometimento renal nos pacientes com glomerulonefrite lúpica, onde o depósito de imunocomplexos, tanto na zona subendotelial quanto na subepitelial do glomérulo, podem promover lesão glomerular. Autoanticorpos dirigidos contra membranas celulares contribuem para as citopenias (anemia hemolítica, leucopenia, linfopenia e trombocitopenia), além de outras manifestações detectadas na doença, como o envolvimento do sistema nervoso central. Autoanticorpos dirigidos contra o complexo fosfolípide-beta-2-glicoproteína I são responsáveis por eventos tromboembólicos venosos e arteriais. O dano celular promovido por autoanticorpos e ativação do complemento resultando em inflamação crônica

predispõe ao surgimento de novos autoantígenos, que mantém o estímulo da resposta imunológica, levando a uma perpetuação da autoimunidade.

1.4 Manifestações clínicas

A fadiga é uma das queixas mais prevalentes do LES em atividade. A febre, geralmente moderada, é encontrada na maioria dos pacientes no momento do diagnóstico. Mialgias, perda de peso e linfadenopatia reacional periférica podem ser comumente encontradas nos pacientes com LES [15].

O envolvimento articular é a manifestação mais encontrada, depois dos sintomas constitucionais, sendo detectado em até 95% dos pacientes. Necrose asséptica de múltiplas articulações, principalmente da cabeça do fêmur, pode ocorrer, particularmente naqueles pacientes em uso de glicocorticóide em dose elevada por longos períodos [34]. Perda de massa óssea com aumento do risco de osteoporose e fraturas geralmente está associada com uso crônico de glicocorticóide e deficiência de vitamina D pela baixa exposição solar [35, 36].

As lesões de pele são comuns e podem ter diferentes formas de apresentação. A maioria dos pacientes tem fotossensibilidade após exposição à radiação solar ou artificial (lâmpadas fluorescentes), caracterizada por eritema nas áreas expostas, ocorrendo em 60 a 80% dos casos. A clássica lesão em asa de borboleta é identificada por eritema malar e no dorso do nariz, preservando o sulco nasolabial, e aparece em menos de 50% dos casos. As úlceras orais e nasais, em geral indolores, são achados comuns. As lesões do lúpus discóide manifestam-se por placas eritematosas cobertas por uma escama aderente, envolvendo comumente o couro cabeludo, as orelhas, a face e o pescoço. Inicialmente, essas lesões são hiperpigmentadas e evoluem com uma área central atrófica, com ausência de pelos. No lúpus cutâneo subagudo, as lesões são simétricas, superficiais, não-cicatriciais, localizadas em áreas fotoexpostas. Essas lesões iniciam como pequenas pápulas eritematosas, progredindo para lesões anulares policíclicas ou papuloescamosas (psoriasiformes). Esta forma de apresentação costuma cursar com a presença do anticorpo anti-Ro/SSA. O fenômeno

de Raynaud está presente em cerca de 16% a 40% dos pacientes e geralmente sua presença está associada com estresse emocional ou frio [15]. A alopecia é um achado frequente, geralmente difusa ou frontal, constituindo-se em um bom marcador de agudização do LES.

A pericardite é a manifestação cardíaca mais comum do LES, podendo ser clínica ou subclínica, e ocorre em até 55% dos pacientes [37]. O derrame pericárdico geralmente é pequeno e detectável apenas por ecocardiograma, raramente evoluindo para tamponamento cardíaco ou pericardite constrictiva. A miocardite está frequentemente associada à pericardite, ocorrendo em cerca de 25% dos casos. Acometimento valvar é frequentemente detectado pelo ecocardiograma, sendo o espessamento valvar a alteração mais encontrada. A endocardite de Libman-Sacks caracteriza-se por lesões verrucosas, especialmente localizadas nas valvas aórtica e mitral, sendo descritas em até 43% dos pacientes [38]. Geralmente apresenta um curso clínico silencioso, podendo em raros casos, evoluir com eventos tromboembólicos e endocardite infecciosa. Episódios tromboembólicos também podem estar associados à presença de anticorpos antifosfolípidos e ao uso crônico de glicocorticóide ou de anticoncepcional oral [39]. Doença arterial coronariana é outra manifestação muito importante encontrada nos pacientes com LES, sendo relacionada com processo acelerado de aterogênese e responsável por morbidade e mortalidade precoces [40].

O envolvimento pulmonar ou pleural ocorre em cerca de 50% dos pacientes. A manifestação mais comum é a pleurite com derrame de pequeno a moderado volume, geralmente bilateral. Menos comumente, podemos encontrar hipertensão pulmonar e pneumonite lúpica. A hipertensão pulmonar geralmente é de intensidade leve a moderada, sendo encontrada em 12 a 23% dos casos. O quadro agudo da pneumonite cursa com febre, tosse, hemoptise, pleurisia e dispnéia, detectada em até 10% dos pacientes [41]. Mais raramente, encontramos síndrome do pulmão encolhido e hemorragia alveolar aguda [42, 43].

Manifestações clínicas de doença renal ocorrem em cerca de 50% dos pacientes, sendo a hematúria e a proteinúria persistentes os achados mais encontrados no sedimento urinário, além de

hipocomplementemia e presença de anti-dsDNA (DNA dupla hélice - *double stranded DNA* - dsDNA).

Sintomas neuropsiquiátricos podem ocorrer nos pacientes com LES. Tais sintomas podem ser divididos em eventos primários (danos imunomediados no sistema nervoso central) e secundários (repercussão da doença em outros órgãos ou complicações terapêuticas). O espectro clínico do lúpus neuropsiquiátrico inclui síndrome cerebral orgânica, psicose, quadros depressivos, déficits funcionais, acidentes vasculares encefálicos, neuropatias periféricas, neuropatias cranianas, mielite transversa, convulsões, dentre outros [44]. A convulsão e a psicose podem constituir-se na primeira manifestação isolada da doença. A psicose orgânica aparece com relativa frequência e deve ser diferenciada da psicose associada ao uso de glicocorticóide.

A atividade da doença pode ser avaliada usando a combinação de anamnese, exame físico e exames laboratoriais como hemograma, velocidade de hemossedimentação (VHS), proteína C reativa (PCR), exame do sedimento urinário, anticorpo anti-dsDNA e dosagem de complemento (C3 e C4). Existem vários índices com sensibilidade semelhantes [45] para avaliar a atividade da doença, tais como: SLEDAI (*Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index*) [46], SLAM (*Systemic Lupus Activity Measure*) [47] e BILAG (*British Isles Lupus Assessment Group*) [48]. A detecção de lesão irreversível ou sequela decorrente da doença pode ser medida por meio do SLICC/ACR DAMAGE INDEX (SLICC/ACR: *Systemic Lupus International Collaborating Clinics/ American College of Rheumatology*) [48].

1.5 Nefrite Lúpica

Manifestações clínicas de doença renal tornam-se clinicamente evidentes em cerca de 50% dos pacientes [15]. A proteinúria persistente é um dos achados mais frequentes. Síndrome nefrítica caracterizada por cilindrúria, hematúria e proteinúria, associada com hipertensão arterial sistêmica e perda de função renal pode estar presente na glomerulonefrite proliferativa, por outro lado, quadros nefróticos com proteinúria maciça, hipoalbuminemia e hiperlipidemia podem estar relacionados

com glomerulonefrite membranosa. Estados intermediários entre síndrome nefrítica e nefrótica são muito comuns acompanhando quadros de envolvimento renal no LES. Evolução para insuficiência renal crônica pode acontecer, especialmente nas formas proliferativas sem tratamento adequado.

Presença de anticorpos anti-dsDNA e hipocomplementemia são achados imunológicos associados com nefrite lúpica. Apesar de vários estudos recentes evidenciarem um possível papel patogênico de anticorpos antinucleossomo e anti-C1q, os anticorpos anti-dsDNA ainda são os mais relevantes no acometimento renal associado ao LES. A utilidade destes anticorpos na avaliação de atividade e diagnóstico da nefrite lúpica, entretanto, depende de vários aspectos relacionados com etnia, quantidade de anticorpos, isotipo, especificidade e afinidade [49-55].

1.6 Anticorpos Anti-DNA

Os anticorpos anti-DNA foram descritos primeiramente em 1957 e, desde então, tiveram destaque entre os autoanticorpos, especialmente devido a sua estreita relação com o LES [51]. Anticorpos anti-DNA são autoanticorpos contra antígenos nucleares. Podem ser divididos em dois grupos: os que se dirigem contra DNA desnaturado (DNA de hélice simples - *single stranded* DNA - ssDNA) e os que se dirigem contra DNA nativo (DNA dupla hélice - *double stranded* DNA - dsDNA) [56].

Anticorpos anti-ssDNA identificam bases purínicas e pirimidínicas que estão dentro da β -hélice do dsDNA, nucleosídeos, nucleotídeos e ribose fosfatase. Consequentemente, não reagem de forma cruzada com dsDNA [57]. Eles associam-se com nefrite lúpica proliferativa, entretanto, apresentam baixa especificidade e baixa associação com a atividade de doença, o que lhes confere limitada utilidade para o diagnóstico e manejo dos pacientes com LES [58].

Os anticorpos anti-dsDNA são muito específicos para o LES, sendo um dos critérios de classificação diagnóstica para esta doença. São encontrados em outras doenças em uma frequência geralmente abaixo de 5%. Apresentam associação com nefrite lúpica proliferativa e seus títulos flutuam de acordo com o grau de atividade do LES, podendo ser usados também para manejo e

seguimento da doença [59, 60]. Estão presentes em aproximadamente 60-80% dos pacientes com LES e podem ser pesquisados através de diferentes testes com metodologias distintas, dentre eles a imunofluorescência com *Crithidia luciliae* (CLIF - *Crithidia luciliae immunofluorescence*), ensaio Farr e ensaio imunoenzimático (ELISA - *enzyme-linked immunosorbent assay*) [56, 57, 61].

O ensaio Farr é baseado na precipitação do anticorpo anti-dsDNA com DNA marcado por radionuclídeo. Este ensaio detecta anticorpos anti-dsDNA de alta afinidade e imunocomplexos com histona e anti-dsDNA [62]. Entre 50 e 78% dos paciente com LES tem positividade para anti-dsDNA por esta metodologia. Seus títulos parecem associar-se com atividade de doença e nefrite proliferativa [57, 62].

A técnica por CLIF é realizada por imunofluorescência indireta que usa um flagelado unicelular rico em dsDNA e sem outros antígenos nucleares como substrato. Esta técnica detecta anticorpos com alta afinidade ao dsDNA e, quando comparada com ensaio Farr, tem menor correlação com nefrite ativa [63, 64], entretanto, sua especificidade pode chegar próxima de 100% [65].

A terceira metodologia para detecção de anti-dsDNA utiliza técnica de ELISA [65, 66]. O dsDNA aderido aos micropoços de poliestireno serve como antígeno para capturar anticorpos. Este método detecta anticorpos de alta e baixa afinidade. Ele é positivo em cerca de 70 a 80% dos pacientes com LES. A especificidade é de aproximadamente 70%.

Os títulos do anti-dsDNA de uma forma geral flutuam conforme a atividade do LES. Altas concentrações deste autoanticorpo estão associadas ao aumento da atividade da doença [67]. Muitos pacientes com LES têm anticorpos anti- dsDNA da classe IgG, os quais já foram associados com nefrite lúpica ativa e índices de atividade global de doença em estudos prévios. Em contrapartida, a presença de anticorpos anti-dsDNA da classe IgM têm sido relacionada negativamente com estes achados [68, 69].

1.7 Associação entre nefrite lúpica e anticorpos anti-dsDNA

As técnicas para detectar anticorpos anti-dsDNA podem ser diferentes quanto à sensibilidade e especificidade. Embora o ensaio Farr seja o mais sensível em detectar estas imunoglobulinas e seus resultados bem relacionados com atividade de doença e presença de nefrite lúpica, ele tem sido substituído por outras técnicas, principalmente por CLIF e ELISA, devido à necessidade de antígeno radioativo [54].

A presença do anti-dsDNA indica a possibilidade de nefrite lúpica ativa, especialmente se associada com hipocomplementemia, entretanto, existem casos em que a nefrite não se desenvolve apesar do paciente apresentar altos títulos de anti-dsDNA, independente dos níveis séricos de C3 ou C4. A explicação disso pode estar relacionada com a predominância do isotipo IgM anti-dsDNA, que aparece como fator protetor segundo alguns autores, enquanto o isotipo IgG do anti-dsDNA parece ser o anticorpo relacionado com a presença de acometimento renal no LES [68, 70].

A razão IgG/IgM do anticorpo anti-dsDNA em pacientes lúpicos com e sem nefrite foi estudada em 24 indivíduos na Alemanha. Os resultados evidenciaram que 64% dos pacientes com nefrite lúpica apresentavam razão $IgG/IgM > 0,8$ e somente 34% dos pacientes sem nefrite apresentavam esta relação. A razão de chances foi de 3,2 para a presença de nefrite lúpica em pacientes que tiveram a relação $IgG/IgM > 0,8$. Os autores sugeriram um possível papel patogênico do isotipo IgG do anticorpo anti-dsDNA na nefrite lúpica [71].

No Brasil, estudo conduzido no nordeste, com população predominantemente afrodescendente, encontrou níveis semelhantes dos isotipos IgG e IgM do anticorpo anti-dsDNA por ELISA em pacientes com e sem nefrite lúpica [72]. Isto reforça que o verdadeiro papel dos isotipos IgG e IgM do anticorpo anti-dsDNA ainda precisa ser melhor esclarecido. Propõe-se aqui um estudo para avaliar se os isotipos IgG e IgM do anti-dsDNA podem estar associados às manifestações clínicas e laboratoriais do LES, especialmente a nefrite lúpica, em de um centro terciário no sul do Brasil.

2 OBJETIVO

Avaliar se há associação dos isotipos IgG e IgM do anti-dsDNA com as manifestações clínicas e laboratoriais apresentadas por pacientes com lúpus eritematoso sistêmico.

3 HIPÓTESE OPERACIONAL

Não há associação entre os isotipos IgG e IgM do anti-dsDNA com as manifestações clínicas e laboratoriais apresentadas por pacientes com lúpus eritematoso sistêmico.

4 HIPÓTESE CONCEITUAL

Há associação entre a os isotipos IgG e IgM do anti-dsDNA com as manifestações clínicas e laboratoriais apresentadas por pacientes com lúpus eritematoso sistêmico.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hochberg, M.C., *Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus*. *Arthritis Rheum*, 1997. **40**(9): p. 1725.
2. Tan, E.M., A.S. Cohen, J.F. Fries, A.T. Masi, D.J. McShane, N.F. Rothfield, et al., *The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus*. *Arthritis Rheum*, 1982. **25**(11): p. 1271-7.
3. Edworthy, S.M., E. Zatarain, D.J. McShane, and D.A. Bloch, *Analysis of the 1982 ARA lupus criteria data set by recursive partitioning methodology: new insights into the relative merit of individual criteria*. *J Rheumatol*, 1988. **15**(10): p. 1493-8.
4. Lawrence, R.C., C.G. Helmick, F.C. Arnett, R.A. Deyo, D.T. Felson, E.H. Giannini, et al., *Estimates of the prevalence of arthritis and selected musculoskeletal disorders in the United States*. *Arthritis Rheum*, 1998. **41**(5): p. 778-99.
5. Fessel, W.J., *Systemic lupus erythematosus in the community. Incidence, prevalence, outcome, and first symptoms; the high prevalence in black women*. *Arch Intern Med*, 1974. **134**(6): p. 1027-35.
6. Uramoto, K.M., C.J. Michet, Jr., J. Thumboo, J. Sunku, W.M. O'Fallon, and S.E. Gabriel, *Trends in the incidence and mortality of systemic lupus erythematosus, 1950-1992*. *Arthritis Rheum*, 1999. **42**(1): p. 46-50.
7. Michet, C.J., Jr., C.H. McKenna, L.R. Elveback, R.A. Kaslow, and L.T. Kurland, *Epidemiology of systemic lupus erythematosus and other connective tissue diseases in Rochester, Minnesota, 1950 through 1979*. *Mayo Clin Proc*, 1985. **60**(2): p. 105-13.
8. Vilar, M.J. and E.I. Sato, *Estimating the incidence of systemic lupus erythematosus in a tropical region (Natal, Brazil)*. *Lupus*, 2002. **11**(8): p. 528-32.
9. Lahita, R.G., *The role of sex hormones in systemic lupus erythematosus*. *Curr Opin Rheumatol*, 1999. **11**(5): p. 352-6.

10. Hochberg, M.C., *The incidence of systemic lupus erythematosus in Baltimore, Maryland, 1970-1977*. *Arthritis Rheum*, 1985. **28**(1): p. 80-6.
11. McCarty, D.J., S. Manzi, T.A. Medsger, Jr., R. Ramsey-Goldman, R.E. LaPorte, and C.K. Kwok, *Incidence of systemic lupus erythematosus. Race and gender differences*. *Arthritis Rheum*, 1995. **38**(9): p. 1260-70.
12. Schaller, J., *Lupus in childhood*. *Clin Rheum Dis*, 1982. **8**(1): p. 219-28.
13. Ballou, S.P., M.A. Khan, and I. Kushner, *Clinical features of systemic lupus erythematosus: differences related to race and age of onset*. *Arthritis Rheum*, 1982. **25**(1): p. 55-60.
14. Boumpas, D.T., B.J. Fessler, H.A. Austin, 3rd, J.E. Balow, J.H. Klippel, and M.D. Lockshin, *Systemic lupus erythematosus: emerging concepts. Part 2: Dermatologic and joint disease, the antiphospholipid antibody syndrome, pregnancy and hormonal therapy, morbidity and mortality, and pathogenesis*. *Ann Intern Med*, 1995. **123**(1): p. 42-53.
15. Cervera, R., M.A. Khamashta, J. Font, G.D. Sebastiani, A. Gil, P. Lavilla, et al., *Morbidity and mortality in systemic lupus erythematosus during a 10-year period: a comparison of early and late manifestations in a cohort of 1,000 patients*. *Medicine (Baltimore)*, 2003. **82**(5): p. 299-308.
16. Kasitanon, N., L.S. Magder, and M. Petri, *Predictors of survival in systemic lupus erythematosus*. *Medicine (Baltimore)*, 2006. **85**(3): p. 147-56.
17. Hochberg, M.C., *Systemic lupus erythematosus*. *Rheum Dis Clin North Am*, 1990. **16**(3): p. 617-39.
18. Pistiner, M., D.J. Wallace, S. Nessim, A.L. Metzger, and J.R. Klinenberg, *Lupus erythematosus in the 1980s: a survey of 570 patients*. *Semin Arthritis Rheum*, 1991. **21**(1): p. 55-64.
19. Tucker, L.B., S. Menon, J.G. Schaller, and D.A. Isenberg, *Adult- and childhood-onset systemic lupus erythematosus: a comparison of onset, clinical features, serology, and outcome*. *Br J Rheumatol*, 1995. **34**(9): p. 866-72.

20. Boumpas, D.T., H.A. Austin, 3rd, B.J. Fessler, J.E. Balow, J.H. Klippel, and M.D. Lockshin, *Systemic lupus erythematosus: emerging concepts. Part 1: Renal, neuropsychiatric, cardiovascular, pulmonary, and hematologic disease*. *Ann Intern Med*, 1995. **122**(12): p. 940-50.
21. Swaak, A.J., J.C. Nossent, and R.J. Smeenk, *Prognostic factors in systemic lupus erythematosus*. *Rheumatol Int*, 1991. **11**(3): p. 127-32.
22. Abu-Shakra, M., M.B. Urowitz, D.D. Gladman, and J. Gough, *Mortality studies in systemic lupus erythematosus. Results from a single center. I. Causes of death*. *J Rheumatol*, 1995. **22**(7): p. 1259-64.
23. Callahan, L.F. and T. Pincus, *Associations between clinical status questionnaire scores and formal education level in persons with systemic lupus erythematosus*. *Arthritis Rheum*, 1990. **33**(3): p. 407-11.
24. Ward, M.M. and S. Studenski, *Clinical manifestations of systemic lupus erythematosus. Identification of racial and socioeconomic influences*. *Arch Intern Med*, 1990. **150**(4): p. 849-53.
25. Cervera, R., M.A. Khamashta, J. Font, G.D. Sebastiani, A. Gil, P. Lavilla, et al., *Systemic lupus erythematosus: clinical and immunologic patterns of disease expression in a cohort of 1,000 patients. The European Working Party on Systemic Lupus Erythematosus*. *Medicine (Baltimore)*, 1993. **72**(2): p. 113-24.
26. Ward, M.M. and S. Studenski, *Systemic lupus erythematosus in men: a multivariate analysis of gender differences in clinical manifestations*. *J Rheumatol*, 1990. **17**(2): p. 220-4.
27. Lu, L.J., D.J. Wallace, M.L. Ishimori, R.H. Scofield, and M.H. Weisman, *Review: Male systemic lupus erythematosus: a review of sex disparities in this disease*. *Lupus*. **19**(2): p. 119-29.

28. Boddaert, J., D.L. Huong, Z. Amoura, B. Wechsler, P. Godeau, and J.C. Piette, *Late-onset systemic lupus erythematosus: a personal series of 47 patients and pooled analysis of 714 cases in the literature*. *Medicine (Baltimore)*, 2004. **83**(6): p. 348-59.
29. Bertoli, A.M., G.S. Alarcon, J. Calvo-Alen, M. Fernandez, L.M. Vila, and J.D. Reveille, *Systemic lupus erythematosus in a multiethnic US cohort. XXXIII. Clinical [corrected] features, course, and outcome in patients with late-onset disease*. *Arthritis Rheum*, 2006. **54**(5): p. 1580-7.
30. Urowitz, M.B., A.A. Bookman, B.E. Koehler, D.A. Gordon, H.A. Smythe, and M.A. Ogryzlo, *The bimodal mortality pattern of systemic lupus erythematosus*. *Am J Med*, 1976. **60**(2): p. 221-5.
31. Iriya, S.M., V.L. Capelozzi, I. Calich, M.A. Martins, and A. Lichtenstein, *Causes of death in patients with systemic lupus erythematosus in Sao Paulo, Brazil: a study of 113 autopsies*. *Arch Intern Med*, 2001. **161**(12): p. 1557.
32. Chogle, A.R. and A. Chakravarty, *Cardiovascular events in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis : emerging concepts, early diagnosis and management*. *J Assoc Physicians India*, 2007. **55**: p. 32-40.
33. Manzi, S., F. Selzer, K. Sutton-Tyrrell, S.G. Fitzgerald, J.E. Rairie, R.P. Tracy, et al., *Prevalence and risk factors of carotid plaque in women with systemic lupus erythematosus*. *Arthritis Rheum*, 1999. **42**(1): p. 51-60.
34. Cronin, M.E., *Musculoskeletal manifestations of systemic lupus erythematosus*. *Rheum Dis Clin North Am*, 1988. **14**(1): p. 99-116.
35. Lee, C., O. Almagor, D.D. Dunlop, S. Manzi, S. Spies, and R. Ramsey-Goldman, *Self-reported fractures and associated factors in women with systemic lupus erythematosus*. *J Rheumatol*, 2007. **34**(10): p. 2018-23.

36. Ruiz-Irastorza, G., M.V. Egurbide, N. Olivares, A. Martinez-Berriotxo, and C. Aguirre, *Vitamin D deficiency in systemic lupus erythematosus: prevalence, predictors and clinical consequences*. *Rheumatology (Oxford)*, 2008. **47**(6): p. 920-3.
37. Moder, K.G., T.D. Miller, and H.D. Tazelaar, *Cardiac involvement in systemic lupus erythematosus*. *Mayo Clin Proc*, 1999. **74**(3): p. 275-84.
38. Roldan, C.A., B.K. Shively, and M.H. Crawford, *An echocardiographic study of valvular heart disease associated with systemic lupus erythematosus*. *N Engl J Med*, 1996. **335**(19): p. 1424-30.
39. Khamashta, M.A., *Management of thrombosis in the antiphospholipid syndrome*. *Lupus*, 1996. **5**(5): p. 463-6.
40. Mucenic, T., J.C. Brenol, M. Bredemeier, B. Paiva Dos Santos, J.A. Chies, O.A. Monticciolo, et al., *Glu298Asp eNOS polymorphism is not associated with SLE*. *Lupus*, 2009. **18**(5): p. 448-51.
41. Muller, K., N.J. Kriegbaum, B. Baslund, O.H. Sorensen, M. Thyman, and K. Bentzen, *Vitamin D3 metabolism in patients with rheumatic diseases: low serum levels of 25-hydroxyvitamin D3 in patients with systemic lupus erythematosus*. *Clin Rheumatol*, 1995. **14**(4): p. 397-400.
42. Karim, M.Y., L.C. Miranda, C.M. Tench, P.A. Gordon, P. D'Cruz D, M.A. Khamashta, et al., *Presentation and prognosis of the shrinking lung syndrome in systemic lupus erythematosus*. *Semin Arthritis Rheum*, 2002. **31**(5): p. 289-98.
43. Badsha, H., C.L. Teh, K.O. Kong, T.Y. Lian, and H.H. Chng, *Pulmonary hemorrhage in systemic lupus erythematosus*. *Semin Arthritis Rheum*, 2004. **33**(6): p. 414-21.
44. Schenatto, C.B., R.M. Xavier, M. Bredemeier, L.V. Portela, A.B. Tort, T.L. Dedavid e Silva, et al., *Raised serum S100B protein levels in neuropsychiatric lupus*. *Ann Rheum Dis*, 2006. **65**(6): p. 829-31.

45. Griffiths, B., M. Mosca, and C. Gordon, *Assessment of patients with systemic lupus erythematosus and the use of lupus disease activity indices*. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 2005. **19**(5): p. 685-708.
46. Bombardier, C., D.D. Gladman, M.B. Urowitz, D. Caron, and C.H. Chang, *Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE*. *Arthritis Rheum*, 1992. **35**(6): p. 630-40.
47. Liang, M.H., S.A. Socher, M.G. Larson, and P.H. Schur, *Reliability and validity of six systems for the clinical assessment of disease activity in systemic lupus erythematosus*. *Arthritis Rheum*, 1989. **32**(9): p. 1107-18.
48. Gladman, D., E. Ginzler, C. Goldsmith, P. Fortin, M. Liang, M. Urowitz, et al., *The development and initial validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology damage index for systemic lupus erythematosus*. *Arthritis Rheum*, 1996. **39**(3): p. 363-9.
49. Rahman, A. and F. Hiepe, *Anti-DNA antibodies--overview of assays and clinical correlations*. *Lupus*, 2002. **11**(12): p. 770-3.
50. Tzioufas, A.G., C. Terzoglou, E.D. Stavropoulos, S. Athanasiadou, and H.M. Moutsopoulos, *Determination of anti-ds-DNA antibodies by three different methods: comparison of sensitivity, specificity and correlation with lupus activity index (LAI)*. *Clin Rheumatol*, 1990. **9**(2): p. 186-92.
51. Smeenk, R.J., *Methodological update detection of antibodies to dsDNA: current insights into its relevance*. *Clin Exp Rheumatol*, 2002. **20**(3): p. 294-300.
52. Isenberg, D. and R. Smeenk, *Clinical laboratory assays for measuring anti-dsDNA antibodies. Where are we now?* *Lupus*, 2002. **11**(12): p. 797-800.
53. Isenberg, D., *Anti-dsDNA antibodies: still a useful criterion for patients with systemic lupus erythematosus?* *Lupus*, 2004. **13**(11): p. 881-5.

54. Rouquette, A.M. and C. Desgruelles, *Detection of antibodies to dsDNA: an overview of laboratory assays*. *Lupus*, 2006. **15**(7): p. 403-7.
55. Yung, S. and T.M. Chan, *Anti-DNA antibodies in the pathogenesis of lupus nephritis--the emerging mechanisms*. *Autoimmun Rev*, 2008. **7**(4): p. 317-21.
56. Isenberg, D.A., J.J. Manson, M.R. Ehrenstein, and A. Rahman, *Fifty years of anti-ds DNA antibodies: are we approaching journey's end?* *Rheumatology (Oxford)*, 2007. **46**(7): p. 1052-6.
57. Hahn, B.H., *Antibodies to DNA*. *N Engl J Med*, 1998. **338**(19): p. 1359-68.
58. Miles, S. and D. Isenberg, *A review of serological abnormalities in relatives of SLE patients*. *Lupus*, 1993. **2**(3): p. 145-50.
59. Kavanaugh, A.F. and D.H. Solomon, *Guidelines for immunologic laboratory testing in the rheumatic diseases: anti-DNA antibody tests*. *Arthritis Rheum*, 2002. **47**(5): p. 546-55.
60. Nossent, J.C., V. Huysen, R.J. Smeenk, and A.J. Swaak, *Low avidity antibodies to dsDNA as a diagnostic tool*. *Ann Rheum Dis*, 1989. **48**(9): p. 748-52.
61. Heidenreich, U., G. Mayer, M. Herold, W. Klotz, K. Stempfl Al-Jazrawi, and K. Lhotta, *Sensitivity and specificity of autoantibody tests in the differential diagnosis of lupus nephritis*. *Lupus*, 2009. **18**(14): p. 1276-80.
62. Hylkema, M.N., M.C. van Bruggen, T. ten Hove, J. de Jong, A.J. Swaak, J.H. Berden, et al., *Histone-containing immune complexes are to a large extent responsible for anti-dsDNA reactivity in the Farr assay of active SLE patients*. *J Autoimmun*, 2000. **14**(2): p. 159-68.
63. Crowe, W., I. Kushner, J.D. Clough, and P.J. Vignos, Jr., *Comparison of the Crithidia lucilia, millipore filter, Farr, and hemagglutination methods for detection of antibodies to DNA*. *Arthritis Rheum*, 1978. **21**(3): p. 390-1.
64. Smeenk, R., G. van der Lelij, and L. Aarden, *Avidity of antibodies to dsDNA: comparison of IFT on Crithidia luciliae, Farr assay, and PEG assay*. *J Immunol*, 1982. **128**(1): p. 73-8.

65. Haugbro, K., J.C. Nossent, T. Winkler, Y. Figenschau, and O.P. Rekvig, *Anti-dsDNA antibodies and disease classification in antinuclear antibody positive patients: the role of analytical diversity*. *Ann Rheum Dis*, 2004. **63**(4): p. 386-94.
66. Avina-Zubieta, J.A., G. Galindo-Rodriguez, L. Kwan-Yeung, P. Davis, and A.S. Russell, *Clinical evaluation of various selected ELISA kits for the detection of anti-DNA antibodies*. *Lupus*, 1995. **4**(5): p. 370-4.
67. Bootsma, H., P.E. Spronk, E.J. Ter Borg, E.J. Hummel, G. de Boer, P.C. Limburg, et al., *The predictive value of fluctuations in IgM and IgG class anti-dsDNA antibodies for relapses in systemic lupus erythematosus. A prospective long-term observation*. *Ann Rheum Dis*, 1997. **56**(11): p. 661-6.
68. Witte, T., *IgM antibodies against dsDNA in SLE*. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2008. **34**(3): p. 345-7.
69. Witte, T., K. Hartung, C. Sachse, T. Matthias, M. Fricke, H. Deicher, et al., *IgM anti-dsDNA antibodies in systemic lupus erythematosus: negative association with nephritis*. *SLE Study Group*. *Rheumatol Int*, 1998. **18**(3): p. 85-91.
70. Werwitzke, S., D. Trick, K. Kamino, T. Matthias, K. Kniesch, B. Schlegelberger, et al., *Inhibition of lupus disease by anti-double-stranded DNA antibodies of the IgM isotype in the (NZB x NZW)F1 mouse*. *Arthritis Rheum*, 2005. **52**(11): p. 3629-38.
71. Forger, F., T. Matthias, M. Oppermann, H. Becker, and K. Helmke, *Clinical significance of anti-dsDNA antibody isotypes: IgG/IgM ratio of anti-dsDNA antibodies as a prognostic marker for lupus nephritis*. *Lupus*, 2004. **13**(1): p. 36-44.
72. Atta, A.M., M.M. Pereira, M. Santiago, and M.L. Sousa-Atta, *Anti-dsDNA antibodies in Brazilian patients of mainly African descent with systemic lupus erythematosus: lack of association with lupus nephritis*. *Clin Rheumatol*, 2009. **28**(6): p. 693-7.

6 ARTIGO EM PORTUGUÊS

ISOTIPOS IgG E IgM ANTI-dsDNA EM PACIENTES COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO

Briele Keiserman¹, Maria Rita Ronchetti², Odirlei André Monticielo³, Henrique Luiz Staub⁴

¹Mestranda do Programa de Pós Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

²Acadêmica da Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

³Professor adjunto do Departamento de Medicina Interna da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

⁴Professor Adjunto de Clínica Médica e Reumatologia da Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Endereço para correspondência:

Briele Keiserman

Serviço de Reumatologia

Hospital São Lucas da PUCRS

Av. Ipiranga 6690, sala220

CEP 90610-000 - Porto Alegre - Brasil

e-mail: briele.k@gmail.com

Resumo

Anticorpos IgG anti-dsDNA se associam à ocorrência de nefrite lúpica. Relatos recentes sugerem que o isotipo IgM anti-dsDNA seja nefroprotetor. Avaliamos frequência de IgG anti-dsDNA em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES), e averiguamos a relação entre proporção IgG/IgM anti-dsDNA e manifestações clínicas da doença. O estudo, transversal, incluiu 137 pacientes com LES de acordo com os critérios tradicionais (92,5% mulheres, 79,5% raça branca) e uma população de 58 casos de LES (93,1% mulheres, 81% raça branca) selecionados por positividade para IgG anti-dsDNA. Anticorpos IgG e IgM anti-dsDNA foram detectados por imunofluorescência indireta com *Crithidia luciliae*, com ponto de corte na diluição 1/10. A presença de IgG anti-dsDNA se associou à presença de anemia hemolítica, leucolinfopenia e depleção de Complemento ($p < 0,001$). Dos 58 pacientes com teste positivo para IgG anti-dsDNA, 15 foram também positivos para o isotipo IgM. O grupo com ambos os isotipos teve frequência significativamente menor de sedimento urinário ativo quando comparado ao grupo com IgG anti-dsDNA isolado (6,7% versus 34,9%, $p = 0,046$). A distribuição da proporção IgG/IgM anti-dsDNA evidenciou tendência de medianas mais elevadas na presença de artrite e leucolinfopenia [4 (2-8) versus 1 (1-2), $p = 0,070$ e 4 (3-8) versus 1 (1-4), $p = 0,066$, respectivamente]. Em suma, a frequência de IgG anti-dsDNA foi relevante em nossa casuística. A subpopulação positiva para ambos IgG e IgM anti-dsDNA foi menos propensa a alterações de sedimento urinário do que aquela com IgG anti-dsDNA isolado. Estes dados sugerem um comportamento biológico distinto para o isotipo IgM anti-dsDNA.

Palavras-chave

Lúpus eritematoso sistêmico, nefrite lúpica, anticorpos anti-dsDNA, isotipos IgG e IgM anti-dsDNA.

Introdução

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença inflamatória crônica autoimune com envolvimento de múltiplos órgãos. A etiologia envolve fatores genéticos, imunológicos, hormonais e ambientais. O LES não pode ser considerado afecção rara; de acordo com estatísticas asiáticas, a prevalência é estimada em até 45 casos por 100.000 indivíduos [1]. É particularmente comum em mulheres em idade reprodutiva. Caracteriza-se pela produção de autoanticorpos, especialmente contra antígenos nucleares, e pela formação de imunocomplexos [2].

Em termos de patogenia, sabe-se, à luz de dados recentes, que a resposta pró-inflamatória exacerbada vista no LES ativo se deve, pelo menos parcialmente, à deficiência quantitativa de células T reguladoras [3]. Dados recentes indicam que a interleucina 17 é capaz de aumentar as respostas humorais típicas do LES ao promover a diferenciação de linfócitos B em plasmócitos [4]. Lúpicos com alta produção de autoanticorpos e doença ativa apresentam níveis diminuídos de 1,25 hidroxivitamina D3; a referida vitamina é capaz de inibir proliferação de linfócitos B e induzir sua apoptose [5]. Ativação de células dendríticas e aumento de síntese de alfa-interferon, foram recentemente descritas no LES [6]. O alfa-interferon pode constituir alvo terapêutico para anticorpos monoclonais em pacientes com LES em breve futuro [7].

O envolvimento renal é comum em pacientes com LES, ocorrendo em 50% dos casos [8]. A ocorrência de nefropatia lúpica determina aumento da morbidade e mortalidade. Anticorpos anti-dsDNA (*double stranded DNA*, ou DNA de dupla hélice) estão geralmente associados à doença ativa, especialmente nefrite lúpica [9, 10].

A patogenicidade dos anticorpos anti-dsDNA no LES é matéria complexa. Grau de deposição tecidual, isotipo, afinidade, assim como habilidade para ativar Complemento e ocupar receptores Fc em superfície celular são variáveis importantes na patogenicidade deste autoanticorpo; além disso, anticorpos anti-dsDNA de isotipo IgG podem canalizar antígenos nucleares através da membrana celular, gerando respostas inflamatórias locais através de síntese de prostaglandinas e citocinas [11].

Dada a sua especificidade, a detecção de anticorpos anti-dsDNA é de grande utilidade para o diagnóstico do LES. As titulações frequentemente flutuam de acordo com o grau de atividade da doença. O isotipo IgG é o mais associado de forma direta com a ocorrência de nefrite [12, 13]. Modernamente, o papel patogênico para anticorpos anti-nucleossomo e anti-C1q na nefrite lúpica foi também documentado [14, 15].

Presentes em 60-80% dos pacientes dos casos de LES, anticorpos anti-dsDNA podem ser detectados através de imunofluorescência indireta (*Crithidia luciliae immunofluorescence*, ou CLIF), ensaio de Farr (radioimunoensaio) ou teste imunoenzimático (ELISA) [16-18]. Embora úteis para acompanhamento de atividade de doença, anticorpos anti-dsDNA podem ser detectados em pacientes em remissão. Nesta circunstância, postula-se uma ocorrência simultânea do isotipo IgM anti-dsDNA, que poderia conferir proteção para doença ativa. O isotipo IgM não é rotineiramente testado nos ensaios disponíveis [16-18].

No presente estudo, averiguamos a prevalência de IgG anti-dsDNA e as suas associações clínicas em pacientes com LES. Em paralelo, comparamos as manifestações clínicas de pacientes com IgG anti-dsDNA positivos com aquelas de pacientes com ambos os isotipos. Finalmente, avaliamos a proporção IgG/IgM anti-dsDNA no contexto das variáveis clínico-laboratoriais.

Pacientes e Métodos

População em estudo

O estudo, transversal, incluiu duas populações de pacientes com doença lúpica em acompanhamento regular no Ambulatório de LES do Serviço de Reumatologia, Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS): uma população global e outra selecionada com base na presença de anticorpos IgG anti-dsDNA. Como critérios iniciais de inclusão para o estudo, os pacientes deveriam ter no mínimo 16 anos de idade e preencher 4 ou mais dos 11 critérios de classificação de LES de acordo com o ACR (*American College Rheumatology*)

[19]. A ocorrência paralela de síndrome de Sjögren secundária [20] e síndrome antifosfolípide (SAF) secundária [21] foi admitida para a casuística deste estudo. Foram excluídos todos os pacientes que apresentavam outras doenças difusas do tecido conjuntivo, assim como indivíduos com doença mental que impossibilitasse a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital São Lucas da PUCRS (CEP 10/05241). Os pacientes foram recrutados entre janeiro e julho de 2011.

Variáveis em estudo

Os dados clínicos e laboratoriais foram obtidos através de questionário padronizado aplicado no dia da consulta, e por revisão dos prontuários médicos. O questionário incluiu as seguintes variáveis: presença ou ausência de eritema malar, lúpus discóide, fotossensibilidade, úlceras orais, serosite, artrite, manifestações hematológicas, manifestações renais, manifestações neurológicas e autoanticorpos como anticorpo antinuclear (ANA), anticorpo anti-dsDNA por metodologia de CLIF, anti-Ro/SSA, anti-La/SSB, anticorpos anticardiolipinas (aCL), anticoagulante lúpico (AL) e VDRL (*Venereal disease research laboratory test*). No dia da consulta, os níveis de Complemento (C3, C4) e o sedimento urinário foram avaliados. Para quantificação do grau de atividade da doença lúpica, utilizou-se o SLEDAI (*Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index*). Vinte e quatro variáveis inclusas em 9 sistemas orgânicos foram assim quantificadas no SLEDAI: peso 8 para sistema nervoso central; 4 para nefropatia e alterações músculo esqueléticas; 2 para serosite, quadro dermatológico e alterações imunológicas; e peso 1 para sintomas constitucionais e alterações hematológicas. Um SLEDAI acima de 4 foi considerado compatível com doença ativa [22].

O sedimento urinário foi considerado ativo na presença de ao menos uma das seguintes alterações (conforme o SLEDAI): piúria (leucócitos >5 /campo 400X, excluindo infecção); hematúria (hemácias ≥ 5 /campo 400X, excluindo infecções, litíase e outras causas); proteinúria (proteínas na urina $\geq +++$ ou índice proteinúria/creatinúria em amostra de urina $\geq 0,5$) ou cilindrúria

(presença de cilindros granulosos ou hemáticos) [22]. Os valores considerados normais para C3 e C4 foram 88-165mg/dL e 14-44mg/dL, respectivamente [22]. Uma amostra de sangue foi coletada de cada paciente no dia da consulta, com vistas à testagem para IgG e IgM anti-dsDNA.

Avaliação do anti-dsDNA por CLIF

Amostras de sangue de veia periférica foram centrifugadas e o soro foi congelado, até 2 horas após a coleta, à temperatura de -20°C para posterior determinação de IgG e IgM anti-dsDNA. Em nosso estudo, o método CLIF foi o escolhido para detectar estes anticorpos. A *Crithidia luciliae* é um protozoário rico em DNA de dupla hélice em seu cinetoplasto, e desprovido de outros antígenos no núcleo celular. Assim, os anticorpos que reagiram com o cinetoplasto foram somente direcionados contra antígenos de DNA de fita dupla. Os testes foram realizados de acordo com as instruções do fabricante (Euroimmun). O soro do paciente foi incubado com o substrato antigênico para permitir a ligação específica do autoanticorpo ao DNA do cinetoplasto, formando um complexo antígeno-anticorpo estável. O substrato foi então incubado com anticorpo anti-humano IgG ou IgM conjugado à fluoresceína; a leitura foi realizada através de microscópio de fluorescência [23, 24]. Foram considerados reagentes para IgG ou IgM anti-dsDNA todas as amostras com titulação $\geq 1/10$ [25].

Proporção IgG/IgM anti-dsDNA

A proporção entre as titulações de IgG e IgM anti-dsDNA foi obtida em todas as amostras positivas para IgM concomitante a IgG anti-dsDNA. Usamos como base a titulação de IgM anti-dsDNA e consideramos quantas vezes maior era a titulação de um isotipo em relação ao outro, IgG/IgM. Assim, o paciente que apresentava uma proporção de 2 apresentava titulação IgG anti-dsDNA 2 vezes maior do que a titulação do isotipo IgM. Desta maneira, criou-se empiricamente um equilíbrio entre isotipos diferentes com uma proporção harmoniosa que se correlacionasse à quantidade de anti-dsDNA.

Análise estatística

A análise descritiva dos dados foi realizada através do cálculo da média e desvio padrão (DP) para as variáveis quantitativas e frequência e porcentagem para as variáveis categóricas. Média e intervalo interquartil foram calculados para variáveis com distribuição assimétrica. Presença de IgG e IgM anti-dsDNA e proporção entre titulação de IgG e IgM anti-dsDNA foram avaliadas no contexto das manifestações clínicas e laboratoriais apresentadas pelos pacientes. O teste do qui-quadrado (χ^2) foi utilizado para as variáveis categóricas. O teste t de *student* foi aplicado para as variáveis quantitativas com distribuição simétrica e o teste de Mann Whitney para as variáveis com distribuição assimétrica.

Os dados foram analisados usando o programa SPSS versão 17.0. O valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Resultados

A população lúpica total incluiu 137 pacientes, dos quais 127 (92,7%) do gênero feminino e 10 (7,3%) do gênero masculino; 109 (79,5%) eram da raça branca, e 28 (20,5%) eram não-brancos. A média de idade dos pacientes foi $43,5 \pm 13,2$ anos. No momento do diagnóstico da doença, a média de idade foi $32,3 \pm 11,7$ anos, e o tempo médio de doença foi $10,72 \pm 8,0$ anos. A mediana do SLEDAI foi de 4 (intervalo interquartil entre 0-5).

A segunda população de LES de nosso estudo incluiu 58 pacientes selecionados pela presença de teste positivo para IgG anti-dsDNA. Foi composta por 54 mulheres (93,1%) e 4 homens (6,9%); 47 (81,0%) eram brancos, e 11 (19%) eram não-brancos. A média de idade foi $42,8 \pm 14,7$ anos. No momento do diagnóstico da doença, a média de idade dos pacientes foi $29,95 \pm 12,0$ anos, e o tempo médio de doença foi $10,9 \pm 8,0$ anos. A mediana do SLEDAI foi 4 (intervalo interquartil entre 2-8).

Arbitrariamente, na população total de 137 pacientes a positividade para anticorpos IgG anti-dsDNA foi considerada se o anticorpo foi detectado em algum momento da doença; a população selecionada de 58 pacientes foi selecionada com base em teste positivo para IgG anti-dsDNA no dia específico da avaliação para este estudo.

A comparação da população total de pacientes com LES (137 casos, 67,9% positivos para IgG anti-dsDNA) com o grupo selecionado pela presença de IgG anti-dsDNA (58 casos) revelou as seguintes diferenças estatisticamente significantes: lúpus discóide (8% versus 1,8%, $p=0,026$) e úlceras orais/nasais (56,9% versus 42,1%, $p=0,005$) foram ambos mais frequentes na população global em relação aos 58 pacientes IgG anti-dsDNA positivos. Diferentemente, manifestações hematológicas (49,6% versus 68,4%, $p=0,001$), anemia hemolítica autoimune (AHAI) (15,3% versus 28,1%, $p=0,001$), leucopenia/linfopenia (38,7% versus 57,9%, $p=0,001$), anticoagulante lúpico (10,2% versus 18,2%, $p=0,022$) e SLEDAI elevado foram mais frequentes na população IgG anti-dsDNA positiva. Na população total, a média do C3 foi $113,1 \pm 34,9$ mg/dL versus $99,5 \pm 28,8$ mg/dL na população IgG anti-dsDNA positiva ($p=0,001$). Em relação ao C4, a média foi $21,3 \pm 8,8$ mg/dL na população total versus $16,1 \pm 8,8$ mg/dL no grupo IgG anti-dsDNA positivo ($p=0,001$). Pacientes IgG anti-dsDNA positivos tiveram idade de início da doença significativamente mais precoce em relação ao grupo da população geral de lúpicos. Após ajuste pelo teste de Bonferroni, permaneceram significativamente mais frequentes na população IgG anti-dsDNA positiva as variáveis AHAI, leucolinfopenia e depleção de C3 e C4 ($p<0,001$). Estes resultados estão expressos na tabela 1.

Nas 58 amostras de pacientes positivos para IgG anti-dsDNA, a testagem para IgM anti-dsDNA foi procedida. A relação entre presença de IgG anti-dsDNA isolada (43 casos) e IgG e IgM anti-dsDNA concomitantes (15 casos) com as variáveis clínicas está descrita na tabela 2. O grupo de pacientes com ambos os isotipos apresentou, de forma significativa, menor frequência de sedimento urinário ativo em relação ao outro grupo (6,7% versus 34,9%, $p=0,046$). Para as outras

variáveis clínico-laboratoriais, não houve diferenças estatisticamente significante entre os dois grupos.

A tabela 3 mostra a distribuição da mediana da proporção IgG/IgM anti-dsDNA em relação às manifestações clínicas e laboratoriais dos 15 pacientes com ambos os isotipos. A análise desta distribuição mostrou uma tendência de proporção IgG/IgM mais elevada na presença de artrite e leucopenia/linfopenia [4 (2-8) versus 1 (1-2), $p=0,07$ e 4 (3-8) versus 1 (1-4), $p=0,066$, respectivamente].

Discussão

O LES é uma doença de grande complexidade e heterogeneidade genética; assim, estudos em diferentes populações contribuem para um entendimento mais amplo de sua etiopatogenia. Embora anticorpos anti-dsDNA sejam muito estudados na doença lúpica e suas associações clínicas (principalmente nefropatia) sejam bem conhecidas, o mesmo não se pode dizer acerca do comportamento biológico do isotipo IgM anti-dsDNA; este é um dos poucos estudos recentes a abordar as associações clínicas deste isotipo [26].

Neste estudo, transversal, analisamos as associações da IgG anti-dsDNA isolada e também dos isotipos concomitantes IgG e IgM em relação às manifestações clínico-laboratoriais de lúpicos de um hospital terciário do sul do Brasil. Os dados demográficos de nossa população global de pacientes com LES (137 casos), assim como na população selecionada de 58 casos anti-dsDNA positivos, indicam forte predominância do sexo feminino e da raça branca.

O predomínio absoluto do sexo feminino está de acordo com a literatura [1]; dados dos mesmos autores [1] indicaram acometimento predominante em raças não-brancas, diferentemente do observado em nosso estudo. Em concordância com nossos dados, Chahade et al documentaram alta incidência de LES em caucasianos do sudeste brasileiro [27]. A média de idade das duas populações estudadas (aproximadamente 43 anos) e a idade de início da doença (ao redor de 30 anos) estiveram de acordo com dados publicados em 2002 [28].

A nossa população global de pacientes lúpicos apresentou, em termos de manifestações clínico-laboratoriais, achados similares ao da literatura [29]. Comparativamente a um estudo recentemente efetuado no sul do Brasil [30], os dados foram também semelhantes, exceto para manifestações hematológicas, onde tivemos uma frequência menor, e para úlceras orais/nasais, onde obtivemos frequência maior.

A prevalência de anticorpos anti-dsDNA em nossos 137 casos de LES (67,9% de positividade em algum momento da doença) esteve também de acordo com dados prévios [31].

Quando comparamos os dados clínico-laboratoriais da população global de 137 pacientes com LES (32,1% dos quais anti-dsDNA negativos) com os 58 pacientes selecionados por positividade para IgG anti-DNA (tabela 1), observamos alguns dados de interesse. A população selecionada por positividade para IgG anti-dsDNA teve início mais prematuro da doença, o que sugere que a presença deste autoanticorpo se associe à doença multiorgânica mais precoce. De interesse, lúpus discóide e úlceras mucosas foram menos frequentes na população selecionada do que na população global, de onde se infere que a presença de anti-dsDNA não foi marcadora de lesões cutâneo-mucosas em nossa casuística.

Por outro lado, manifestações hematológicas como um todo, AHAI, leucolinfopenia, presença de anticoagulante lúpico, SLEDAI elevado e depleção de Complemento foram mais frequentes na população selecionada anti-dsDNA positiva. Após correção pelo teste de Bonferroni, permaneceram mais prevalentes na população selecionada as variáveis hematológicas (AHAI/leucolinfopenia) e depleção de Complemento. Pode-se postular, com base neste último achado, que os anticorpos IgG anti-dsDNA da população selecionada são ativadores de Complemento. Digno de menção, de acordo com dados de 1990, a prevalência de IgG anti-dsDNA foi fortemente influenciada pelos critérios de seleção dos pacientes e pelo método de detecção do anticorpo; a prevalência mais alta destes anticorpos foi obtida em casos de nefrite, e a mais baixa em LES neuropsiquiátrico [32].

Nos 58 pacientes positivos para IgG anti-dsDNA, comparamos os achados clínico-laboratoriais nos 43 casos com IgG isolada e nos 15 casos com ambos IgG e IgM anti-dsDNA. Para a grande maioria das variáveis clínico-laboratoriais (cutâneo- mucosas, articulares, hematológicas, serosas, neurológicas, autoanticorpos), não houve diferença entre os dois grupos. Mesmo levando-se em consideração a disparidade de número amostral entre os grupos, depreende-se que a ocorrência concomitante do isotipo IgM iniba o efeito de associação do isotipo IgG anti-dsDNA com um grande número de achados clínico-laboratoriais.

De importância, ausência de associação entre o isotipo IgM anti-dsDNA e atividade da doença (diferentemente do isotipo IgG, associado à doença ativa e nefrite), foi previamente documentada [2, 33-35]. De acordo com dados publicados em 1997, um eventual aumento dos níveis de IgM anti-dsDNA não foi preditivo para reativação da doença lúpica, e não se associou a manifestações específicas [2]. Em casuística brasileira publicada em 2009, não houve associação entre quaisquer isotipos (IgG, IgM, IgA) anti-dsDNA e lúpus renal [8]. Segundo dados de 1986, e não mais reafirmados, a presença de IgA (mas não IgM) anti-dsDNA foi concomitante ao isotipo IgG (seja por CLIF ou ELISA) em pacientes com doença lúpica ativa, incluindo nefropatia [36]. Na comparação entre os 3 testes para detecção de IgM anti-dsDNA (CLIF, ELISA e teste de Farr), a maior especificidade e sensibilidade coube ao último, de acordo com Bootsma *et al.* [37].

Nossos 15 pacientes com ambos os isotipos tiveram frequência significativamente menor de sedimento urinário ativo em relação aos pacientes com IgG anti-dsDNA isolada, achado de interesse por sugerir nefroproteção nesta circunstância. No único estudo de literatura que avaliou raio IgG/IgM, datado de 2004, Forger *et al* documentaram que um raio IgG/IgM inferior a 0,8 em ELISA foi protetor para nefropatia em análise longitudinal [12].

A distribuição das medianas da proporção IgG/IgM nos 15 casos não revelou associações clínicas relevantes, embora os valores do teste de Mann-Whitney, próprio para variáveis quantitativas assimétricas, tenha se situado próximo da significância para artrite e leucolinfopenia.

Nosso estudo apresenta limitações que devem ser enfocadas. O estudo poderia ter utilizado, idealmente, uma população única de pacientes lúpicos onde todos seriam avaliados para IgG/IgM anti-dsDNA, mas tal não foi possível. Nem todos os 137 pacientes em acompanhamento regular no nosso Ambulatório de LES concordaram em coletar a amostra de sangue, o que resultou no estudo de duas populações, a primeira avaliada por dados de prontuário, e a segunda selecionada por testagem positiva para IgG anti-dsDNA. A eventual testagem de ambos os isotipos na população global teria permitido o cálculo da proporção inversa, ou mesmo detectado isotipos IgM na ausência de IgG anti-dsDNA. Os 58 pacientes anti-dsDNA positivos que foram selecionados para a pesquisa do IgM anti-dsDNA apresentavam doença mais ativa e grave por um provável viés de referência para centro terciário. Por fim, o cálculo da proporção IgG/IgM foi, pela primeira vez, calculada por CLIF, mas não por outros métodos concomitantes, como teste de Farr e ELISA.

Em resumo, a prevalência de IgG anti-dsDNA foi relevante (dois terços dos casos) em nossa população lúpica global. A ocorrência de anticorpos anti-dsDNA se associou a lúpus hematológico e depleção de Complemento. A subpopulação positiva para ambos IgG e IgM anti-dsDNA foi menos propensa a alterações de sedimento urinário do que aquela com IgG anti-dsDNA isolada.

O corrente estudo traz à discussão a utilidade de se testar o isotipo IgM anti-dsDNA (como eventual fator de proteção para doença ativa) em paralelo ao isotipo IgG. O papel da proporção IgG/IgM no prognóstico da doença ainda deve ser elucidado. O estudo do comportamento biológico destes isotipos em populações maiores permitirá uma melhor compreensão da patogenia dos anticorpos dirigidos contra o DNA em pacientes com LES.

Referências bibliográficas

1. Jakes, RW, Bae, SC, Louthrenoo, W, Mok, CC, Navarra, SV, and Kwon, N, *Systematic review of the epidemiology of systemic lupus erythematosus in the Asia-Pacific region: Prevalence, incidence, clinical features, and mortality*. Arthritis Care Res (Hoboken), 2012. **64**(2): p. 159-68.

2. Bootsma, H, Spronk, PE, Ter Borg, EJ, Hummel, EJ, de Boer, G, Limburg, PC, et al., *The predictive value of fluctuations in IgM and IgG class anti-dsDNA antibodies for relapses in systemic lupus erythematosus. A prospective long-term observation.* Ann Rheum Dis, 1997. **56**(11): p. 661-6.
3. Kleczynska W, JB, Plutecka H, Milewski M, Sanak M, Musial J. , *Imbalance between Th17 and regulatory T-cells in systemic lupus erythematosus.* Folia Histochem Cytobiol., 2011. **49**(4): p. 646-53.
4. Shin MS, LN, Kang I. , *Effector T-cell subsets in systemic lupus erythematosus: update focusing on Th17 cells.* . Curr Opin Rheumatol., 2011. **23**(5): p. 444-8.
5. Chen, S, Sims, GP, Chen, XX, Gu, YY, Chen, S, and Lipsky, PE, *Modulatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on human B cell differentiation.* J Immunol, 2007. **179**(3): p. 1634-47.
6. Ronnblom, L and Pascual, V, *The innate immune system in SLE: type I interferons and dendritic cells.* Lupus, 2008. **17**(5): p. 394-9.
7. Crow, MK, *Interferon-alpha: a therapeutic target in systemic lupus erythematosus.* Rheum Dis Clin North Am, 2010. **36**(1): p. 173-86, x.
8. Atta, AM, Pereira, MM, Santiago, M, and Sousa-Atta, ML, *Anti-dsDNA antibodies in Brazilian patients of mainly African descent with systemic lupus erythematosus: lack of association with lupus nephritis.* Clin Rheumatol, 2009. **28**(6): p. 693-7.
9. Borchers, AT, Keen, CL, Shoenfeld, Y, and Gershwin, ME, *Surviving the butterfly and the wolf: mortality trends in systemic lupus erythematosus.* Autoimmun Rev, 2004. **3**(6): p. 423-53.
10. Cervera, R, Khamashta, MA, Font, J, Sebastiani, GD, Gil, A, Lavilla, P, et al., *Morbidity and mortality in systemic lupus erythematosus during a 10-year period: a comparison of early and late manifestations in a cohort of 1,000 patients.* Medicine (Baltimore), 2003. **82**(5): p. 299-308.

11. Munoz, LE, Gaip, US, and Herrmann, M, *Predictive value of anti-dsDNA autoantibodies: importance of the assay*. Autoimmun Rev, 2008. **7**(8): p. 594-7.
12. Forger, F, Matthias, T, Oppermann, M, Becker, H, and Helmke, K, *Clinical significance of anti-dsDNA antibody isotypes: IgG/IgM ratio of anti-dsDNA antibodies as a prognostic marker for lupus nephritis*. Lupus, 2004. **13**(1): p. 36-44.
13. Werwitzke, S, Trick, D, Kamino, K, Matthias, T, Kniesch, K, Schlegelberger, B, et al., *Inhibition of lupus disease by anti-double-stranded DNA antibodies of the IgM isotype in the (NZB x NZW)F1 mouse*. Arthritis Rheum, 2005. **52**(11): p. 3629-38.
14. van der Vlag, J and Berden, JH, *Lupus nephritis: role of antinucleosome autoantibodies*. Semin Nephrol, 2011. **31**(4): p. 376-89.
15. Trendelenburg, M, *Antibodies against C1q in patients with systemic lupus erythematosus*. Springer Semin Immunopathol, 2005. **27**(3): p. 276-85.
16. Hahn, BH, *Antibodies to DNA*. N Engl J Med, 1998. **338**(19): p. 1359-68.
17. Heidenreich, U, Mayer, G, Herold, M, Klotz, W, Stempfl Al-Jazrawi, K, and Lhotta, K, *Sensitivity and specificity of autoantibody tests in the differential diagnosis of lupus nephritis*. Lupus, 2009. **18**(14): p. 1276-80.
18. Isenberg, DA, Manson, JJ, Ehrenstein, MR, and Rahman, A, *Fifty years of anti-ds DNA antibodies: are we approaching journey's end?* Rheumatology (Oxford), 2007. **46**(7): p. 1052-6.
19. Hochberg, M, *Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus*. Arthritis Rheum Vol. 40. 1997. 1725.
20. Vitali, C, Bombardieri, S, Jonsson, R, Moutsopoulos, HM, Alexander, EL, Carsons, SE, et al., *Classification criteria for Sjogren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group*. Ann Rheum Dis, 2002. **61**(6): p. 554-8.

21. Miyakis, S, Lockshin, MD, Atsumi, T, Branch, DW, Brey, RL, Cervera, R, et al., *International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS)*. J Thromb Haemost, 2006. **4**(2): p. 295-306.
22. Bombardier, C, Gladman, DD, Urowitz, MB, Caron, D, and Chang, CH, *Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE*. Arthritis Rheum, 1992. **35**(6): p. 630-40.
23. Crowe, W, Kushner, I, Clough, JD, and Vignos, PJ, Jr., *Comparison of the Crithidia lucilia, millipore filter, Farr, and hemagglutination methods for detection of antibodies to DNA*. Arthritis Rheum, 1978. **21**(3): p. 390-1.
24. Smeenk, R, van der Lelij, G, and Aarden, L, *Avidity of antibodies to dsDNA: comparison of IFT on Crithidia luciliae, Farr assay, and PEG assay*. J Immunol, 1982. **128**(1): p. 73-8.
25. Wiik, AS, *Anti-nuclear autoantibodies: clinical utility for diagnosis, prognosis, monitoring, and planning of treatment strategy in systemic immunoinflammatory diseases*. Scand J Rheumatol, 2005. **34**(4): p. 260-8.
26. Sinico RA, BB, Sabadini E, Di Toma L, Radice A., *The use of laboratory tests in diagnosis and monitoring of systemic lupus erythematosus*. J Nephrol., 2002. **15**(6): p. S20-7.
27. Chahade, WH, Sato, EI, Moura, JE, Jr., Costallat, LT, and Andrade, LE, *Systemic lupus erythematosus in Sao Paulo/Brazil: a clinical and laboratory overview*. Lupus, 1995. **4**(2): p. 100-3.
28. Petri, M, *Epidemiology of systemic lupus erythematosus*. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2002. **16**(5): p. 847-58.
29. D'Cruz, DP, Khamashta, MA, and Hughes, GR, *Systemic lupus erythematosus*. Lancet, 2007. **369**(9561): p. 587-96.
30. Monticielo, OA, Chies, JA, Mucenic, T, Rucatti, GG, Junior, JM, da Silva, GK, et al., *Mannose-binding lectin gene polymorphisms in Brazilian patients with systemic lupus erythematosus*. Lupus, 2010. **19**(3): p. 280-7.

31. Rahman, A and Isenberg, DA, *Systemic lupus erythematosus*. N Engl J Med, 2008. **358**(9): p. 929-39.
32. Swaak, AJ, Huysen, V, Nossent, JC, and Smeenk, RJ, *Antinuclear antibody profiles in relation to specific disease manifestations of systemic lupus erythematosus*. Clin Rheumatol, 1990. **9**(1 Suppl 1): p. 82-94.
33. Witte, T, Hartung, K, Sachse, C, Matthias, T, Fricke, M, Deicher, H, et al., *IgM anti-dsDNA antibodies in systemic lupus erythematosus: negative association with nephritis*. SLE Study Group. Rheumatol Int, 1998. **18**(3): p. 85-91.
34. Okamura, M, Kanayama, Y, Amastu, K, Negoro, N, Kohda, S, Takeda, T, et al., *Significance of enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for antibodies to double stranded and single stranded DNA in patients with lupus nephritis: correlation with severity of renal histology*. Ann Rheum Dis, 1993. **52**(1): p. 14-20.
35. Krippner, H, Merle, S, Jorgens, K, and Pirlet, K, *Antibodies to dsDNA and ssDNA in the immunoglobulin classes IgG and IgM: prognostic value in the course of SLE*. Z Rheumatol, 1984. **43**(5): p. 265-71.
36. Gripenberg M, HT, *Anti-DNA antibodies of IgA class in patients with systemic lupus erythematosus*. Rheumatol Int., 1986. **6**(2): p. 53-5.
37. Bootsma, H, Spronk, PE, Hummel, EJ, de Boer, G, ter Borg, EJ, Limburg, PC, et al., *Anti-double stranded DNA antibodies in systemic lupus erythematosus: detection and clinical relevance of IgM-class antibodies*. Scand J Rheumatol, 1996. **25**(6): p. 352-9.

Tabela 1 Achados demográficos, clínicos e laboratoriais cumulativos dos pacientes

Características avaliadas	Total (n=137)	População selecionada IgG anti-dsDNA positiva (n=58)	<i>p</i> ^a
Gênero feminino	92,5% (137)	93,1% (58)	0,999
Idade (anos±DP)	43,5 ±13,2 (136)	42,8±14,7 (58)	0,530
Idade no diagnóstico (anos±DP)	32,3±11,7 (137)	29,95±12,0(58)	0,010
Tempo de doença (anos±DP)	10,72±8,0 (137)	10,9±8,0 (57)	0,718
Eritema malar	60,6% (137)	63,2% (58)	0,732
Lúpus discóide	8,0% (137)	1,8% (58)	0,026
Fotossensibilidade	82,5% (137)	77,2% (58)	0,252
Úlceras orais/nasais	56,9% (137)	42,1% (58)	0,005
Artrite	78,1% (137)	75,4% (58)	0,670
Serosite	31,4% (137)	33,3% (58)	0,820
Nefrite	44,5% (137)	54,4% (58)	0,074
Manifestações neurológicas	16,8% (137)	17,5% (58)	0,999
Manifestações hematológicas	49,6%(137)	68,4 % (58)	0,001*
Anemia hemolítica	15,3% (137)	28,1% (58)	0,001*
Leucopenia/linfopenia	38,7% (137)	57,9% (58)	0,001*
Plaquetopenia	19,7% (137)	21,1% (58)	0,908
Manifestações imunológicas	84,6% (137)	100% (58)	0,002
Anti-dsDNA	67,9% (137)	100% (58)	0,001*
Anti-Sm	32,9% (85)	25,6% (40)	0,277
Anticardiolipinas	43% (135)	42,1% (58)	0,999
Anticoagulante lúpico	10,2% (127)	18,2% (56)	0,022
VDRL falso-positivo	6,8% (132)	10,5% (58)	0,174
ANA	100% (137)	100% (58)	-
Anti-Ro/SSA	54,1% (111)	60,0% (51)	0,344
Anti-La/SSB	23,8% (105)	32,7% (50)	0,780
Anti-RNP	36,4% (77)	32,5% (41)	0,620
Síndrome de Sjögren	8,3% (133)	7,1% (57)	0,760
Síndrome antifosfolípídica	10,3% (136)	7,0% (58)	0,434
SLEDAI ^b	4 (0-5) (136)	4(2-8) (57)	0,002
Sedimento urinário ativo ^c	36,6% (134)	36,8% (58)	0,999
C3 (mg/dL±DP)	113,1±34,9 (133)	99,5±28,8 (58)	0,001*
C4 (mg/dL±DP)	21,3±10,9 (134)	16,1±8,8 (58)	0,001*

Abreviaturas: ANA (anticorpo antinuclear), DP (desvio-padrão), SLEDAI (*systemic lupus erythematosus disease activity index*), VDRL (*venereal disease research laboratory test*).

^aTeste Qui-quadrado para variáveis qualitativas e Mann-Whitney para variáveis quantitativas assimétricas ou t de Student para variáveis quantitativas simétricas. *Após ajuste por Bonferroni, *p* estatisticamente significativo se $\leq 0,001$.

^bMediana (intervalo interquartil).

^cDefinido pela presença de pelo menos 1 dos seguintes: piúria (leucócitos >5 /campo 400X, excluindo infecção); hematúria (hemácias ≥ 5 /campo 400X, excluindo infecções, litíase e outras causas); proteinúria (proteínas na urina $\geq +++$ ou índice proteinúria/creatininúria em amostra de urina $\geq 0,5$) ou cilindrúria (presença de cilindros granulosos ou hemáticos).

Tabela 2 Achados demográficos, clínicos e laboratoriais dos pacientes com IgG anti-dsDNA reagente versus pacientes com IgG+IgM anti-dsDNA reagente

Características avaliadas	IgG (n=43)	IgG + IgM (n=15)	p ^a
Gênero feminino	93% (43)	86,7% (15)	0,596
Idade (anos±DP)	40,6 ±13,3 (43)	43,13±12 (15)	0,518
Idade no diagnóstico (anos±DP)	29,7 ±12,4 (43)	31,2±10,2 (15)	0,554
Tempo de doença (anos±DP)	10,56±7,6 (43)	11,3 ±9,1 (15)	0,913
Eritema malar	65,1% (43)	60% (15)	0,966
Lúpus discóide	2,3% (43)	6,7% (15)	0,454
Fotossensibilidade	74,4% (43)	86,7% (15)	0,480
Úlceras orais/nasais	39,5% (43)	46,7% (15)	0,858
Artrite	72,1% (43)	80% (15)	0,736
Serosite	32,6% (43)	33,3% (15)	0,999
Nefrite	55,8% (43)	46,7% (15)	0,756
Manifestações neurológicas	20,9% (43)	6,7% (15)	0,427
Manifestações hematológicas	67,4% (43)	66,7 % (15)	0,999
Anti-Sm	28,6% (28)	16,7% (12)	0,693
Anticardiolipinas	41,9% (43)	40% (15)	0,999
Anticoagulante lúpico	17,1% (43)	20% (15)	0,999
VDRL falso-positivo	11,6% (43)	6,7% (15)	0,999
ANA	100% (43)	100% (15)	-
Anti-Ro/SSA	64,9% (37)	50% (14)	0,516
Anti-La/SSB	36,1% (36)	21,4% (14)	0,501
Anti-RNP	34,5% (29)	25% (12)	0,719
Síndrome de Sjögren	9,5% (42)	0% (15)	0,564
Síndrome antifosfolipídica	9,3% (43)	0% (15)	0,564
SLEDAI ^b	4 (2-6) (43)	2(1-8) (15)	0,361
Sedimento urinário ativo ^c	34,9% (43)	6,7% (15)	0,046
C3 (mg/dL±DP)	99,6±29,34 (43)	96,2±29,58 (15)	0,706
C4 (mg/dL±DP)	16±8,9 (43)	16,67±8,68 (15)	0,894

Abreviaturas: ANA (anticorpo antinuclear), DP (desvio-padrão), SLEDAI (*systemic lupus erythematosus disease activity index*), VDRL (*venereal disease research laboratory test*).

^aTeste Qui-quadrado para variáveis qualitativas e Mann-Whitney para variáveis quantitativas assimétricas ou t de Student para variáveis quantitativas simétricas.

^bMediana (intervalo interquartil).

^cDefinido pela presença de pelo menos 1 dos seguintes: piúria (leucócitos >5/campo 400 X, excluindo infecção); hematuria (hemácias ≥5/campo 400X, excluindo infecções, litíase ou outras causas); proteinúria (proteínas na urina ≥ +++ ou índice proteinúria/creatinúria em amostra de urina ≥0,5) ou cilindrúria (presença de cilindros granulosos ou hemáticos).

Tabela 3 Distribuição da proporção IgG/IgM^a de acordo com as manifestações clínicas e laboratoriais dos 15 pacientes com IgG+IgM anti-dsDNA reagente

Características avaliadas	Presente	Ausente	<i>p</i> ^b
Eritema malar	2 (1-8)	4 (1-7)	0,955
Eritema discóide	2 (2-2)	4 (1-8)	0,800
Fotossensibilidade	4 (1-8)	2 (1-4)	0,476
Úlceras orais/nasais	4 (2-8)	2 (1-8)	0,466
Artrite	4 (2-8)	1 (1-2)	0,070
Serosite	4 (1-6)	3 (1-8)	0,953
Nefrite	2 (1-4)	8 (1-8)	0,189
Manifestação neurológica	8 (8-8)	3 (1-8)	0,400
Manifestação hematológica	4 (1-8)	2 (1-5)	0,206
Anemia hemolítica	4 (2-7)	2 (1-8)	0,571
Leucopenia/linfopenia	4 (3-8)	1 (1-4)	0,066
Plaquetopenia	4 (1-8)	3 (1-8)	0,999
Manifestação imunológica	4 (1-8)	2 (2-2)	0,571
Anti-Sm	1 (1-16)	5 (2-8)	0,758
Anticardiolipina	3 (1-10)	4 (2-8)	0,689
Anticoagulante lúpico	4 (1-8)	3 (1-8)	0,999
VDRL falso positivo	1 (1-1)	4 (1-8)	0,267
ANA	4 (1-8)	NC*	-
Anti-Ro/SSA	4 (2-8)	4 (1-8)	0,383
Anti-La/SSB	2 (2-16)	4 (1-8)	0,885
Anti-RNP	8 (2-8)	4 (1-6)	0,373
Síndrome de Sjögren	NC*	4 (1-8)	-
Síndrome antifosfolipídica	NC*	4 (1-8)	-

Abreviaturas: ANA (anticorpo antinuclear); NC (não calculado); VDRL (*venereal disease research laboratory test*).

^aApresentada como mediana (intervalo interquartil).

^bMann-Whitney para variáveis quantitativas assimétricas.

*Não calculado devido à ausência deste achado em uma das colunas.

7 ARTIGO EM INGLÊS

**IgG AND IgM ANTI-dsDNA ISOTYPES IN PATIENTS WITH SYSTEMIC LUPUS
ERYTHEMATOSUS**

¹Briele Keiserman, ¹Maria Rita Ronchetti, ²Odirlei André Monticielo, ¹Henrique Luiz Staub

¹Rheumatology Department, Faculty of Medicine, São Lucas Hospital, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Brazil.

²Division of Rheumatology, Department of Internal Medicine, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil.

Correspondence address:

Briele Keiserman

Serviço de Reumatologia do Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul - PUCRS

Avenida Ipiranga, 6690, Sala 220, 2º andar, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

Zip Code 90160-090

Telephone/Fax: +55 51 3320 5057

E-mail: briele.k@gmail.com

Abstract

IgG anti-dsDNA antibodies are associated to lupus nephritis. Recent data suggest that IgM isotype is nephroprotector. We evaluated the frequency of IgG anti-dsDNA in patients with Systemic lupus erythemathosus (SLE) and its relation between IgG/IgM proportion and clinical manifestations of the disease. This transversal study included 137 SLE patients according to traditional criteria (92.5% female, 79.5% Caucasian) and 58 SLE individual (93.1% female, 81% Caucasian) selected by positivity for IgG anti-dsDNA. IgG and IgM anti-dsDNA antibodies were detected by *Chrithidia luciliae* indirect immunofluorescence with cut point 1/10 dilution. The presence of IgG anti-dsDNA was associated to the presence of hemolytic anemia, leukopenia/lymphopenia and Complement depletion ($p < 0.001$). Of the 58 patients positive for IgG anti-dsDNA 15 were also positive for IgM anti-dsDNA. The group presenting both isotypes showed significant less frequency of active urinary sediment when compared to isolated IgG anti-dsDNA (6.7% versus 34.9%, $p = 0.046$). IgG/IgM proportion distribution evidenced a trend of higher medians in the presence of arthritis and leukopenia/lymphopenia [4 (2-8) versus 1 (1-2), $p = 0.070$ and 4 (3-8) versus 1 (1-4), $p = 0.066$, respectively]. Summarizing, the frequency of IG anti-dsDNA was relevant in our casuistic. Positive subpopulation for both IgG/IgM isotypes anti-dsDNA was less willing to urinary sediment alterations than IgG anti-dsDNA isolated population. These data suggest a distinct biologic behavior for IgM anti-dsDNA.

Keywords: Systemic lupus erythemathosus, lupus nephritis, anti-dsDNA antibodies, IgG/IgM isotypes anti-dsDNA.

Background

Systemic lupus erythematosus is a chronic autoimmune inflammatory disease that affects multiple organs. Etiology involves genetic, immunological, hormonal and environment factors. SLE cannot be considered rare affection; according to Asiatic statistics, estimated prevalence is around 45 cases per 100.000 individuals [1]. It is particularly common in reproductive age women. It is characterized by the production of autoantibodies, especially against nuclear antigens, and by the formation of immune complexes [2].

Relating to pathogenesis, recent data show that exacerbated pro-inflammatory response seen on active SLE is related, at least partially, to a quantitative deficiency of T reg cells [3]. Recent data indicate that interleukine 17 is able to increase typical humoral responses of SLE by promoting the differentiation of B lymphocytes to plasma cells [4]. Lupus patients with high production of autoantibodies and active disease show decreased levels of 1.25 hydroxivitamin D3. This vitamin is able to inhibit the proliferation of B lymphocytes and to induce its apoptosis [5]. Activation of dendritic cells and increase of interferon- α were recently described on SLE [6]. Interferon- α can be a therapeutic target for monoclonal antibodies in patients with SLE in a near future [7].

Renal involvement is common in patients with SLE occurring in 50% of all cases [8]. Occurrence of lupus nephropathy determines morbidity and mortality increase. Anti-dsDNA (double stranded DNA) antibodies are generally associated with lupus nephropathy occurrence. Due to its specificity, the detection of anti-dsDNA antibodies is of great utility for SLE diagnoses. The titers frequently fluctuate according to disease activity level [9, 10].

Phatogenicity of anti-dsDNA antibody in SLE is complex. Tissue deposition level, isotype, affinity as well as ability to activate Complement and to occupy Fc receptors in cellular superficies are important variables for phatogenicity of this antibody; besides this, IgG isotypes anti-dsDNA antibodies can canalize nuclear antigens through cellular membrane leading to local inflammatory responses through prostaglandins and cytokines synthesis [11].

Due to its specificity, the detection of anti-dsDNA antibodies is of great utility for SLE diagnosis. The titers frequently fluctuate according to disease activity level. The IgG isotype is the most associated with nephritis [12, 13]. Lately, the pathogenic role for anti-nucleosome antibodies and anti-C1q was also documented [14, 15].

Present in 60 to 80% of SLE patient anti-dsDNA can be detected by indirect immunofluorescence (*Cristhidia luciliae* immunofluorescence - CLIF), Farr assay (radioimmunoassay) or immunoenzymatic test (ELISA) [16-18]. Although useful for disease activity follow up, anti-dsDNA antibodies can be detected in patients in disease remission. Under this circumstance, it postulates a simultaneous occurrence of IgM anti-dsDNA that could protect to active disease. IgM isotype is not tested routinely [16-18].

In this study, our goal is to evaluate the prevalence of anti-dsDNA IgG and its clinical associations in patients with SLE. In parallel, we compared clinical manifestations in patients with anti-dsDNA IgG positive with those of patients presenting both isotypes. Finally, we evaluated the proportion of IgG/IgM anti-dsDNA in the context of clinical and laboratorial variables.

Patients and methods

Population

This transversal study included two populations of patients with lupus disease regularly accompanied in the Ambulatory of SLE of Rheumatology Service of São Lucas Hospital of Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS): a global population and another selected based on the presence of IgG anti-dsDNA antibodies. Initial inclusion criteria were: minimal age of 16 years and to fill 4 or more of the 11 classification criteria of SLE according to ACR (American College Rheumatology) [19]. Parallel occurrence of Sjögren syndrome [20] and secondary anti-phospholipid syndrome (SAF) [21] was admitted for the casuistic of the study. All patients showing diffuse diseases of connective tissue were excluded as well as individuals with mental disease that could not sign free and explained consent form. The study was approved by

ethics committee of São Lucas Hospital of PUCRS (CEP 10/05241). Patients were recruited between January and July, 2011.

Variables

Clinical and laboratorial data were obtained using a standardized questionnaire applied at the day of appointment and by medical records review. The questionnaire included the following variables: presence or absence of malar rash, discoid lupus, photosensitivity, oral ulcers, serositis, arthritis, hematologic, renal and neurological manifestations and antibodies as antinuclear antibody (ANA), anti-dsDNA antibody by CLIF methodology, anti-Ro/SSA, anti-La/SSB, anticardiolipine antibodies, lupus anticoagulant and VDRL (Venereal disease research laboratory test). At the day of appointment, Complement (C3, C4) levels and urinary sediment were evaluated. For lupus disease activity quantification we used SLEDAI (Systemic lupus erythematosus Disease Activity Index). Twenty four variables included in nine organic systems were quantified in SLEDAI as follow: 8 for central nervous system; 4 for nephropathy and muscle-eskeletal alterations, 2 for serositis, dermatologic and immunological alterations and 1 for constitutional symptoms and hematological alterations. A SLEDAI higher than 4 was considered compatible to active disease [22].

Urinary sediment was considered active when at least one of the following alterations was present (according to SLEDAI): pyuria (leukocytes 5/field 400X, excluding infections), hematuria (red blood cells ≥ 5 /field 400X, excluding infections, lithiasis and other causes); proteinuria (proteins in urine $\geq +++$ or proteinuria/creatinuria in urine sample ≥ 0.5) or cilindruria (presence of granulous or hematic cylinders) [22]. The values considered normal for C3 and C4 were 88-165mg/dL and 14-44mg/dL, respectively [22]. A blood sample of each patient was collected for IgG and IgM anti-dsDNA tests at appointment day.

Evaluation of anti-dsDNA by CLIF

Peripheral blood samples were centrifuged and serum was collected and frozen in a maximum two hours after the collection in -20°C for posterior determination of IgG and IgM anti-

dsDNA. In our study, CLIF method was chosen to detect these antibodies. *Chritidiae luciliae* is a protozoan rich in double stranded DNA, whose cinetoplast have no other antigen within its cellular nucleus. Thus, the antibodies that reacted with cinetoplast were only directed against double stranded DNA. Tests were used according to manufacturer instructions (Euroimmun). Patient serum was incubated with antigenic substrate to allow specific binding of the autoantibody to cinetoplast DNA forming a stable antigen-antibody complex. Substrate was then incubated with anti-human IgG or IgM antibody conjugated to fluorescein, results were read using fluorescent microscopy [23, 24]. All samples were considered reagent for IgG or IgM anti-dsDNA if they presented titers $\geq 1/10$ [25].

Anti-dsDNA IgG/IgM proportion

The proportion between IgG and IgM anti-dsDNA titers was obtained in all IgM positive samples concomitant to IgG anti-dsDNA. As baseline, we used IgM anti-dsDNA titers and we considered how many times titers of an isotype was higher than the other. Thus, a patient that showed a proportion of 2 had IgG anti-dsDNA twice higher than IgM isotype titer. This way it was created an empiric balance between different isotypes with a harmonic proportion that correlates to anti-dsDNA quantity.

Statistical analysis

Descriptive analysis was done using mean and standard deviation (SD) for quantitative variables and frequency and percentage for categorical variables. Median and interquartil intervals were used to calculate variables with asymmetric distribution. Presence of IgG and IgM anti-dsDNA and proportion between titers of IgG and IgM anti-dsDNA were evaluated in the context of clinical and laboratorial manifestations showed by the patient. Chi-square (χ^2) test was used to categorical variables. Student's *t*- test was applied for quantitative variables with symmetric

distribution and Mann-Whitney test for asymmetric distribution variables. Data were analyzed using SPSS version 17.0. P value of <0.05 was considered statistically significant.

Results

Lupus population included 137 patients, of those 127 (92.7%) were female and 10 (7.3%) were male; 109 (79.5%) were Caucasian and 28 (20.5%) were not Caucasian. Mean age was 43.5 ± 13.2 years. At the moment of disease diagnosis mean age was 32.3 ± 11.7 years and mean length of disease was 10.72 ± 8.0 years. Median SLEDAI was 4 [0-5].

Second population of SLE of our study was composed by 58 select patients by the presence of positive test for IgG anti-dsDNA. Of these, 54(93.2%) were female and 4 were male (6.9%); 47 (81%) were Caucasian and 11 (19%) were not Caucasian. At the moment of disease diagnosis mean age was 29.9 ± 12.0 years and mean length of disease was 10.9 ± 8.0 years. Median SLEDAI was 4 [2-8].

Arbitrarily, in total population of 137 patients, positivity for IgG anti-dsDNA antibodies was considered if the antibody was detected at some point of the disease; Selected population (n=58) was chosen based on positive IgG anti-dsDNA test on the day of evaluation for the study.

Total SLE population comparison (137 cases, 67.9% positive for IgG anti-dsDNA) with the group selected by the presence of IgG anti-dsDNA (58 cases) revealed the following statistical differences: discoid lupus (8% versus 1.8%, $p=0.026$) and oral/nasal ulcers (56.9% versus 42.1%, $p=0.005$) were more frequent in global population when compared to the 58 patients positive for IgG anti-dsDNA. Differently, hematological manifestations (49.6% versus 68.4%, $p=0.001$), autoimmune hemolytic anemia (AIHA) (15.3% versus 28.1%, $p=0.001$), leukopenia/lymphopenia (38.7% versus 57.9%, $p=0.001$), lupus anticoagulant (10.2% versus 18.2%, $p=0.022$) and elevated SLEDAI were more frequent in the population with positive IgG anti-dsDNA. In total population C3 mean was 113.1 ± 34.9 mg/mL versus 99.5 ± 28.8 mg/mL for positive IgG anti-dsDNA population ($p=0.001$). C4 mean for total population was 21.3 ± 8.8 mg/mL versus 16.1 ± 8.8 mg/mL

for positive IgG anti-dsDNA ($p=0.001$). Positive IgG anti-dsDNA patients showed significant lower age at the beginning of the disease when compared to lupus general population. After Bonferroni adjustment the following variables remained significantly more frequent on positive anti-dsDNA population: AIHA, leukopenia/lymphopenia and C3 and C4 lower levels ($p<0.001$). These results are showed on table 1.

On the 58 samples positive for IgG anti-dsDNA tests for IgM anti-dsDNA, were performed. The relation between the presence of isolated IgG anti-dsDNA (43 cases) and IgG/IgM anti-dsDNA (15 cases) concomitant with clinical variables are shown on table 2. The group of patients with both isotypes showed, in a significant way, lower frequency of active urinary sediment in relation to other group (6.7% versus 34.9%, $p=0.046$). For other clinic-laboratorial variables there was no significant difference between groups.

Table 3 shows distribution of IgG/IgM anti-dsDNA proportion according to clinical and laboratorial manifestations of the 15 patients with both isotypes. The analysis of this distribution showed a tendency of IgG/IgM proportion more elevated in the presence of arthritis and leukopenia/lymphopenia (4[2-8] versus 1 [1-2], $p=0.07$ and 4 [3-8] versus 1[1-4], $p=0.066$, respectively).

Discussion

SLE is a disease of high complexity and genetic heterogeneity. Thus, studies in different populations contribute to greater understanding of its etiopathogenesis. Although anti-dsDNA antibodies are widely studied in lupus disease and its clinical associations (mainly nephropathy) are well known it is not possible to say the same about biological behavior of IgM anti-dsDNA isotype. This is one of the few recent studies approaching clinical association of this isotype [26].

In this transversal study we analyzed the associations between IgG anti-dsDNA isolated and IgG/IgM concomitant isotypes in relation to clinical and laboratorial manifestations of lupus patients in a tertiary hospital in the south of Brazil. Demographic data of SLE global population

(n=137) as well as on positive anti-dsDNA selected population (n=58) showed strong predominance of female gender and Caucasian race.

Absolute female predominance is according to literature [1]; data from the same authors indicated predominant involvement of no Caucasian race which is different of what we observed in our study. Corroborating our data, Chahade et al. documented high incidence of SLE in southeast Brazilian Caucasian [27]. Mean age of both studied populations (approximately 43 years) and disease beginning age (around 30 years) were according with previous published data in 2002 [28].

Our global population of lupus patients showed, for clinical and laboratorial manifestations, similar findings to the literature [29]. Comparing to a recent study developed in the south of Brazil [30], our data were similar except for hematological manifestations which showed lower frequency and for oral/nasal ulcers which we showed higher frequency. The prevalence of anti-dsDNA antibodies in our patients (67.9% of positivity in some moment of disease) was also corroborated by previous data [31].

When we compared clinical and laboratorial data of global population of SLE (32.1% negative for anti-dsDNA) with the 58 IgG anti-dsDNA patients selected by positivity (table 1) we observed some interesting data. The population selected for IgG anti-dsDNA positivity showed earlier disease beginning, which suggests that the presence of this auto-antibody is associated to early multi-organic disease. Interesting, discoid lupus and mucosal ulcers were less frequent in selected population when compared to global population, which shows that the presence of anti-dsDNA was not a marker of mucosal-cutaneous injuries in our casuistic.

In the other hand, hematological manifestations, AIHA, leukopenia/lymphopenia, lupus anticoagulant presence, increased SLEDAI and Complement depletion were more frequent in positive anti-dsDNA selected population. After Bonferroni correction the following variables remained more prevalent on selected population: hematological variables (AIHA/leukopenia/lymphopenia) and Complement depletion. It is possible to postulate, based on the last finding, that IgG anti-dsDNA antibodies of selected population are complement activators.

It is worth to mention, according to data from 1990, that the prevalence of IgG anti-dsDNA was strongly influenced by patient selection criteria and by the antibody detection method; highest prevalence of such antibodies was obtained in cases of nephritis and the lowest on neuropsychiatric SLE patients [32].

In the 58 IgG anti-dsDNA positive patients we compared clinical and laboratorial findings in the 43 IgG isolated and in the 15 IgG/IgM anti-dsDNA. For most of all clinical and laboratorial variables (mucosal-cutaneous, joint, hematologic, serous, neurologic, autoantibodies) there was no difference between both groups. Even taking in consideration the imparity of sample number between groups it seems that concomitant occurrence of IgM isotype inhibits the association effect of IgG anti-dsDNA with a high number of clinical and laboratorial findings.

Of importance, absence of IgM anti-dsDNA isotype and disease activity association (differently of IgG isotype which is associated to active disease and nephritis) were previously documented [2, 33-35]. According to data published in 1997, eventual increase of IgM anti-dsDNA levels was not predictive to lupus disease reactivation and it was not associated to specific manifestations [2]. In a Brazilian casuistic study published in 2009 there was no association between anti-dsDNA isotypes (IgG, IgM, IgA) and renal lupus [8]. According to data of 1986, no more reassured, the presence of IgA (but not IgM) anti-dsDNA was concomitant to IgG isotype (by CLIF or ELISA) in patients with active lupus disease including nephropathy [36]. In the comparison of the three tests for IgG anti-dsDNA detection (CLIF, ELISA and Farr test) the greatest specificity and sensibility was found on Farr test, according to Bootsma et al. [37].

All 15 patients of our study with both isotypes had significant lower frequency of active urinary sediment in relation to the patients with IgG anti-dsDNA isolated which is interesting by suggesting nephroprotection in this circumstance. In the only study in the literature that evaluated IgG/IgM ratio, from 2004, Forger et al. documented that a ratio of IgG/IgM under 0.8 on ELISA was protective for nephropathy in longitudinal analysis [12].

Median distribution of IgG/IgM proportion in the 15 cases did not revealed relevant clinical associations although the values of Mann-Whitney test, which is the proper test for asymmetric quantitative variables, were close to significance for arthritis and leukopenia/lymphopenia .

Our study shows limitations that should be emphasized. The study should have used, ideally, a single population of lupus patients in which all patients would be evaluated for both IgG/IgM anti-dsDNA, but it was not possible. Not all of the 137 patients in regular accompaniment in our SLE ambulatory agreed to collect blood sample which resulted in two populations. First population was evaluated by medical records data and the second population selected by positive test of IgG anti-dsDNA. Eventual tests for both isotypes in global population would permit inverse proportion calculation or even detected IgM isotype in the absence of IgG anti-dsDNA. The 58 patients positive for anti-dsDNA selected for IgM anti-dsDNA research showed more active and severe disease by a reference bias for tertiary center. Finally, IgG/IgM proportion calculus was, for the first time, obtained by CLIF but not by other concomitant method such as ELISA or Farr.

Summarizing, the prevalence of IgG anti-dsDNA was relevant (two third of the cases) in our global lupus population. The occurrence of anti-dsDNA was associated to hematologic lupus and Complement lower levels. Positive subpopulation for both IgG and IgM anti-dsDNA was less willing to urinary sediment alterations than isolated IgG anti-dsDNA population.

This study brings to discussion the utility of IgM isotype anti-dsDNA test (as an eventual protection factor to active disease) in parallel to IgG isotype. The role of IgG/IgM proportion in prognosis has to be elucidated. Biological behavior studies of these isotypes in bigger populations allow better comprehension of pathogenesis of antibodies driven against the DNA of lupus patients.

References

1. Jakes, RW, Bae, SC, Louthrenoo, W, Mok, CC, Navarra, SV, and Kwon, N, *Systematic review of the epidemiology of systemic lupus erythematosus in the Asia-Pacific region:*

- Prevalence, incidence, clinical features, and mortality.* Arthritis Care Res (Hoboken), 2012. **64**(2): p. 159-68.
2. Bootsma, H, Spronk, PE, Ter Borg, EJ, Hummel, EJ, de Boer, G, Limburg, PC, et al., *The predictive value of fluctuations in IgM and IgG class anti-dsDNA antibodies for relapses in systemic lupus erythematosus. A prospective long-term observation.* Ann Rheum Dis, 1997. **56**(11): p. 661-6.
 3. Kleczynska W, JB, Plutecka H, Milewski M, Sanak M, Musial J. , *Imbalance between Th17 and regulatory T-cells in systemic lupus erythematosus.* Folia Histochem Cytobiol., 2011. **49**(4): p. 646-53.
 4. Shin MS, LN, Kang I. , *Effector T-cell subsets in systemic lupus erythematosus: update focusing on Th17 cells. .* Curr Opin Rheumatol., 2011. **23**(5): p. 444-8.
 5. Chen, S, Sims, GP, Chen, XX, Gu, YY, Chen, S, and Lipsky, PE, *Modulatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on human B cell differentiation.* J Immunol, 2007. **179**(3): p. 1634-47.
 6. Ronnblom, L and Pascual, V, *The innate immune system in SLE: type I interferons and dendritic cells.* Lupus, 2008. **17**(5): p. 394-9.
 7. Crow, MK, *Interferon-alpha: a therapeutic target in systemic lupus erythematosus.* Rheum Dis Clin North Am, 2010. **36**(1): p. 173-86, x.
 8. Atta, AM, Pereira, MM, Santiago, M, and Sousa-Atta, ML, *Anti-dsDNA antibodies in Brazilian patients of mainly African descent with systemic lupus erythematosus: lack of association with lupus nephritis.* Clin Rheumatol, 2009. **28**(6): p. 693-7.
 9. Borchers, AT, Keen, CL, Shoenfeld, Y, and Gershwin, ME, *Surviving the butterfly and the wolf: mortality trends in systemic lupus erythematosus.* Autoimmun Rev, 2004. **3**(6): p. 423-53.
 10. Cervera, R, Khamashta, MA, Font, J, Sebastiani, GD, Gil, A, Lavilla, P, et al., *Morbidity and mortality in systemic lupus erythematosus during a 10-year period: a comparison of*

- early and late manifestations in a cohort of 1,000 patients. Medicine (Baltimore), 2003. 82(5): p. 299-308.*
11. Munoz, LE, Gaipal, US, and Herrmann, M, *Predictive value of anti-dsDNA autoantibodies: importance of the assay. Autoimmun Rev, 2008. 7(8): p. 594-7.*
 12. Forger, F, Matthias, T, Oppermann, M, Becker, H, and Helmke, K, *Clinical significance of anti-dsDNA antibody isotypes: IgG/IgM ratio of anti-dsDNA antibodies as a prognostic marker for lupus nephritis. Lupus, 2004. 13(1): p. 36-44.*
 13. Werwitzke, S, Trick, D, Kamino, K, Matthias, T, Kniesch, K, Schlegelberger, B, et al., *Inhibition of lupus disease by anti-double-stranded DNA antibodies of the IgM isotype in the (NZB x NZW)F1 mouse. Arthritis Rheum, 2005. 52(11): p. 3629-38.*
 14. van der Vlag, J and Berden, JH, *Lupus nephritis: role of antinucleosome autoantibodies. Semin Nephrol, 2011. 31(4): p. 376-89.*
 15. Trendelenburg, M, *Antibodies against C1q in patients with systemic lupus erythematosus. Springer Semin Immunopathol, 2005. 27(3): p. 276-85.*
 16. Hahn, BH, *Antibodies to DNA. N Engl J Med, 1998. 338(19): p. 1359-68.*
 17. Heidenreich, U, Mayer, G, Herold, M, Klotz, W, Stempfl Al-Jazrawi, K, and Lhotta, K, *Sensitivity and specificity of autoantibody tests in the differential diagnosis of lupus nephritis. Lupus, 2009. 18(14): p. 1276-80.*
 18. Isenberg, DA, Manson, JJ, Ehrenstein, MR, and Rahman, A, *Fifty years of anti-ds DNA antibodies: are we approaching journey's end? Rheumatology (Oxford), 2007. 46(7): p. 1052-6.*
 19. Hochberg, M, *Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum Vol. 40. 1997. 1725.*
 20. Vitali, C, Bombardieri, S, Jonsson, R, Moutsopoulos, HM, Alexander, EL, Carsons, SE, et al., *Classification criteria for Sjogren's syndrome: a revised version of the European*

- criteria proposed by the American-European Consensus Group. Ann Rheum Dis, 2002. 61(6): p. 554-8.*
21. Miyakis, S, Lockshin, MD, Atsumi, T, Branch, DW, Brey, RL, Cervera, R, et al., *International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). J Thromb Haemost, 2006. 4(2): p. 295-306.*
 22. Bombardier, C, Gladman, DD, Urowitz, MB, Caron, D, and Chang, CH, *Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE. Arthritis Rheum, 1992. 35(6): p. 630-40.*
 23. Crowe, W, Kushner, I, Clough, JD, and Vignos, PJ, Jr., *Comparison of the Crithidia lucilia, millipore filter, Farr, and hemagglutination methods for detection of antibodies to DNA. Arthritis Rheum, 1978. 21(3): p. 390-1.*
 24. Smeenk, R, van der Lelij, G, and Aarden, L, *Avidity of antibodies to dsDNA: comparison of IFT on Crithidia luciliae, Farr assay, and PEG assay. J Immunol, 1982. 128(1): p. 73-8.*
 25. Wiik, AS, *Anti-nuclear autoantibodies: clinical utility for diagnosis, prognosis, monitoring, and planning of treatment strategy in systemic immunoinflammatory diseases. Scand J Rheumatol, 2005. 34(4): p. 260-8.*
 26. Sinico RA, BB, Sabadini E, Di Toma L, Radice A., *The use of laboratory tests in diagnosis and monitoring of systemic lupus erythematosus. . J Nephrol., 2002. 15(6): p. S20-7.*
 27. Chahade, WH, Sato, EI, Moura, JE, Jr., Costallat, LT, and Andrade, LE, *Systemic lupus erythematosus in Sao Paulo/Brazil: a clinical and laboratory overview. Lupus, 1995. 4(2): p. 100-3.*
 28. Petri, M, *Epidemiology of systemic lupus erythematosus. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2002. 16(5): p. 847-58.*
 29. D'Cruz, DP, Khamashta, MA, and Hughes, GR, *Systemic lupus erythematosus. Lancet, 2007. 369(9561): p. 587-96.*

30. Monticielo, OA, Chies, JA, Mucenic, T, Rucatti, GG, Junior, JM, da Silva, GK, et al., *Mannose-binding lectin gene polymorphisms in Brazilian patients with systemic lupus erythematosus*. *Lupus*, 2010. **19**(3): p. 280-7.
31. Rahman, A and Isenberg, DA, *Systemic lupus erythematosus*. *N Engl J Med*, 2008. **358**(9): p. 929-39.
32. Swaak, AJ, Huysen, V, Nossent, JC, and Smeenk, RJ, *Antinuclear antibody profiles in relation to specific disease manifestations of systemic lupus erythematosus*. *Clin Rheumatol*, 1990. **9**(1 Suppl 1): p. 82-94.
33. Witte, T, Hartung, K, Sachse, C, Matthias, T, Fricke, M, Deicher, H, et al., *IgM anti-dsDNA antibodies in systemic lupus erythematosus: negative association with nephritis*. *SLE Study Group. Rheumatol Int*, 1998. **18**(3): p. 85-91.
34. Okamura, M, Kanayama, Y, Amastu, K, Negoro, N, Kohda, S, Takeda, T, et al., *Significance of enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for antibodies to double stranded and single stranded DNA in patients with lupus nephritis: correlation with severity of renal histology*. *Ann Rheum Dis*, 1993. **52**(1): p. 14-20.
35. Krippner, H, Merle, S, Jorgens, K, and Pirlet, K, *Antibodies to dsDNA and ssDNA in the immunoglobulin classes IgG and IgM: prognostic value in the course of SLE*. *Z Rheumatol*, 1984. **43**(5): p. 265-71.
36. Gripenberg M, HT, *Anti-DNA antibodies of IgA class in patients with systemic lupus erythematosus*. *Rheumatol Int.*, 1986. **6**(2): p. 53-5.
37. Bootsma, H, Spronk, PE, Hummel, EJ, de Boer, G, ter Borg, EJ, Limburg, PC, et al., *Anti-double stranded DNA antibodies in systemic lupus erythematosus: detection and clinical relevance of IgM-class antibodies*. *Scand J Rheumatol*, 1996. **25**(6): p. 352-9.

Table 1 Cumulative demographic, clinical and laboratorial findings of patients

Evaluated characteristics	Total (n=137)	Selected patients for positive IgG anti-dsDNA (n=58)	<i>p</i> value ^a
Female gender	92.5% (137)	93.1% (58)	0.999
Age (years±SD)	43.5±13.2 (136)	42.8±14.7 (58)	0.530
Age at diagnostic (years±SD)	32.3±11.7 (137)	29.95±12.0 (58)	0.010
Length of disease (years±SD)	10.72±8.0 (137)	10.9±8.0 (57)	0.718
Malar rash	60.6% (137)	63.2% (58)	0.732
Discoid rash	8.0% (137)	1.8% (58)	0.026
Photosensitivity	82.5% (137)	77.2% (58)	0.252
Nasal/oral ulcers	56.9% (137)	42.1% (58)	0.005
Arthritis	78.1% (137)	75.4% (58)	0.670
Serositis	31.4% (137)	33.3% (58)	0.820
Nephritis	44.5% (137)	54.4% (58)	0.074
Neurological manifestation	16.8% (137)	17.5% (58)	0.999
Hematological manifestation	49.6% (137)	68.4 % (58)	0.001*
Hemolytic anemia	15.3% (137)	28.1% (58)	0.001*
Leucopenia/Lymphopenia	38.7% (137)	57.9% (58)	0.001*
Plateletopenia	19.7% (137)	21.1% (58)	0.908
Immunological manifestation	84.6% (137)	100% (58)	0.002
Anti-dsDNA	67.9% (137)	100% (58)	0.001*
Anti-Sm	32.9% (85)	25.6% (40)	0.277
Anticardiolipine antibodies	43% (135)	42.1% (58)	0.999
Lupus anticoagulant	10.2% (127)	18.2% (56)	0.022
False positive VDRL	6.8% (132)	10.5% (58)	0.174
ANA	100% (137)	100% (58)	-
Anti-Ro/SSA	54.1% (111)	60.0% (51)	0.344
Anti-La/SSB	23.8% (105)	32.7% (50)	0.780
Anti-RNP	36.4% (77)	32.5% (41)	0.620
Sjögren syndrome	8.3% (133)	7.1% (57)	0.760
Antiphospholipid syndrome	10.3% (136)	7.0% (58)	0.434
SLEDAI ^b	4 (0-5) (136)	4(2-8) (57)	0.002
Active urinary sediment ^c	36.6% (134)	36.8% (58)	0.999
C3 (mg/dL±SD)	113.1±34.9 (133)	99.5±28.8 (58)	0.001*
C4 (mg/dL±SD)	21.3±10.9 (134)	16.1±8.8 (58)	0.001*

Abbreviations: ANA (antinuclear antibody), SD (standard deviation), SLEDAI (systemic lupus erythemathosus disease activity index), VDRL (venereal disease research laboratory test).

^aChi square test for qualitative variables and Mann-Whitney *U* test for asymmetric quantitative variables or Student's *t* test for symmetric quantitative variables. *After Bonferroni adjustment, *p* value statistically significant if ≤0.001.

^bMedian (interquartile interval).

^cDefined by the presence of at least one of the following conditions: pyuria (leucocytes >5/field 400X, excluding infection); hematuria (red blood cells ≥5/field 400X, excluding infection, lithiasis and other causes); proteinuria (proteins in urine ≥+++ or proteinuria/creatinuria index in urine sample ≥0.5) or cylindruria (presence of granular or hematic cylinders).

Table 2 Cumulative demographic, clinical and laboratorial findings of patients reagent for IgG anti-dsDNA versus reagent IgG+IgM anti-dsDNA

Evaluated characteristics	IgG (n=43)	IgG+IgM (n=15)	<i>p</i> value ^a
Female gender	93% (43)	86.7% (15)	0.596
Age (years±SD)	40.6±13.3 (43)	43.1±12 (15)	0.518
Age at diagnostic (years±SD)	29.7±12.4 (43)	32.1±10.2 (15)	0.554
Length of disease (years±SD)	10.56±87.6 (43)	11.3±9.1 (15)	0.913
Malar rash	65.1% (43)	60% (15)	0.966
Discoid rash	2.3% (43)	6.7% (15)	0.454
Photosensitivity	74.4% (43)	86.7% (15)	0.480
Nasal/oral ulcers	39.5% (43)	46.7% (15)	0.858
Arthritis	72.1% (43)	80% (15)	0.736
Serositis	32.6% (43)	33.3% (15)	0.999
Nephritis	55.8% (43)	46.7% (15)	0.756
Neurological manifestation	20.9% (43)	6.7% (15)	0.427
Hematological manifestation	67.4%(43)	66.7 % (15)	0.999
Anti-Sm	28.6% (28)	16.7% (12)	0.693
Anticardiolipine antibodies	41.9% (43)	40% (15)	0.999
Lupus anticoagulant	17.1% (43)	20% (15)	0.999
False positive VDRL	11.6% (43)	6.7% (15)	0.999
ANA	100% (43)	100% (15)	-
Anti-Ro/SSA	64.9% (37)	50.0% (14)	0.516
Anti-La/SSB	36.1% (36)	21.4% (14)	0.501
Anti-RNP	34.5% (29)	25% (12)	0.719
Sjögren syndrome	9.5% (42)	0% (15)	0.564
Antiphospholipid syndrome	9.3% (43)	0% (15)	0.564
SLEDAI ^b	4 (2-6) (43)	2 (1-8) (15)	0.361
Active urinary sediment ^c	34.9% (43)	6.7% (15)	0.046
C3 (mg/dL±SD)	99.6±29.3 (43)	96.2±29.58 (15)	0.706
C4 (mg/dL±SD)	16±8.9 (43)	16.67±8.68 (15)	0.894

Abbreviations: ANA (antinuclear antibody), SD (standard deviation), SLEDAI (systemic lupus erythemathosus disease activity index), VDRL (venereal disease research laboratory test).

^aChi square test for qualitative variables and Mann-Whitney *U* test for asymmetric quantitative variables or Student's *t* test for symmetric quantitative variables.

^bMedian (interquartile interval).

^cDefined by the presence of at least one of the following conditions: pyuria (leucocytes >5/field 400X, excluding infection); hematuria (red blood cells ≥5/field 400X, excluding infection, lithiasis and other causes); proteinuria (proteins in urine ≥+++ or proteinuria/creatinuria index in urine sample ≥0.5) or cylindruria (presence of granular or hematic cylinders).

Table 3 Distribution of IgG/IgM^a proportion according to clinical and laboratorial manifestations of the 15 patients with IgG+IgM anti-dsDNA reagent

Evaluated characteristics	Presence	Absence	<i>p</i> value ^b
Malar rash	2 (1-8)	4 (1-7)	0.955
Discoid rash	2 (2-2)	4 (1-8)	0.800
Photosensitivity	4 (1-8)	2 (1-4)	0.476
Nasal/Oral ulcers	4 (2-8)	2 (2-8)	0.466
Arthritis	4 (2-8)	1 (1-2)	0.070
Serositis	4 (1-6)	3 (1-8)	0.953
Nephritis	2 (1-4)	8 (1-8)	0.189
Neurological manifestation	8 (8-8)	3 (1-8)	0.400
Hematological manifestation	4 (1-8)	2 (1-5)	0.206
Hemolytic anemia	4 (2-7)	2 (1-8)	0.571
Leucopenia/Lymphopenia	4 (3-8)	1 (1-4)	0.066
Plateletopenia	4 (1-8)	3 (1-8)	0.999
Immunological manifestation	4 (1-8)	2 (2-2)	0.571
Anti-Sm	1 (1-16)	5 (2-8)	0.758
Anticardiolipine antibodies	3 (1-10)	4 (2-8)	0.689
Lupus anticoagulant	4 (1-8)	3 (1-8)	0.999
False positive VDRL	1 (1-1)	4 (1-8)	0.267
ANA	4 (1-8)	NC*	-
Anti-Ro/SSA	4 (2-8)	4 (1-8)	0.383
Anti-La/SSB	2 (2-16)	4 (1-8)	0.885
Anti-RNP	8 (2-8)	4 (1-6)	0.373
Sjögren syndrome	NC*	4 (1-8)	-
Antiphospholipid syndrome	NC*	4 (1-8)	-

Abbreviations: ANA (anti-nuclear antibody); NC (not calculated); VDRL (venereal disease research laboratory test).

^aMedian presentation (interquartile interval).

^bMann-Whitney *U* test for asymmetric quantitative variables.

*Not calculated due to missing finding in one of the columns.

8 ARTIGO SUBMETIDO

12-Feb-2012

Dear Dr. Keiserman:

Your manuscript entitled "IgG and IgM anti-dsDNA isotypes in patients with systemic lupus erythematosus" has been successfully submitted online. The next step is for your paper to be checked by the Managing Editor before being passed on to the Editor for consideration for publication in Clinical Rheumatology.

Your manuscript ID is CR-02-2012-0105.

Important notice to authors of CASE REPORTS:

The Editors of Clinical Rheumatology have recently made the decision to cease publishing case reports in their present format.

We are looking for cases of extreme clinical interest which stimulate a mini review in an area of new knowledge.

The new selection criteria for submissions will be 'Case Based Review': and only case reports of novel clinical interest incorporating a mini review in an area of new knowledge. Word limit is 3500, with no more than 50 references and 5 figures/tables.

If you have not already done so, you will need to fill out the Authorship and disclosure form. This must be received by the Editorial Office before your manuscript can go any further through the review process. Failure to send a form will result in your paper being delayed. The form can either be scanned and uploaded to the site at the time of submission (this is the preferred method) or faxed to the office on +44 114 285 1813. The form will need to be signed by all authors, and cannot be signed on their behalf.

Please quote the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to Manuscript Central at <https://mc.manuscriptcentral.com/cr> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <https://mc.manuscriptcentral.com/cr>.

Thank you for submitting your manuscript to Clinical Rheumatology.

Sincerely,

Clinical Rheumatology Editorial Office

Original Article

IgG and IgM anti-dsDNA isotypes in patients with systemic lupus erythematosus

¹Briele Keiserman, ¹Maria Rita Ronchetti, ²Odirlei André Monticelo, ¹Henrique Luiz Staub

¹Rheumatology Department, Faculty of Medicine, Hospital São Lucas, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Brazil.

²Division of Rheumatology, Department of Internal Medicine, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil.

Correspondence address:

Briele Keiserman

Serviço de Reumatologia do Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul - PUCRS

Avenida Ipiranga, 6690, Sala 220, 2º andar, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

Zip Code 90160-090

Telephone/Fax: +55 51 3320 5057

E-mail: briele.k@gmail.com

Abstract

IgG anti-dsDNA antibodies are associated to lupus nephritis. Recent data suggest that IgM isotype is nephroprotector. We evaluated the frequency of IgG anti-dsDNA in patients with systemic lupus erythematosus lupus (SLE) and its relation between IgG/IgM proportion and clinical manifestations of the disease. This transversal study included 137 SLE patients according to traditional criteria (92.5% female, 79.5% Caucasian) and 58 SLE individual (93.1% female, 81% Caucasian) selected by positivity for IgG anti-dsDNA. IgG and IgM anti-dsDNA antibodies were detected by *Crithidia luciliae* indirect immunofluorescence with cut point 1/10 dilution. The presence of IgG anti-dsDNA was associated to the presence of hemolytic anemia, leukolymphopenia and Complement lower levels ($p < 0.001$). Of the 58 patients positive for IgG anti-dsDNA 15 were also positive for IgM anti-dsDNA. The group presenting both isotypes showed significant less frequency of active urinary sediment when compared to isolated IgG anti-dsDNA (6.7% versus 34.9%, $p = 0.046$). IgG/IgM proportion distribution evidenced a trend of higher medians in the presence of arthritis and leukolymphopenia [4(2-8) versus 1 (1-2), $p = 0.070$ and 4 (3-8) versus 1 (1-4), $p = 0.066$, respectively]. Summarizing, the frequency of IG anti-dsDNA was relevant in our casuistic. Positive subpopulation for both IgG/IgM isotypes anti-dsDNA was less willing to urinary sediment alterations than IgG anti-dsDNA isolated population. These data suggest a distinct biologic behavior for IgM anti-dsDNA.

Keywords: systemic lupus erythematosus, lupus nephritis, anti-dsDNA antibodies, IgG/IgM isotypes anti-dsDNA.

Introduction

Systemic lupus erythematosus is a chronic autoimmune inflammatory disease that affects multiple organs. Etiology involves genetic, immunological, hormonal and environment factors. SLE cannot be considered rare affection; according to Asiatic statistics, estimated prevalence is around 45 cases per 100.000 individuals [1]. It is particularly common in reproductive age women. It is characterized by the production of autoantibodies, especially against nuclear antigens, and by the formation of immune complexes [2].

Relating to pathogenesis, recent data show that exacerbated pro-inflammatory response seen on active SLE is associated, at least partially, to a quantitative deficiency of T-reg cells [3]. Recent data indicate that interleukine 17 is able to increase typical humoral responses of SLE by promoting the differentiation of B lymphocytes to plasma cells [4]. Lupus patients with high production of autoantibodies and active disease show decreased levels of 1.25 hydroxivitamin D3. This vitamin is able to inhibit the proliferation of B lymphocytes and to induce its apoptosis [5]. Activation of dendritic cells and increase of interferon- α were recently described on SLE [6]. Interferon- α can be a therapeutic target for monoclonal antibodies in patients with SLE in a near future [7].

Renal involvement is common in patients with SLE occurring in 50% of all cases [8]. Occurrence of lupus nephropathy determines morbidity and mortality increase. Anti-dsDNA (double stranded DNA) antibodies are generally associated with lupus nephropathy occurrence. Due to its specificity, the detection of anti-dsDNA antibodies is of great utility for SLE diagnoses. The titers frequently fluctuate according to disease activity level [9, 10].

Phatogenicity of anti-dsDNA antibody in SLE is complex. Tissue deposition level, isotype, affinity as well as ability to activate Complement and to occupy Fc receptors in cellular superficies are important variables for phatogenicity of this antibody; besides this, IgG isotypes anti-dsDNA antibodies can canalize nuclear antigens through cellular membrane leading to local inflammatory responses through prostaglandins and cytokines synthesis [11].

Due to its specificity, the detection of anti-dsDNA antibodies is of great utility for SLE diagnosis. The titers frequently fluctuate according to disease activity level. The IgG isotype is the most associated with nephritis [12,13]. Lately, the pathogenic role for anti-nucleosome antibodies and anti-C1q was also documented [14,15].

Present in 60 to 80% of SLE patient anti-dsDNA can be detected by indirect immunofluorescence (*Chrithidia luciliae* immunofluorescence - CLIF), Farr assay (radioimmunoassay) or immunoenzimatic test (ELISA) [16-18]. Although useful for disease activity follow up, anti-dsDNA antibodies can be detected in patients in disease remission. Under this circumstance, it postulates a simultaneous occurrence of IgM anti-dsDNA that could protect to active disease. IgM isotype is not tested routinely [16-18].

In this study, our goal is to evaluate the prevalence of anti-dsDNA IgG and its clinical associations in patients with SLE. In parallel, we compared clinical manifestations in patients with anti-dsDNA IgG positive with those of

patients presenting both isotypes. Finally, we evaluated the proportion of IgG/IgM anti-dsDNA in the context of clinical and laboratorial variables.

Materials and methods

Population

This transversal study included two populations of patients with lupus disease regularly accompanied in the Ambulatory of SLE of Rheumatology Service of Hospital São Lucas of Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS): a global population and another selected based on the presence of IgG anti-dsDNA antibodies. Initial inclusion criteria were: minimal age of 16 years and to fill 4 or more of the 11 classification criteria of SLE according to ACR (American College Rheumatology) [19]. Parallel occurrence of Sjögren syndrome [20] and secondary antiphospholipid syndrome (SAF) [21] was admitted for the casuistic of the study. All patients showing diffuse diseases of connective tissue were excluded as well as individuals with mental disease that could not sign free and explained consent form. The study was approved by ethics committee of Hospital São Lucas of PUCRS. Patients were recruited between January and July, 2011.

Variables

Clinical and laboratorial data were obtained using a standardized questionnaire applied at the day of appointment and by medical records review. The questionnaire included the following variables: presence or absence of malar rash, discoid lupus, photosensitivity, oral ulcers, serositis, arthritis, hematologic, renal and neurological manifestations and antibodies as antinuclear antibody (ANA), anti-dsDNA antibody by CLIF methodology, anti-Ro/SSA, anti-La/SSB, anticardiolipine antibodies (IgM and IgG), lupus anticoagulant and VDRL (venereal disease research laboratory test). At the day of appointment, Complement (C3, C4) levels and urinary sediment were evaluated. For lupus disease activity quantification we used SLEDAI (systemic lupus erythematosus disease activity index) [22].

Urinary sediment was considered active when at least one of the following alterations was present (according to SLEDAI): pyuria (leukocytes 5/field 400X, excluding infections), hematuria (red blood cells ≥ 5 /field 400X, excluding infections, lithiasis and other causes); proteinuria (proteins in urine $\geq +++$ or proteinuria/creatinuria in urine sample ≥ 0.5) or cilinduria (presence of granulous or hematic cylinders) [22]. The values considered normal for C3 and C4 were 88-165mg/dL and 14-44mg/dL, respectively [22]. A blood sample of each patient was collected for IgG and IgM anti-dsDNA tests at appointment day.

Evaluation of anti-dsDNA by *Chrithidia luciliae* immunofluorescence

Peripheral blood samples were centrifuged and serum was collected and frozen in a maximum two hours after the collection in -20°C for posterior determination of IgG and IgM anti-dsDNA. In our study, CLIF method was chosen

to detect these antibodies. *Chroithidiae luciliae* is a protozoan rich in double stranded DNA, whose cinetoplast have no other antigen within its cellular nucleus. Thus, the antibodies that reacted with cinetoplast were only directed against double stranded DNA. Tests were used according to manufacturer instructions (Euroimmun). Patient serum was incubated with antigenic substrate to allow specific binding of the autoantibody to cinetoplast DNA forming a stable antigen-antibody complex. Substrate was then incubated with anti-human IgG or IgM antibody conjugated to fluorescein, results were read using fluorescent microscopy [23, 24]. All samples were considered reagent for IgG or IgM anti-dsDNA if they presented titers $\geq 1/10$ [25].

Anti-dsDNA IgG/IgM proportion

The proportion between IgG and IgM anti-dsDNA titers was obtained in all IgM positive samples concomitant to IgG anti-dsDNA. As baseline, we used IgM anti-dsDNA titers and we considered how many times titers of an isotype was higher than the other. Thus, a patient that showed a proportion of 2 had IgG anti-dsDNA twice higher than IgM isotype titer. This way it was created an empiric balance between different isotypes with a harmonic proportion that correlates to anti-dsDNA quantity.

Statistical analysis

Descriptive analysis was done using mean and standard deviation (SD) for quantitative variables and frequency and percentage for categorical variables. Median and interquartil intervals were used to calculate variables with asymmetric distribution. Presence of IgG and IgM anti-dsDNA and proportion between titers of IgG and IgM anti-dsDNA were evaluated in the context of clinical and laboratorial manifestations showed by the patient. Chi-square (χ^2) test was used to categorical variables. Student *t* test was applied for quantitative variables with symmetric distribution and Mann-Whitney *U* test for asymmetric distribution variables. Data were analyzed using SPSS version 17.0. P value of <0.05 was considered statistically significant.

Results

Lupus population included 137 patients, of those 127 (92.7%) were female and 10 (7.3%) were male; 109 (79.5%) were Caucasian and 28 (20.5%) were not Caucasian. Mean age was 43.5 ± 13.2 years. At the moment of disease diagnosis, mean age was 32.3 ± 11.7 years and mean length of disease was 10.72 ± 8.0 years. Median SLEDAI was 4 [0-5].

Second population of SLE of our study was composed by 58 select patients by the presence of positive test for IgG anti-dsDNA. Of these, 54(93.2%) were female and 4 were male (6.9%); 47 (81%) were Caucasian and 11 (19%) were not Caucasian. At the moment of disease diagnosis, mean age was 29.9 ± 12.0 years and mean length of disease was 10.9 ± 8.0 years. Median SLEDAI was 4 [2-8].

Arbitrarily, in total population of 137 patients, positivity for IgG anti-dsDNA antibodies was considered if the antibody was detected at some point of the disease. Selected population (n=58) was chosen based on positive IgG anti-dsDNA test on the day of evaluation for the study.

Total SLE population comparison (137 cases, 67.9% positive for IgG anti-dsDNA) with the group selected by the presence of IgG anti-dsDNA (58 cases) revealed the following statistical differences: discoid lupus (8% versus 1.8%, $p=0.026$) and oral/nasal ulcers (56.9% versus 42.1%, $p=0.005$) were more frequent in global population when compared to the 58 patients positive for IgG anti-dsDNA. Differently, hematological manifestations (49.6% versus 68.4%, $p=0.001$), autoimmune hemolytic anemia (AIHA) (15.3% versus 28.1%, $p=0.001$), leukopenia/lymphopenia (38.7% versus 57.9%, $p=0.001$), lupus anticoagulant (10.2% versus 18.2%, $p=0.022$) and elevated SLEDAI were more frequent in the population with positive IgG anti-dsDNA. In total population, C3 mean was 113.1 ± 34.9 mg/mL versus 99.5 ± 28.8 mg/mL for positive IgG anti-dsDNA population ($p=0.001$). C4 mean for total population was 21.3 ± 8.8 mg/mL versus 16.1 ± 8.8 mg/mL for positive IgG anti-dsDNA ($p=0.001$). Positive IgG anti-dsDNA patients showed significant lower age at the beginning of the disease when compared to lupus general population. After Bonferroni adjustment, the following variables remained significantly more frequent on positive anti-dsDNA population: AIHA, leukopenia/lymphopenia and C3 and C4 lower levels ($p<0.001$). These results are showed on table 1.

On the 58 samples positive for IgG anti-dsDNA, tests for IgM anti-dsDNA were performed. The comparison between the presence of isolated IgG anti-dsDNA (43 cases) and IgG and IgM anti-dsDNA (15 cases) concomitant with clinical variables are shown on table 2. The group of patients with both isotypes showed, in a significant way, lower frequency of active urinary sediment in relation to other group (6.7% versus 34.9%, $p=0.046$). For other clinical and laboratorial variables there was no significant difference between groups.

Table 3 shows distribution of IgG/IgM anti-dsDNA proportion according to clinical and laboratorial manifestations of the 15 patients with both isotypes. The analysis of this distribution showed a tendency of IgG/IgM proportion more elevated in the presence of arthritis and leukopenia/lymphopenia (4 [2-8] versus 1 [1-2], $p=0.07$ and 4 [3-8] versus 1 [1-4], $p=0.066$, respectively).

Discussion

SLE is a disease of high complexity and genetic heterogeneity. Thus, studies in different populations contribute to greater understanding of its etiopathogenesis. Although anti-dsDNA antibodies are widely studied in lupus disease and its clinical associations (mainly nephropathy) are well known it is not possible to say the same about biological behavior of IgM anti-dsDNA isotype. This is one of the few recent studies approaching clinical association of this isotype [26].

In this transversal study, we analyzed the associations between IgG anti-dsDNA isolated and IgG/IgM concomitant isotypes in relation to clinical and laboratorial manifestations of lupus patients in a tertiary hospital in the south of Brazil. Demographic data of SLE global population (n=137) as well as on positive anti-dsDNA selected population (n=58) showed strong predominance of female gender and Caucasian race.

Absolute female predominance is according to literature [1]; data from the same authors indicated predominant involvement of no Caucasian race which is different of what we observed in our study. Corroborating our data, Chahade et al. documented high incidence of SLE in southeast Brazilian Caucasian [27]. Mean age of both studied populations (approximately 43 years) and disease beginning age (around 30 years) were according with previous published data in 2002 [28].

Our global population of lupus patients showed, for clinical and laboratorial manifestations, similar findings to the literature [29]. Comparing to a recent study developed in the south of Brazil [30], our data were similar, except for hematological manifestations which showed lower frequency and for oral/nasal ulcers which we showed higher frequency. The prevalence of anti-dsDNA antibodies in our patients (67.9% of positivity in some moment of disease) was also corroborated by previous data [31].

When we compared clinical and laboratorial data of global population of SLE (32.1% negative for anti-dsDNA) with the 58 IgG anti-dsDNA patients selected by positivity (table 1) we observed some interesting data. The population selected for IgG anti-dsDNA positivity showed earlier disease beginning, which suggests that the presence of this autoantibody is associated to early multi-organic disease. Interesting, discoid lupus and mucosal ulcers were less frequent in selected population when compared to global population, which shows that the presence of anti-dsDNA was not a marker of mucosal-cutaneous injuries in our casuistic.

In the other hand, hematological manifestations, AIHA, leukopenia/lymphopenia, lupus anticoagulant presence, increased SLEDAI and Complement lower levels were more frequent in positive anti-dsDNA selected population. After Bonferroni adjustment, the following variables remained more prevalent on selected population: hematological variables (AIHA/ leukopenia/lymphopenia) and Complement lower levels. It is possible to postulate, based on the last finding, that IgG anti-dsDNA antibodies of selected population are complement activators. It is worth to mention, according to data from 1990, that the prevalence of IgG anti-dsDNA was strongly influenced by patient selection criteria and by the antibody detection method; highest prevalence of such antibodies was obtained in cases of nephritis and the lowest on neuropsychiatric SLE patients [32].

In the 58 IgG anti-dsDNA positive patients we compared clinical and laboratorial findings in the 43 IgG isolated and in the 15 IgG/IgM anti-dsDNA. For most of all clinical and laboratorial variables (mucosal-cutaneous, joint, hematologic, serous, neurologic, autoantibodies) there was no difference between both groups. Even taking in

consideration the imparity of sample number between groups it seems that concomitant occurrence of IgM isotype inhibits the association effect of IgG anti-dsDNA with a high number of clinical and laboratorial findings.

Of importance, absence of IgM anti-dsDNA isotype and disease activity association (differently of IgG isotype which is associated to active disease and nephritis) were previously documented [2, 33-35]. According to data published in 1997, eventual increase of IgM anti-dsDNA levels was not predictive to lupus disease reactivation and it was not associated to specific manifestations [2]. In a Brazilian casuistic study published in 2009 there was no association between anti-dsDNA isotypes (IgG, IgM, IgA) and renal lupus [8]. According to data of 1986, no more reassured, the presence of IgA (but not IgM) anti-dsDNA was concomitant to IgG isotype (by CLIF or ELISA) in patients with active lupus disease including nephropathy [36]. In the comparison of the three tests for IgG anti-dsDNA detection (CLIF, ELISA and Farr test), the greatest specificity and sensibility was found on Farr test, according to Bootsma et al. [37].

All 15 patients of our study with both isotypes had significant lower frequency of active urinary sediment, when compared to patients with IgG anti-dsDNA isolated, suggesting nephroprotection in this circumstance. In the only study in the literature that evaluated IgG/IgM ratio, from 2004, Forger et al. documented that a ratio of IgG/IgM under 0.8 on ELISA was protective for nephropathy in longitudinal analysis [12].

Median distribution of IgG/IgM proportion in the 15 cases did not revealed relevant clinical associations although the values of Mann-Whitney *U* test, which is the proper test for asymmetric quantitative variables, were close to significance for arthritis and leukolymphopenia.

Our study shows limitations that should be emphasized. The study should have used, ideally, a single population of lupus patients in which all patients would be evaluated for both IgG/IgM anti-dsDNA, but it was not possible. Not all of the 137 patients in regular accompaniment in our SLE ambulatory agreed to collect blood sample which resulted in two populations. First population was evaluated by medical records data and the second population selected by positive test of IgG anti-dsDNA. Eventual tests for both isotypes in global population would permit inverse proportion calculation or even detected IgM isotype in the absence of IgG anti-dsDNA. The 58 patients positive for anti-dsDNA selected for IgM anti-dsDNA research showed more active and severe disease by a reference bias for tertiary center. Finally, IgG/IgM proportion calculus was, for the first time, obtained by CLIF but not by other concomitant method such as ELISA or Farr.

Summarizing, the prevalence of IgG anti-dsDNA was relevant (two third of the cases) in our global lupus population. The occurrence of anti-dsDNA was associated to hematologic lupus and Complement lower levels. Positive subpopulation for both IgG and IgM anti-dsDNA was less willing to urinary sediment alterations than isolated IgG anti-dsDNA population.

Conclusions

This study brings to discussion the utility of IgM isotype anti-dsDNA test (as an eventual protection factor to active disease) in parallel to IgG isotype. The role of IgG/IgM proportion in prognosis has to be elucidated. Biological behavior studies of these isotypes in bigger populations allow better comprehension of pathogenesis of antibodies driven against the DNA of lupus patients.

Acknowledgements

This study was financially supported by funds from CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

Conflicts of interests

None.

References

1. Jakes RW, Bae SC, Louthrenoo W, Mok CC, Navarra S and Kwon N (2012) Systematic review of the epidemiology of systemic lupus erythematosus in the Asia-Pacific region: Prevalence, incidence, clinical features, and mortality. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 64(2):159-68.
2. Bootsma H, Spronk PE, Ter Borg EJ, Hummel EJ, de Boer G, Limburg PC, et al (1997) The predictive value of fluctuations in IgM and IgG class anti-dsDNA antibodies for relapses in systemic lupus erythematosus. A prospective long-term observation. *Ann Rheum Dis* 56(11):661-6.
3. Kleczynska W, Jakiela B, Plutecka H, Milewski M, Sanak M, Musial J, et al (2011) Imbalance between Th17 and regulatory T-cells in systemic lupus erythematosus. *Folia Histochem Cytobiol* 49(4):646-53.
4. Shin MS, Lee N and Kang I (2011) Effector T-cell subsets in systemic lupus erythematosus: update focusing on Th17 cells. *Curr Opin Rheumatol* 23(5):444-8.
5. Chen S, Sims GP, Chen XX, Gu YY, Chen S and Lipsky PE (2007) Modulatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on human B cell differentiation. *J Immunol* 179(3):1634-47.
6. Ronnblom L and Pascual V (2008) The innate immune system in SLE: type I interferons and dendritic cells. *Lupus* 17(5):394-9.
7. Crow MK (2010) Interferon-alpha: a therapeutic target in systemic lupus erythematosus. *Rheum Dis Clin North Am* 36(1):173-86.

8. Atta AM, Pereira MM, Santiago M and Sousa-Atta ML (2009) Anti-dsDNA antibodies in Brazilian patients of mainly African descent with systemic lupus erythematosus: lack of association with lupus nephritis. *Clin Rheumatol* 28(6):693-7.
9. Borchers AT, Keen CL, Shoenfeld Y and Gershwin ME (2004) Surviving the butterfly and the wolf: mortality trends in systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev* 3(6): 423-53.
10. Cervera R, Khamashta MA, Font J, Sebastiani GD, Gil A, Lavilla P, et al (2003) Morbidity and mortality in systemic lupus erythematosus during a 10-year period: a comparison of early and late manifestations in a cohort of 1,000 patients. *Medicine (Baltimore)* 82(5):299-308.
11. Munoz LE, Gaipl US and Herrmann M (2008) Predictive value of anti-dsDNA autoantibodies: importance of the assay. *Autoimmun Rev* 7(8):594-7.
12. Forger F, Matthias T, Oppermann M, Becker H and Helmke K (2004) Clinical significance of anti-dsDNA antibody isotypes: IgG/IgM ratio of anti-dsDNA antibodies as a prognostic marker for lupus nephritis. *Lupus* 13(1):36-44.
13. Werwitzke S, Trick D, Kamino K, Matthias T, Kniesch K, Schlegelberger B, et al (2005) Inhibition of lupus disease by anti-double-stranded DNA antibodies of the IgM isotype in the (NZB x NZW)F1 mouse. *Arthritis Rheum* 52(11):3629-38.
14. van der Vlag J and Berden JH (2011) Lupus nephritis: role of antinucleosome autoantibodies. *Semin Nephrol* 31(4):376-89.
15. Trendelenburg M (2005) Antibodies against C1q in patients with systemic lupus erythematosus. *Springer Semin Immunopathol* 27(3):276-85.
16. Hahn BH (1998) Antibodies to DNA. *N Engl J Med* 338(19):1359-68.
17. Heidenreich U, Mayer G, Herold M, Klotz W, Stempfl Al-Jazrawi K and Lhotta K (2009) Sensitivity and specificity of autoantibody tests in the differential diagnosis of lupus nephritis. *Lupus* 18(14):1276-80.
18. Isenberg DA, Manson JJ, Ehrenstein MR and Rahman A (2007) Fifty years of anti-ds DNA antibodies: are we approaching journey's end? *Rheumatology (Oxford)* 46(7):1052-6.
19. Hochberg M (1997) Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 40: 1725.
20. Vitali C, Bombardieri S, Jonsson R, Moutsopoulos HM, Alexander EL, Carsons SE, et al (2002) Classification criteria for Sjogren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. *Ann Rheum Dis* 61(6):554-8.

21. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R, et al (2006)International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost* 4(2):295-306.
22. Bombardier C, Gladman DD, Urowitz MB, Caron D and Chang CH (1992) Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE. *Arthritis Rheum* 35(6):630-40.
23. Crowe W, Kushner I, Clough JD and Vignos PJ (1978) Comparison of the Crithidia lucilia, millipore filter, Farr, and hemagglutination methods for detection of antibodies to DNA. *Arthritis Rheum* 21(3):390-1.
24. Smeenk R, van der Lelij G and Aarden L (1982) Avidity of antibodies to dsDNA: comparison of IFT on Crithidia luciliae, Farr assay, and PEG assay. *J Immunol* 128(1):73-8.
25. Wiik AS (2005) Anti-nuclear autoantibodies: clinical utility for diagnosis, prognosis, monitoring, and planning of treatment strategy in systemic immunoinflammatory diseases. *Scand J Rheumatol* 34(4):260-8.
26. Sinico RA, Sabadini E, Di Toma L, Radice A (2002) The use of laboratory tests in diagnosis and monitoring of systemic lupus erythematosus. *J Nephrol* 15(6):S20-7.
27. Chahade WH, Sato EI, Moura JE, Costallat LT and Andrade LE (1995) Systemic lupus erythematosus in Sao Paulo/Brazil: a clinical and laboratory overview. *Lupus* 4(2):100-3.
28. Petri M (2002) Epidemiology of systemic lupus erythematosus. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 16(5):847-58.
29. D'Cruz DP, Khamashta MA and Hughes GR (2007) Systemic lupus erythematosus. *Lancet* 369(9561):587-96.
30. Monticielo OA, Chies JA, Mucenic T, Rucatti GG, Junior JM, da Silva GK, et al (2010) Mannose-binding lectin gene polymorphisms in Brazilian patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 19(3):280-7.
31. Rahman A and Isenberg DA (2008) Systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 358(9):929-39.
32. Swaak AJ, Huysen V, Nossent JC and Smeenk, RJ (1990) Antinuclear antibody profiles in relation to specific disease manifestations of systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol* 9(1 Suppl 1):82-94.
33. Witte T, Hartung K, Sachse C, Matthias T, Fricke M, Deicher H, et al (1998) IgM anti-dsDNA antibodies in systemic lupus erythematosus: negative association with nephritis. SLE Study Group. *Rheumatol Int* 18(3):85-91.
34. Okamura M, Kanayama Y, Amastu K, Negoro N, Kohda S, Takeda T, et al (1993) Significance of enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for antibodies to double stranded and single stranded DNA in patients with lupus nephritis: correlation with severity of renal histology. *Ann Rheum Dis* 52(1):14-20.
35. Krippner H, Merle S, Jorgens K and Pirlet K (1984) Antibodies to dsDNA and ssDNA in the immunoglobulin classes IgG and IgM: prognostic value in the course of SLE. *Z Rheumatol* 43(5):265-71.

36. Gripenberg M, Helve T (1986) Anti-DNA antibodies of IgA class in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int* 6(2):53-5.
37. Bootsma H, Spronk PE, Hummel EJ, de Boer G, ter Borg EJ, Limburg PC, et al (1996) Anti-double stranded DNA antibodies in systemic lupus erythematosus: detection and clinical relevance of IgM-class antibodies. *Scand J Rheumatol* 25(6):352-9.

Table 1 Cumulative demographic, clinical and laboratorial findings of patients

Evaluated characteristics	Total (n=137)	Selected patients for positive IgG anti-dsDNA (n=58)	<i>p</i> value ^a
Female gender	92.5% (137)	93.1% (58)	0.999
Age (years±SD)	43.5±13.2 (136)	42.8±14.7 (58)	0.530
Age at diagnostic (years±SD)	32.3±11.7 (137)	29.95±12.0 (58)	0.010
Length of disease (years±SD)	10.72±8.0 (137)	10.9±8.0 (57)	0.718
Malar rash	60.6% (137)	63.2% (58)	0.732
Discoid rash	8.0% (137)	1.8% (58)	0.026
Photosensitivity	82.5% (137)	77.2% (58)	0.252
Nasal/oral ulcers	56.9% (137)	42.1% (58)	0.005
Arthritis	78.1% (137)	75.4% (58)	0.670
Serositis	31.4% (137)	33.3% (58)	0.820
Nephritis	44.5% (137)	54.4% (58)	0.074
Neurological manifestation	16.8% (137)	17.5% (58)	0.999
Hematological manifestation	49.6% (137)	68.4% (58)	0.001*
Hemolytic anemia	15.3% (137)	28.1% (58)	0.001*
Leucopenia/Lymphopenia	38.7% (137)	57.9% (58)	0.001*
Plateletopenia	19.7% (137)	21.1% (58)	0.908
Immunological manifestation	84.6% (137)	100% (58)	0.002
Anti-dsDNA	67.9% (137)	100% (58)	0.001*
Anti-Sm	32.9% (85)	25.6% (40)	0.277
Anticardiolipine antibodies	43% (135)	42.1% (58)	0.999
Lupus anticoagulant	10.2% (127)	18.2% (56)	0.022
False positive VDRL	6.8% (132)	10.5% (58)	0.174
ANA	100% (137)	100% (58)	-
Anti-Ro/SSA	54.1% (111)	60.0% (51)	0.344
Anti-La/SSB	23.8% (105)	32.7% (50)	0.780
Anti-RNP	36.4% (77)	32.5% (41)	0.620
Sjögren syndrome	8.3% (133)	7.1% (57)	0.760
Antiphospholipid syndrome	10.3% (136)	7.0% (58)	0.434
SLEDAI ^b	4 (0-5) (136)	4(2-8) (57)	0.002
Active urinary sediment ^c	36.6% (134)	36.8% (58)	0.999
C3 (mg/dL±SD)	113.1±34.9 (133)	99.5±28.8 (58)	0.001*
C4 (mg/dL±SD)	21.3±10.9 (134)	16.1±8.8 (58)	0.001*

Abbreviations: ANA (antinuclear antibody), SD (standard deviation), SLEDAI (systemic lupus erythemathosus disease activity index), VDRL (venereal disease research laboratory test).

^aChi square test for qualitative variables and Mann-Whitney *U* test for asymmetric quantitative variables or Student's *t* test for symmetric quantitative variables. *After Bonferroni adjustment, *p* value statistically significant if ≤0.001.

^bMedian (interquartile interval).

^cDefined by the presence of at least one of the following conditions: pyuria (leucocytes >5/field 400X, excluding infection); hematuria (red blood cells ≥5/field 400X, excluding infection, lithiasis and other causes); proteinuria (proteins in urine ≥+++ or proteinuria/creatinuria index in urine sample ≥0.5) or cylindruria (presence of granular or hematic cylinders).

Table 2 Cumulative demographic, clinical and laboratorial findings of patients reagent for IgG anti-dsDNA versus reagent IgG+IgM anti-dsDNA

Evaluated characteristics	IgG (n=43)	IgG+IgM (n=15)	<i>p</i> value ^a
Female gender	93% (43)	86.7% (15)	0.596
Age (years±SD)	40.6±13.3 (43)	43.1±12 (15)	0.518
Age at diagnostic (years±SD)	29.7±12.4 (43)	32.1±10.2 (15)	0.554
Length of disease (years±SD)	10.56±87.6 (43)	11.3±9.1 (15)	0.913
Malar rash	65.1% (43)	60% (15)	0.966
Discoid rash	2.3% (43)	6.7% (15)	0.454
Photosensitivity	74.4% (43)	86.7% (15)	0.480
Nasal/oral ulcers	39.5% (43)	46.7% (15)	0.858
Arthritis	72.1% (43)	80% (15)	0.736
Serositis	32.6% (43)	33.3% (15)	0.999
Nephritis	55.8% (43)	46.7% (15)	0.756
Neurological manifestation	20.9% (43)	6.7% (15)	0.427
Hematological manifestation	67.4% (43)	66.7% (15)	0.999
Anti-Sm	28.6% (28)	16.7% (12)	0.693
Anticardiolipine antibodies	41.9% (43)	40% (15)	0.999
Lupus anticoagulant	17.1% (43)	20% (15)	0.999
False positive VDRL	11.6% (43)	6.7% (15)	0.999
ANA	100% (43)	100% (15)	-
Anti-Ro/SSA	64.9% (37)	50.0% (14)	0.516
Anti-La/SSB	36.1% (36)	21.4% (14)	0.501
Anti-RNP	34.5% (29)	25% (12)	0.719
Sjögren syndrome	9.5% (42)	0% (15)	0.564
Antiphospholipid syndrome	9.3% (43)	0% (15)	0.564
SLEDAI ^b	4 (2-6) (43)	2 (1-8) (15)	0.361
Active urinary sediment ^c	34.9% (43)	6.7% (15)	0.046
C3 (mg/dL±SD)	99.6±29.3 (43)	96.2±29.58 (15)	0.706
C4 (mg/dL±SD)	16±8.9 (43)	16.67±8.68 (15)	0.894

Abbreviations: ANA (antinuclear antibody), SD (standard deviation), SLEDAI (systemic lupus erythemathosus disease activity index), VDRL (venereal disease research laboratory test).

^aChi square test for qualitative variables and Mann-Whitney *U* test for asymmetric quantitative variables or Student's *t* test for symmetric quantitative variables.

^bMedian (interquartile interval).

^cDefined by the presence of at least one of the following conditions: pyuria (leucocytes >5/field 400X, excluding infection); hematuria (red blood cells ≥5/field 400X, excluding infection, lithiasis and other causes); proteinuria (proteins in urine ≥+++ or proteinuria/creatinuria index in urine sample ≥0.5) or cylindruria (presence of granular or hematic cylinders).

Table 3 Distribution of IgG/IgM^a proportion according to clinical and laboratorial manifestations of the 15 patients with IgG+IgM anti-dsDNA reagent

Evaluated characteristics	Presence	Absence	<i>p</i> value ^b
Malar rash	2 (1-8)	4 (1-7)	0.955
Discoid rash	2 (2-2)	4 (1-8)	0.800
Photosensitivity	4 (1-8)	2 (1-4)	0.476
Nasal/Oral ulcers	4 (2-8)	2 (2-8)	0.466
Arthritis	4 (2-8)	1 (1-2)	0.070
Serositis	4 (1-6)	3 (1-8)	0.953
Nephritis	2 (1-4)	8 (1-8)	0.189
Neurological manifestation	8 (8-8)	3 (1-8)	0.400
Hematological manifestation	4 (1-8)	2 (1-5)	0.206
Hemolytic anemia	4 (2-7)	2 (1-8)	0.571
Leucopenia/Lymphopenia	4 (3-8)	1 (1-4)	0.066
Plateletopenia	4 (1-8)	3 (1-8)	0.999
Immunological manifestation	4 (1-8)	2 (2-2)	0.571
Anti-Sm	1 (1-16)	5 (2-8)	0.758
Anticardiolipine antibodies	3 (1-10)	4 (2-8)	0.689
Lupus anticoagulant	4 (1-8)	3 (1-8)	0.999
False positive VDRL	1 (1-1)	4 (1-8)	0.267
ANA	4 (1-8)	NC*	-
Anti-Ro/SSA	4 (2-8)	4 (1-8)	0.383
Anti-La/SSB	2 (2-16)	4 (1-8)	0.885
Anti-RNP	8 (2-8)	4 (1-6)	0.373
Sjögren syndrome	NC*	4 (1-8)	-
Antiphospholipid syndrome	NC*	4 (1-8)	-

Abbreviations: ANA (anti-nuclear antibody); NC (not calculated); VDRL (venereal disease research laboratory test).

^aMedian presentation (interquartile interval).

^bMann–Whitney *U* test for asymmetric quantitative variables.

*Not calculated due to missing finding in one of the columns.

9 ANEXOS

9.1 ANEXO I

Crterios Diagnsticos do Lpus Eritematoso Sistmico

1. Eritema malar

Eritema fixo, plano ou elevado, nas eminncias malares, tendendo a poupar a regio nasolabial.

2. Lpus Discóide

Placas eritematosas elevadas, ocorrendo cicatrizaço atrfica nas lesões antigas.

3. Fotossensibilidade

Eritema cutneo resultante de reaçao incomum ao sol, por histria do paciente ou observao do mdico.

4. Úlcera oral

Ulcerao oral ou nasofarngica, geralmente no dolorosa, observada pelo mdico.

5. Artrite

Artrite no – erosiva, envolvendo 2 ou mais articulaes perifricas caracterizada por dor à palpaço, edema ou derrame.

6. Serosite

(a) pleurite – histria convincente de dor pleurtica ou atrito auscultado pelo mdico ou evidncia de derrame pleural.

ou

(b) pericardite – documentada por ECG ou atrito ou evidncia de derrame pericrdico.

7. Alterao renal

(a) proteinria persistente >0,5g por dia ou >3+ se no quantificada.

ou

(b) cilindros celulares: podem ser hematolgico, granular, tubular ou misto.

8. Alterao neurolgica

(a) convulsão – na ausência de drogas implicadas ou alterações metabólicas conhecidas (ex. uremia, cetoacidose, distúrbios hidroeletrólíticos).

ou

(b) psicose - na ausência de drogas implicadas ou alterações metabólicas conhecidas (ex. uremia, cetoacidose, distúrbios hidroeletrólíticos).

9. Alteração hematológica

(a) anemia hemolítica – com reticulocitose.

ou

(b) leucopenia – $< 4000/\text{mm}^3$ total em 2 ou mais ocasiões.

ou

(c) linfopenia – $< 1500/\text{mm}^3$ em 2 ou mais ocasiões.

ou

(d) trombocitopenia – $< 100\ 000/\text{mm}^3$ na ausência de drogas causadoras.

10. Alteração imunológica

(a) anti-DNA – anticorpo ao DNA nativo em títulos anormais.

ou

(b) Anti-Sm – presença do anticorpo ao antígeno nuclear Sm.

ou

(c) Achados positivos de anticorpos antifosfolípidos baseados em (1) concentração sérica anormal de anticardiolipina IgG ou IgM, (2) teste positivo para anticoagulante lúpico usando teste-padrão ou (3) VDRL falso positivo por pelo menos 6 meses e confirmado por FTA-Abs.

11. Anticorpo antinuclear (FAN)

Título anormal do FAN por imunofluorescência ou método equivalente em qualquer momento, na ausência de drogas sabidamente associadas ao lúpus induzido por drogas.

Para fins de classificação de doença, o (a) paciente deve apresentar ao menos 4 dos 11 critérios.

9.2 ANEXO II

Protocolo de Acompanhamento do Ambulatório de LES - PUCRS

Dados dos pacientes

Nome: _____

Prontuário: N° neste protocolo: Data de Nascimento:

Sexo: __ F __ M Raça: __Branco __ Não Branco

Profissão:

Estado civil: Naturalidade: Procedência:

Endereço:

Cidade: CEP: Telefones de contato:

Início dos sintomas:

Data do diagnóstico:

Manifestações iniciais no diagnóstico:

Início do acompanhamento no HSL-PUCRS:

Óbito: Causa:

Critérios para LES (ACR 1997)

___ 1 Eritema malar

___ 2 Eritema discóide

___ 3 Fotossensibilidade

___ 4 Úlceras Orais/nasais

___ 5 Artrite

___ 6 Serosite Pleurite __ Pericardite__

___ 7 Doença renal: Biópsia:

___ 8 Doença neurológica: Psicose__ Convulsão__

___ 9 Hematológico: AHAI __ Leucopenia __ Linfopenia __ Plaquetopenia __

___ 10 FAN: Titulação: _____ Padrão: _____

___ 11 Imunológico:

anti-DNA titulação: Método:

aCL : IgG ___ IgM ___ IgA ___

Anticoagulante lúpico:

VDRL:

Doenças e hábitos associados

HAS

Tabagismo:

DM:

Etilismo:

Dislipidemia:

Obesidade:

Evento cardiovascular:

SAAF:

S. de Sjögren:

HF: DCV ___ LES ___ Outros _____

História Obstétrica: G ___ P ___ C ___ A ___

DAIs/ Sobreposições: _____

Anti – ENA: _____

Mantoux: _____ Quimioprofilaxia: _____

Tratamento Realizado

___ Corticóide:

___ Anticoncepcional:

___ Pulsoterapia:

___ Terapia de reposição hormonal:

___ Cloroquina/Hidroxicloroquina:

AAS:

___ Azatioprina:

Anticoagulante:

___ Micofenolato Mofetil:

Anti-hipertensivos:

___ Ciclofosfamida:

Estatina:

___ Metotrexate:

Outros:

___ Dapsona:

___ Rituximabe:

___ Cálcio + Vitamina D:

___ Bifosfonados:

___ Danazol:

___ Ciclosporina:

Observações: _____

9.3 ANEXO III

Protocolo de avaliação de atividade de doença - SLEDAI

Identificação

Nome: _____

Registro: _____

Pesquisador: _____ Data: _____

ESCORE	ITEM
8	Convulsão
8	Psicose
8	Sd. cerebral orgânica
8	Visual
8	Nervos cranianos
8	Cefaléia lúpica
8	AVC
8	Vasculite
4	Artrite
4	Miosite
4	Cilindros
4	Hematúria
4	Proteinúria
4	Piúria
2	Eritema malar novo
2	Alopecia
2	Membranas mucosas
2	Pleurite
2	Pericardite
2	Baixos complementos
2	Anti- DNA
1	Febre
1	Trombocitopenia
1	Leucopenia
	TOTAL

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

ESTUDO DA RELAÇÃO IgG/IgM ANTI-dsDNA EM PACIENTES COM LÚPUS
ERITEMATOSO SISTÊMICO

POR QUE ESTE ESTUDO ESTÁ SENDO REALIZADO?

Os portadores de Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) apresentam acometimento dos rins em até metade dos casos. Este estudo está sendo realizado para tentar identificar se o marcador IgG/IgM anti-dsDNA tem relação com lesão renal ou com outras manifestações clínicas e laboratoriais nos pacientes com LES.

DE QUE CONSTA O ESTUDO?

Mediante consentimento do paciente, será coletada uma amostra de 05 ml de sangue que será destinada à dosagem do anticorpo anti-dsDNA.

QUAIS SÃO AS VANTAGENS DA PARTICIPAR NESTE ESTUDO?

1. Avaliar a influência deste marcador em pacientes com LES.
2. Colaborar para o avanço e progresso do conhecimento sobre o LES.

QUAIS SÃO AS DESVANTAGENS DA PARTICIPAÇÃO NESTE ESTUDO?

1. Realizar punção venosa para coleta de sangue, que pode causar dor temporária e coleção de sangue na pele (equimose ou hematoma).
2. Responder algumas perguntas sobre sua doença durante a consulta médica de rotina.

HÁ A POSSIBILIDADE DE ESTE ESTUDO CONTINUAR?

Este estudo foi planejado para encerrar em dezembro de 2012 e para avaliar a relação IgG/IgM do anticorpo anti-dsDNA no LES. No entanto, é possível que outros fatores relacionados ao LES possam ser analisados futuramente. Para tal, o paciente, através de um novo contato com a equipe pesquisadora, deverá autorizar novamente o uso da amostra já coletada e o novo projeto

deverá ser avaliado pela Comissão de Ética em Pesquisa da instituição. Outra possibilidade é a de um novo contato com o paciente em 5 ou 10 anos para verificar a evolução da doença.

DADOS RELATIVOS À PROTEÇÃO DO PACIENTE

- A. Os dados coletados neste estudo são confidenciais, e não serão revelados dados que permitam identificar os pacientes em hipótese alguma.
- B. A adesão ao estudo é voluntária, ou seja, cada paciente é livre para decidir não participar.
- C. A decisão de não participar não interferirá no acompanhamento normal dos pacientes no ambulatório, na emergência nem na internação do Hospital São Lucas da PUCRS.
- D. O paciente é livre para desistir em qualquer momento do estudo, sem necessidade de fornecer justificativa.

COMPREENSÃO E AUTORIZAÇÃO

Tendo compreendido as informações do presente termo de consentimento e concordado com elas, permito que os dados desta pesquisa sejam utilizados para o ESTUDO DA RELAÇÃO IgG/IgM ANTI-dsDNA EM PACIENTES COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO.

Paciente: _____

Registro: _____ Assinatura: _____

Pesquisador: _____

Assinatura do pesquisador: _____

Porto Alegre, ____ de _____ de 20 ____.

Pesquisador responsável:

Dra. Briele Keiserman (051) 3320.3000 ramal 2368

Dr. Henrique Luiz Staub (051) 3339.1622

Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital São Lucas da PUCRS (051) 3320.3345