PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA MÉDICA E CIÊNCIAS DA SAÚDE
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ANTICORPOS ANTI-HSP90

E

LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO

ESTER ROSÁRI RAPHAELLI DAL BEN

Porto Alegre, 2010.

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA MÉDICA E CIÊNCIAS DA SAÚDE
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ANTICORPOS ANTI-HSP90 E LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO

Ester Rosári Raphaelli Dal Ben

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul para obtenção do título de Mestre em Clínica Médica

Orientador: Prof. Dr. Henrique L. Staub

Porto Alegre, janeiro de 2010.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)

D136a Dal Ben, Ester Rosári Raphaelli
Anticorpos anti-Hsp90 e lúpus eritematoso sistêmico/Ester Rosári Raphaelli Dal Ben. Porto Alegre: PUCRS, 2010.
161 p.: il. tab.

Orientador: Prof. Dr. Henrique Luiz Staub.

Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica. Área de concentração: Clínica Médica.

1. PROTEINAS DE CHOQUE TÉRMICO 90. 2. LUPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO. 3. ANTICORPOS. 4. ESTUDOS TRANSVERSAIS. I. Staub, Henrique Luiz. II.Título.

C.D.D. 616.079.34
C.D.U. 616.51: 612.75 (043.3)
N.L.M. WD 380

Rosária Maria Lúcia Prenna Geremia
Bibliotecária CRB 10/196

Ao meu marido, César Roglio Flores, pelo amor de todos
estes anos, pelo carinho e cuidado de cada dia.
Pelo incentivo e apoio sem os quais este sonho
não se teria tornado realidade.
Aos meus pais, Colvis Dalbem (in memoriam) e
Angelina Raphaelli Dalbem, por terem, desde sempre,
mostrado-me que a educação é o primeiro passo
para grandes realizações.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Professor Doutor Henrique L. Staub, pelo incentivo, pela paciência e, sobretudo, pelas preciosas orientações durante estes anos.

Ao Serviço de Reumatologia do Hospital São Lucas – PUCRS, por viabilizar minha pesquisa através da aquisição do material utilizado neste trabalho.

À direção e funcionários do Laboratório Metanalysis – Porto Alegre, pela ajuda e apoio durante a realização dos exames laboratoriais deste projeto.

Aos pacientes do Serviço de Reumatologia do Hospital São Lucas da PUCRS e voluntários de Arroio dos Ratos - RS que participaram desta pesquisa.

Às minhas colegas de mestrado e doutorado - Márcia Kopschina, Rosecler Franco, Rose Mary Pinheiro, Carina Rossoni, Norlai Azevedo e Fernanda Bastos - pela amizade e companheirismo durante estes anos.

Às Professoras, Drª. Maria Helena Itaqui Lopes e Drª. Maria Martha Campos, pelo incentivo e apoio.

Ao Dr. Mário Wagner, pela precisão na análise estatística dos dados deste trabalho.

Ao Prof. Rodrigo Baptista – ULBRA São Jerônimo – pela ajuda e apoio.

À srª Maria de Lourdes Dias, do Serviço de Reumatologia do Hospital São Lucas- PUCRS, pela simpatia, cordialidade e colaboração.

"Nenhuma mente que se abre para uma nova idéia voltará a ter o tamanho original".

Albert Einstein

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Critérios do Colégio Americano de Reumatologia para classificação do LES 17

Tabela 2: Fatores de Risco genético para o LES..... 19

Tabela 3: Autoanticorpos no LES..... 24

Tabela 4: Sintomas do LES 28

Tabela 5: Síndromes neuropsiquiátricas do LES 38

Tabela 6: Índice de atividade da doença - LES 2000 SLEDAI 2K..... 41

Tabela 7: Condições que induzem a expressão das Hsps 45

Tabela 8: Principais grupos de Hsps..... 47

Tabela 9: Localização genômica das Hsps..... 46

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Localização intracelular de diferentes membros das famílias de Hsp70 e Hsp90 em células eucarióticas 51

Figura 2: Esquema dos domínios estruturais da Hsp90 em leveduras.....53

Figura 3: Esquema do atual modelo para a mudança conformacional que se produz ao ligar-se o ATP a Hsp90.....55

LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS DO ARTIGO

Tabela 1: Dados demográficos dos pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES) total, LES ativo, LES inativo e controles.....85

Tabela 2: Manifestações clínicas na população de pacientes com LES....86

Tabela 3: Frequência de teste positivo para anti-Hsp90 nos 3 grupos estudados.....89

Tabela 4: Dados clínicos e laboratoriais de pacientes com LES anti-Hsp90 positivos e anti-Hsp90 negativos.....90

Tabela 5: Propriedades diagnósticas do teste anti-Hsp90.....91

Figura 1: Níveis de anti-Hsp90 em controles sadios, pacientes com LES inativo e LES ativo.....87

Figura 2: Relação entre níveis de anti-Hsp90 e índice de atividade da doença (SLEDAI) 88

LISTA DE ABREVIATURAS

ACR	*American College Rheumatology* (Colégio Americano de Reumatologia)
ANA	Anticorpos antinucleares
Anti-DNAds	*Antidouble-stranded DNA* (anticorpo anti-DNA de dupla hélice)
AVC	Acidente vascular cerebral
ALT	Alanina amino transferase
AST	Aspartato amino transferase
aCL	Anticorpo anticardiolipina
ATP	Adenosina trifosfato
CREST	Variante de esclerodermia: calcinose, Raynaud, alterações esofagianas, escleroactilia, telangiectasia
DNAds	DNA bicatenular ou de dupla hélice
DNAuc	DNA unicatenular ou de hélice simples
EUA	Estados Unidos da América
FACS	Classificação celular por fluoerescência ativada
Grp	Proteína reguladora de glicose
Hsp	*Heat shock protein* (Proteína de choque térmico)
Hsp90	*Heat shock protein 90kDa* (Proteína de choque térmico de 90 kDaltons)
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucina
IFN	Interferona
kDa	quilo Dalton
LES	Lúpus eritematoso sistêmico
NK	Célula natural killer
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico

PTI	Púrpura trombocitopênica idiopática
SAF	Síndrome antifosfolipídeos
Sm	Smith
SLEDAI	*Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index* (Índice de atividade da doença lúpus eritematoso sistêmico)
TGFα	Fator de necrose tumoral alfa
UVA	Raios ultravioleta A
UVB	Raios ultravioleta B
VDRL	*Venereal Diseases Research Laboratory* ou pesquisa laboratorial de doenças venéreas

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 14
1.1 Lúpus eritematoso sistêmico 14
1.2 Etiopatogenia do LES 17
1.3 Espectro de autoanticorpos no LES 20
1.4 Diagnóstico do LES 25
1.5 Manifestações Clínicas 27
1.6 Manifestações Músculos-esqueléticas 29
1.7 Manifestações Cutâneas 30
1.8 Manifestações Cardíacas 32
1.9 Manifestações Pulmonares 34
1.10 Manifestações Renais 34
1.11 Manifestações Hematológicas 35
1.12 Manifestações relacionadas ao Sistema Nervoso 37
1.13 Manifestações Gastrointestinais 39
1.14 Alterações Endócrinas 39
1.15 SLEDAI (SLE disease activity index) 40
1.16 Tratamento 42
1.17 Proteínas de Choque Térmico 44
1.18 Hsp90 – Estrutura e característica moleculreas 50
1.19 Hsp90 e LES 56
2 JUSTIFICATIVAS PARA O ESTUDO 58
3 OBJETIVO 59
4 HIPÓTESES 59
4.1 Hipótese operacional 59
4.2 Hipótese conceitual 60
5 REFERÊNCIAS 61
6 ARTIGO EM PORTUGUÊS 75

7 ARTIGO EM INGLÊS 107
8 ARTIGO SUBMETIDO AO JOURNAL OF CLINICAL PATHOLOGY.....134
9 APÊNDICE 160
9.1 **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO** 160
9.2 **ÍNDICE DE ATIVIDADE DA DOENÇA – LES** 162
9.3 **QUESTIONÁRIO – PACIENTES CONTROLES** 163

1 INTRODUÇÃO

1.1 Lúpus eritematoso sistêmico

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença autoimune do tecido conjuntivo, crônica, que pode afetar virtualmente qualquer órgão da economia corporal. Como ocorre em outras doenças autoimunes, a resposta imune se volta contra células e tecidos próprios, resultando em inflamação e dano tecidual.[1,2,3]

O LES pode ocorrer em qualquer idade, mas tem seu início principalmente entre as idades de 16 e 55 anos. Ocorre com maior frequência entre mulheres, numa proporção, nesta faixa etária, de nove a dez mulheres para cada homem, com uma prevalência variando 14 a 50/100.000 habitantes em estudos norte-americanos realizados. Com relação a etnias, entre os grupos estudados, verificou-se uma maior prevalência entre afro-americanos. As mulheres afro-americanas e hispânicas são afetadas com maior frequência do que as brancas e geralmente apresentam a doença na forma mais grave.[4,5] Estudos apontam uma incidência entre 0,36 e 0,53 por 100.000 casos/ano,

variável de acordo com as regiões e grupos étnicos. Alguns estudos demonstram que o LES corresponde a 1% das doenças reumatológicas em pediatria no Reino Unido, 1,5% a 3% no Canadá e 4,5% nos EUA.[6,7]

No Brasil, um estudo realizado por Vilar, Rodrigues e Sato, estimou a incidência de 8,7/100.000 habitantes na cidade de Natal (RN) no ano 2000. A doença parece ser mais comum na zona urbana do que na zona rural.[8]

O LES é uma doença rara antes dos oito anos de idade; é mais frequente no sexo feminino (4:1 antes da puberdade, aumentando para 8:1 a partir desta idade) e mais grave quando se inicia na infância[7]. Em 65 % dos pacientes com LES, a doença teve início antes dos 16 anos, 55,2% após os 16 anos, e 15 % antes dos 55 anos.[2]

Devido a sua natureza sistêmica, as manifestações clínicas do LES são diversas, com a pele, articulações, rins, serosas, sistema nervoso e sangue, principalmente, envolvidos. Estas manifestações ocorrem em variada extensão nos pacientes, e podem mudar no decorrer do tempo. Os sintomas da doença geralmente são inespecíficos e incluem artralgias, mialgias, náuseas, vômitos, cefaleia, depressão, emagrecimento e febre, variavelmente combinados. Podem apresentar-se de forma leve ou grave, intermitente ou persistente.[9,10]

A morbidade da doença é potencialmente alta e pode ser representada, sobretudo, pelo comprometimento renal, que ocorre em um percentual considerável de pacientes durante o curso da doença. A nefrite lúpica e o

envolvimento neurológico constituem as principais causas de mortalidade na primeira década da doença.[5,10]

A sobrevida tem aumentado significativamente e a principal causa de morte é aterosclerose prematura, com risco 50 vezes maior de infarto do miocárdio do que a população sadia. Os pacientes com LES apresentam acelerada aterosclerose com sequelas clínicas.[11,12,13,14] A deslipoproteinemia é comumente associada com o LES e pode situar-se como um importante fator na progressão da aterosclerose. Da mesma maneira, o uso de esteróides pode afetar o perfil lipídico e ter um efeito similar na aterosclerose.[15,16]

O curso clínico é caracterizado por períodos de remissões e de recaídas agudas ou crônicas. Anormalidades imunes características, especialmente anticorpos dirigidos a vários antígenos nucleares e a outros antígenos celulares, desenvolvem-se em pacientes com LES. O diagnóstico é feito pela presença de quatro dos onze critérios clínicos ou laboratoriais elaborados pelo Colégio Americano de Reumatologia em 1982 e revisados em 1997.[17] Estes critérios, descritos na tabela 1, devem estar presentes, seriada ou simultaneamente, durante qualquer intervalo de observação.

Tabela 1: Critérios do Colégio Americano de Reumatologia para classificação do LES

Eritema malar
Lesão discóide
Fotossensibilidade
Úlceras Orais
Artrite não erosiva, de duas ou mais articulações
Serosite : pleurite, pericardite
Renais : proteinúria > 0,5 g/dia, cilindros
Neurológico : convulsão, psicose
Hematológico: anemia hemolítica, leucopenia < 4.000/mm³, linfopenia <1.500/mm³, plaquetopenia < 100.000/mm³
Alterações imunológicas: anticorpos antifosfolipídes,anticorpos AntiSm, falso VDRL positivo
Anticorpos antinucleares

Hahn BH, 2008[5]

1.2 Etiopatogenia do LES

A causa de LES ainda é desconhecida, embora muitas observações sugiram a importância de fatores genéticos, hormonais, imunológicos e

ambientais. A tabela 2 lista os fatores genéticos associados ao deflagramento da doença. As interações entre os genes da suscetibilidade e os fatores ambientais resultam em respostas imunes anormais, como: (1) a ativação da imunidade inata (células dendríticas) pelo DNA de CpG, pelo DNA existente nos imunocomplexos e pelo RNA nos antígenos próprios (*self-antigens*) de RNA/proteína; (2) limiares de ativação mais baixos das células de imunidade adaptativa (linfócitos T e B antígeno-específicos); (3) células CD4+ e CD8+ reguladoras ineficazes; e (4) depuração reduzida das células apóptóticas e dos imunocomplexos. Os antígenos próprios (DNA/proteína nucleossômica; RNA/proteína em Sm, Ro e La; fosfolipídeos) estão disponíveis para o reconhecimento por parte do sistema imune na vesículas superficiais das células apoptóticas; logo, antígenos, autoanticorpos e complexos imunes persistem por longos períodos, tornando possível a inflamação e a própria doença.[5]

A ativação imune das células circulantes e ligadas aos tecidos é acompanhada por maior secreção do fator deecrose tumoral alfa (TNF α) pró-inflamatório e dos interferons (IFN) tipos 1 e 2, bem como do estimulador de linfócitos B (BLyS) e da interleucina (IL) 10. A suprarregulação dos genes induzida pelos interferons é uma espécie de “assinatura” genética do LES.[5,18] No entanto, as células T lúpicas e NK (*natural killer*) não produzem IL-2 e fator transformador de crescimento (TGF) suficientes para induzirem células T supressoras. O resultado é a produção de autoanticorpos patogênicos e imunocomplexos capazes de causar dano microvascular difuso.

Logo, um perfil imune característico desenvolve-se em pacientes com LES: o desenvolvimento de níveis elevados de anticorpos antinucleares (ANA), especialmente contra o DNA.

Tabela 2: Fatores genéticos envolvidos no LES

Fatores genéticos associados ao LES
Alta taxa de concordância (14-57%) em gêmeos monozigóticos
Frequência aumentada (5-12%) de células LE, autoanticorpos e defeitos nas células supressoras em parentes de 1º grau
Frequência aumentada : HLA-B8, DR2, DR3, DDQA1, DQB1, C2, C4 (especialmente C4A), deficiência dde CR1
Certos marcadores genéticos na IgG
Genes de receptores Fc
Marcadores cromossomais na região Iq41-q42
AntiDNA associado a DR2, DR3, DR7, DDQB1
AntiSm associado a DR4, DR7, DQw6
AntiRNP associado a DQw5, DQw8
AntiRo (SS-A) associado a DR2, DR3, DRA1/DdQB1, C2D
AntiLa (SS-B) associado a Dr3, DQw2.3
Antifosfolipídeos associados a DR4, DR7, DR53, DDQw7

Cecil, 2005[18]

A evidência de anormalidades hormonais é fundamentada principalmente na observação de que o LES é muito comum entre mulheres em idade fértil. Os estrogênicos promovem hiperatividade das células B, enquanto que os androgênios podem ter o efeito oposto. Mulheres que fazem uso de contraceptivos orais que contêm estrogênio, ou que recebem reposição hormonal, estão sob risco 1,2 a 2 vezes maior de vir a desenvolver LES.[18]

Estímulos ambientais, como exposição à luz ultravioleta, acarretam exacerbações do LES em cerca de 70% dos pacientes, provavelmente por aumentar a apoptose des células epidérmicas ou alterar o DNA e proteínas intracelulares, de forma a torná-los antigênicos. Fatores como infecções e outros eventos estressantes também estão associados a períodos de exacerbação da doença.[18]

1.3 Espectro de auto-anticorpos no LES

Os ANA têm assumido importante papel na Reumatologia Clínica, sendo, alguns destes, marcadores diagnósticos, como os anticorpos anti-DNA e anti-Sm no LES; anticorpos anti-Sci-70 na esclerose múltipla progressiva; anticorpos anti-centrômero na Síndrome CREST e anti-Jo na dermatopolimiosite. O LES é caracterizado por uma multiplicidade de anticorpos com uma ou mais especificidades antigênicas.

Os anti-DNAds (bicatenular ou dupla hélice) são muito específicos para LES e detectáveis em altas concentrações durante doença ativa. É marcador da doença, estando presente em 70% dos casos. Estudos constataram que o controle destes anticorpos diminuía a progressão do dano renal em pacientes com nefrite lúpica, relacionando a importância clínica da titulação deste anticorpo com atividade da doença.[19]

Os anti-DNAuc (unicatenular ou de hélice simples) se relacionam a antígenos de superfície, por exemplo, contra membranas de hemácias, leucócitos e plaquetas. Anticorpos contra DNA desnaturado são observados em várias doenças, não sendo específicos para nenhuma delas. Entretanto, sua presença no LES parece estar relacionada à lesão renal.

Quanto aos anticorpos anti-histonas, classicamente relacionados ao lúpus induzido por drogas e não ao LES idiopático, formam o nucleossoma e mostram grande afinidade pela membrana basal glomerular, mas não são específicos para nefrite lúpica. Citam-se aqui os anticorpos anti-H2A-H2B e anti-H3H4.

Anticorpos contra ribonucleoproteínas incluem: anti-Smith (anti-Sm), U1-RNP, U2-RNP, U3-RNP, Ro (SSA), Th, 5s-RNP e anti-Jo (T-RNA sintetase). O anticorpo anti-Sm é o mais específico para o LES, considerado marcador da doença, sendo positivo em 30% dos pacientes[16]. No entanto, há controvérsias quanto ao seu envolvimento nas manifestações do SNC e do rim[20]. Anticorpos anti-RNP associam-se ao fenômeno de Raynaud e perda da função pulmonar

no LES, e estão positivos em 19% dos pacientes. Anti-Ro/SSA é encontrado em 30-40% dos pacientes com LES juvenil, associam-se a lesões de pele, pneumonite intersticial, trombocitopenia idiopática, doença renal, Síndrome de Sjögren; é fator de risco para o desenvolvimento de bloqueio cardíaco congênito em 5% das crianças de mães lúpicas, como uma das manifestações do lúpus neonatal. O anti-La/SSB é achado em 14-20% dos casos, correlacionando-se negativamente com quadro renal.[18,20]

A pesquisa de ANA através de imunofluescência constitui um exame de triagem. A presença destes anticorpos no soro não indica, necessariamente, doença reumatológica. Um a 2% da população mundial têm teste positivo sem apresentar doença, e 12% das crianças saudáveis tem ANA circulantes. A probabilidade de teste positivo aumenta com a idade (20 a 25% das pessoas com mais de 60 anos tem teste positivo). Estes números são mais altos quando há doença reumatológica na família. No padrão homogêneo dos ANA todo o núcleo se cora, demonstrando estarem aí os antígenos de DNA. O padrão salpicado é o mais visto e menos específico e é determinado por reação de anticorpos contra antígenos nucleares extraíveis.[21,22]

Os ANA podem ser positivos em uso de medicamentos (procaína, betabloqueadores, anticonvulsivantes, penicilina e sulfas), hepatopatias crônicas, púrpura hiperglobulinêmica, miastenia gravis, timoma, leucemias, linfomas, tumores sólidos, tireodite de Hashimoto, anemia perniciosa, colite inespecífica, glomerulonefrite membranosa primária, alveolite fibrosante criptogênica, asbestose, mononucleose infecciosa, dermatite herpertiforme,

esquistossomose, tripanossomíase, tuberculose, hanseníase, salmonelose, infecções pelo HIV e klebsiela, e pode ser positivo em outras doenças autoimunes.[21]

Os anticorpos antifosfolipídios, encontrados em 31% dos pacientes com LES, estão associados à trombose de vasos de diferentes calibres, levando a diferentes aspectos clínicos, desde livedo reticular até tromobose venosa, embolia pulmonar, abortos espontâneos recorrentes, acidente vascular encefálico e mielite transversa[23]. O reconhecimento de antígenos-alvo cardiolipina-colesterol-fosfatidil colina, rico em fosfolipídios, torna o exame VDRL falsamente positivo pela presença dos anticorpos anticardiolipina (aCL).[18,22]

O fenômeno das células LE, na verdade uma reação de anticorpo no soro do doente (IgG), com constituintes do núcleo da célula (DNA-Histona) em presença do complemento, ocorre, necessariamente, quando o doente produz IgG que fixa o complemento, induzindo à fagocitose. Em casos de leucopenia intensa pode ser negativo. Logo, o resultado negativo não impede o diagnóstico de LES. E, quando positivo, não é um resultado que permita a identificação da doença, já que pode haver outras colagenoses, hepatite crônica ativa e pelo uso de algumas drogas. Desde a revisão, em 1997, dos critérios diagnósticos de 1982 pelo ACR[17], não se considera a positividade de células LE como um critério para o LES. Esta técnica foi substituída pela dos anticorpos antifosfolípidios, que é mais fácil, com menor custo e mais específica.[5,18]

A tabela 3 lista os principais autoanticorpos detectáveis em pacientes com LES.

Tabela 3: Autoanticorpos no LES

Anticorpo	Prevalência (%)	Antígeno reconhecido
Anticorpos antinucleares	98	Nuclear múltiplo
Anti-dsDNA	70	DNA (bifilamentar)
Anti-Sm	25	Proteína combinada a seis espécies do RNA do U1 nuclear
Anti-RNP	40	Proteína combinada ao RNAγ do U1
Anti-Ro (SS-A)	30	Proteína combinada ao RNA de hγ, principalmente de 60kDa e 52 kDa
Anti-La (SS-B)	10	Proteína de 47 kDa combinada ao RNA de hγ
Anti-histona	70	Histonas associadas ao DNA (no nucleossomo, cromatina)
Antifosfolipídeo	50	Fosfolipídeos, co-fator da β_2-glicoproteína, protrombina
Antieritrócito	60	Membrana os eritrócitos
Antiplaquetário	30	Antígenos de superfície e citosplasmáticos alterados nas plaquetas
Antineuronial	60	Antígenos neuroniais e da superfície dos linfócitos
Antirribossômica	20	Proteína dos ribossomos

Hahn BH, 2008[5]

1.4 Diagnóstico do LES

O diagnóstico de LES baseia-se em elementos clínicos e presença de auto-anticorpos característicos. Os critérios de classificação foram estabelecidos pelo ACR e o diagnóstico se baseia na presença de, pelo menos, quatro dos onze critérios listados de forma consecutiva ou seriada. A sensibilidade e a especificidade para estes critérios são de 95% e de 75%[5], respectivamente.

Desde que, em 1948, Hargarves *et al* descreveram o fenômeno da célula LE, comprovou-se o caráter autoimune do LES. A presença destas células, até 1999, era um dos critérios do ACR para o diagnóstico da doença. Atualmente, este fenômeno deixou de ser critério porque, teoricamente, pode ocorrer em qualquer doença onde haja ligação de anticorpos com seus antígenos intracelulares.[24]

Com o avanço da imunologia, nas últimas décadas, novos testes foram sendo desenvolvidos e, somados à clínica, facilitam o diagnóstico do LES.

O teste ANA constitui uma prova de triagem útil. Um resultado positivo possui um padrão de previsão de LES de 15 a 35%. Com um resultado positivo, convém investigar a presença de anticorpos contra o DNA de filamento duplo (DNAds) e as cadeias de RNA nuclear Sm, RNP, Ro (SS-A) e La (SS-B).

A pesquisa de ANA, uma técnica de imunofluorescência indireta, tornou-se importante na identificação do LES. Ela constitui uma prova de triagem útil

devido a sua sensibilidade (mais de 98%), embora não seja específica para o LES . Outras patologias, como a esclerodermia (em 90 % dos casos), Síndrome de Sjögren (70 %), artrite reumatóide (35%) e mesmo população saudável (10%) tem ANA positivo. Este teste informa se há ou não anticorpos contra antígenos nucleares, que são os anticorpos contra: DNA nativo (praticamente específico para LES), DNA desnaturado (que há no LES em altos títulos, mas também em outras doenças), histonas H1, H3-H4 (presentes no LES), histonas H2A-H2B (mais comum no LES induzido por drogas), antígeno Smith (o mais específico para LES, encontrado em 30% dos casos), antígenos nucleolares, RNA nuclear, SS-A, SS-B.

Os anticorpos antifosfolipídios, incluídos em 1997 como critério imunológico do LES, constituem-se um grupo heterogêneo de imunoglobulinas dirigidas contra fosfolipídios de membrana celular e do complexo ativador de protrombina. Estão associados a trombose venosa e arterial, abortos recorrentes, doença neurológica, trombocitopenia e outras condições clínicas. A síndrome antifosfolipídica pode ocorrer como condição primária ou associada a outras doenças como LES, doenças infecciosas, linfoproliferativas ou com uso crônico de certas drogas.[18]

1.5 Manifestações clínicas

O LES é uma doença pleomórfica que não apresenta um padrão típico de comprometimento sistêmico. O diagnóstico baseia-se fundamentalmente no quadro clínico, que, associado a dados laboratoriais e sorológicos, favorecem a sua definição. Na fase inicial acomete com maior frequência o sistema ósseo-articular e o cutâneo, e, de forma mais grave, o renal e o sistema nervoso central (SNC).

O LES possui início e evolução muito variável. Pode acometer um ou mais sistemas orgânicos. Com a evolução da doença podem ocorrer outras manifestações. Os sintomas iniciais incluem mialgias, náuseas, vômitos, cefaleias, depressão, equimoses ou sintomas mais específicos ou, ainda, combinações destes. A febre como primeiro sinal clínico de LES pode ocorrer em cerce de 50% dos casos e, geralmente, é associada a sinais consumptivos[25]. As úlceras orais, apesar de inespecíficas, fazem parte dos critérios de diagnóstico, geralmente não são dolorosas, relacionadas à atividade inflamatória da doença e encontradas em 25% dos pacientes, o que justifica um exame clínico minucioso do paciente com a suspeita da doença.[21] Os sintomas podem ser leves ou graves, transitórios ou persistentes[15]. A tabela 4 lista a prevalência de alterações clínicas do LES.

Tabela 4: Manifestações clínicas do LES

Sintoma ou sinal	Prevalência aproximada
Alopecia	40 - 60%
Anemia	60 – 80%
Anemia hemolítica autoimune	10%
Anorexia, náuseas, vômitos	50%
Anticorpos anti-Sm	30 -50%
Artralgia	95%
Artrite	80- 90%
Biópsia anormal	~ 100%
Células LE	60 – 90%
Conjuntivite ou episclerite	15%
Creatinina > 1,5 mg/dl	30%
Manifestações cardíacas	50 – 85%
Manifestações sistema nervoso central	35 – 75%
Rash malar	30 – 60%
ANA positivo	99%
AntiRo (SSA) e antiLa (SSB) positivos	20 – 40%
Fator reumatóide positivo	20%
Fadiga	80%
Febre	80%
Fotossensibilidade	40%
Hematúria	40%
Leucopenia	50%
Mialgia	50%
Miocardite	5- 10%
Miosite	25 – 30%
Necrose avascular	5 – 10%
Neuropatia periférica	5 – 20%
Pericardite	20 – 25%
Pleurisia/pleurite	50%
Pneumonite	10%
Proteinúria	50 – 70%
Trombocitopenia	15 – 25%

Hahn BH, 2008[5]

1.6 Manifestações músculo-esqueléticas

Em cerca de 95% dos pacientes com LES, são observadas artralgias e artrites. Estes sintomas tendem a ser assimétricos e migratórios. Dedos, mãos, punhos, joelhos, tornozelos, cotovelos, ombros e quadris, estes últimos de maneira menos frequente, são afetados. Diferentemente da artrite reumatóide cuja rigidez matinal é medida em horas, a rigidez matinal no LES é medida em minutos. As deformidades de flexão, desvio ulnar, lassidão dos tecidos moles e deformidades em “pescoço de ganso” podem ocorrer devido ao dano do tecido periarticular, em especial em pacientes com longo histórico da doença.

Os derrames articulares, assim como erosões articulares, são pouco observados.

O uso de certos medicamentos, como a prednisona, em altas doses e com uso prolongado, pode levar à necrose avascular, especialmente da cabeça do fêmur. A osteoporose é comum e é também agravada pelo uso de corticosteróides.[20]

Miosite com fraqueza muscular clínica pode ocorrer, embora a maioria dos pacientes tende a queixar-se de mialgias sem miosite. Também os glicocorticóides e, numa escala bem menor, os antimaláricos podem causar fraquezas musculares.[5,18]

1.7 Manifestações cutâneas

As lesões cutâneas são de grande importância no reconhecimento do LES e possuem uma característica marcante, que é a fotossensibilidade tanto à luz UVB quanto à luz UVA. No começo da doença as manifestações cutâneas são extremamente frequentes, correspondendo a aproximadamente 70% dos casos, o que facilita a sua suspeita, e são observados em mais de 90% dos pacientes lúpicos em algum momento da doença.[17]

A manifestação cutânea aguda é a mais conhecida no LES e sua forma localizada é descrita como rash malar ou rash em “asa de borboleta”, notadamente simétrica, poupando o sulco nasolabial, desenvolve-se após exposição à UV em mais de 50% dos pacientes.[18]

As lesões discóides apresentam-se em 25 % dos pacientes com LES. Elas são caracterizadas por placas redondas definidas, anulares, eritematosas, discretamente infiltradas, cobertas por uma escama aderente bem-formada que se estende para os folículos pilosos dilatados.

A forma cutânea generalizada é conhecida como rash máculo-papular ou dermatite lúpica, e se apresenta como erupção exantematosa ou morbiliforme generalizada.

Entretanto, o lúpus eritematoso cutâneo crônico engloba uma série de lesões, dentre as quais a discóide é a mais conhecida. A clássica é caracterizada inicialmente por placa eritematosa e hiperpigmentada que

lentamente evolui na sua periferia, deixando uma cicatriz central hipopigmentada com atrofia. Na maioria das vezes, esta é única e preferencialmente encontrada na face, couro cabeludo, pavilhão auricular e pescoço.

O lúpus eritematoso cutâneo subagudo é uma entidade à parte do LES, sendo caracterizado pela presença de lesões eritematosas pápulo-escamosas (tipo psoriasiformes) ou anulares (tipo placas policíclicas), localizadas principalmente em regiões de exposição solar (face, vespertílio e braços). Ambas as formas de lesão estão fortemente associadas à presença dos anticorpos antiRo/SSA. Embora aproximadamente metade desses pacientes preencha os critérios de classificação de LES, somente 10% a 15% evoluem para formas graves de comprometimento sistêmico. As lesões evoluem após o tratamento sem deixar cicatrizes profundas, mas produzem áreas de hipopigmentação, tipo vitiligóides, que podem se tornar perenes.

Ainda fazem parte do LES algumas outras lesões cutâneas não-específicas: a alopecia, a vasculite cutânea e o livedo reticular. A alopecia difusa pode ser observada em até 50% dos casos, podendo, inclusive, ser o primeiro sinal clínico, e está diretamente relacionada com a sua atividade inflamatória, podendo anteceder outras manifestações de exacerbação da doença. Normalmente existe recuperação após a remissão do surto inflamatório, embora em casos mais graves e em formas mais agressivas esta possa tornar-se definitiva.

A vasculite cutânea é identificada em 20% a 70% dos casos, variando desde lesões do tipo urticária até grandes úlceras necróticas. O padrão de vasculite é determinado pelo nível e intensidade do dano inflamatório dos vasos comprometidos. Além do processo inflamatório dos vasos, os pacientes com LES podem ainda apresentar quadro de vasculopatia trombótica decorrente da síndrome dos anticorpos antifosfolípides (SAF), caracterizada por formação de trombos recorrentes envolvendo vasos de todos os tamanhos, mas sem sinais significativos de inflamação.[5]

Já o fenômeno de Raynaud, presente em 20 a 40% dos casos, é fortemente associado à presença dos anticorpos antiRNP e também pode ser a primeira manifestação da doença, e sua frequência e intensidade estão associados à exposição ao frio.[9]

1.8 Manifestações cardíacas

A mortalidade cardiovascular em pacientes com LES é significativa, mesmo após ajuste para tradicionais fatores de risco de Framingham; o LES parece ser um independente fator de risco para eventos cardiovasculares.[26,27]

O envolvimento cardiovascular mais frequente é a pericardite, sendo sintomática em 20% a 30% durante o curso da doença, podendo ser observada como primeira manifestação em 5% dos casos. O quadro agudo pode ser

isolado ou fazer parte de serosite generalizada, particularmente associada à pleurite. O ecocardiograma pode revelar derrame ou espessamento pericárdico em até 30% dos pacientes com lúpus, mesmo assintomáticos. Sua evolução é habitualmente subaguda ou crônica, explicando sua rara tendência ao tamponamento.

A miocardite clínica é encontrada principalmente no decorrer do LES, sendo caracterizada por taquicardia persistente e sinais clínicos de insuficiência cardíaca de instalação aguda, normalmente acompanhada de alterações no mapeamento cardíaco e em enzimas musculares. O envolvimento do endocárdio (endocardite de Libman-Sacks) é mais frequentemente diagnosticado em autópsias ou sugerido por alterações no ecocardiograma[9]. Essas vegetações podem ser encontradas em até 50% dos casos autopsiados e desenvolvem-se em qualquer válvula, principalmente na mitral. Essas lesões normalmente não produzem repercussão clínica e são habitualmente diagnosticadas no ecocardiograma.

A aterosclerose precoce nos pacientes lúpicos é, atualmente, uma importante causa de mortalidade na doença devido a infarto agudo do miocárdio em mulheres jovens. Esse processo é multifatorial, com a contribuição das lesões endoteliais, das dislipidemias, da menopausa precoce, da hipertensão arterial e da insuficiência renal, além da atividade da doença por si só.[18,28.]

1.9 Manifestações pulmonares

A pleurite é a manifestação pulmonar mais frequente, ocorrendo em 40% a 60% dos casos, assim como o derrame pleural em 16% a 40% durante o curso da doença. Outras manifestações pulmonares do LES são hipertensão arterial primária, que pode acontecer de forma leve em até 10% dos pacientes, doença intersticial, considerada rara no LES, e hemorragia alveolar.[18]

1.10 Manifestações renais

A nefrite lúpica é uma das manifestações mais importantes da doença (cerca de 50% dos pacientes) e exige uma maior atenção tanto no início como no seguimento desses pacientes[5]. A maioria dos quadros renais apresenta-se nos primeiros cinco anos de LES, mas podem ser detectados em qualquer momento do seu curso, o que exige uma monitorização cuidadosa e regular no segmento desses pacientes. A identificação precoce do acometimento renal é extremamente importante para adequação e antecipação do tratamento. Deve-se ter sempre em mente que os sintomas e sinais específicos de nefrite só ocorrem quando em avançado grau de síndrome nefrótica ou de insuficiência renal.

Embora a proteinúria (>0,5g/24h) e a presença de cilindros façam parte dos critérios diagnósticos da doença, outros parâmetros como hematúria e aumento da creatinina devem ser considerados para o diagnóstico de glomerulonefrite e ajudam a diferenciar entre seus diferentes tipos; a proteinúria é, entretanto, manifestação universal, ocorrendo em quase 100% dos pacientes com atividade renal. O diagnóstico pode ser definido perante biópsia renal, de acordo com a classificação histológica proposta pelas Sociedades Internacionais de Nefrologia e Patologia Renal, sendo necessário para uma análise fidedigna do padrão de nefrite lúpica, no mínimo de 10 a 15 glomérulos.[29]

A biópsia renal é de extrema valia tanto para a adequação do tratamento específico quanto para a exclusão de outros achados não relacionados ao LES.

1.11 Manifestações hematológicas

As alterações hematológicas são observadas nas fases precoces do LES, muitas vezes precedendo em anos o diagnóstico da doença. A série branca é a mais frequentemente alterada, com leucopenia e linfopenia isoladas ou associadas. Essas alterações ocorrem em até 70% dos casos e podem preceder as manifestações clínicas, sendo de grande auxílio diagnóstico. O monitoramento desses parâmetros é útil no acompanhamento de doença, pois

a diminuição de seu número em geral reflete a atividade do lúpus, mas deve-se estar atento à possibilidade da queda estar relacionada aos imunossupressores em uso.[18]

A anemia pode ser identificada em até 80% dos pacientes com LES em alguma fase da doença e pode ser classificada em imune e não-imune. A mais comum das anemias não-imunes é a anemia da doença crônica (que, na maioria das séries, é também mais frequente que a anemia hemolítica), seguida pela anemia ferropriva e a anemia secundária à doença renal[18]. A anemia hemolítica com teste de Coombs positivo é a principal representante do grupo das anemias imunes e a única que faz parte dos critérios de classificação da doença, podendo preceder em anos outras manifestações clínicas desta. Uma outra forma de hemólise é a anemia hemolítica microangiopática, caracteristicamente Coombs-negativa e com esquizócitos na periferia, normalmente relacionada à presença de vasculite sistêmica.

A trombocitopenia, definida com menos de 150.000 células/mm^3, é encontrada em 15% dos casos de LES. O grau de plaquetopenia é bastante variável e formas graves são menos comuns. A trombicitopenia pode refletir doenças mieloproliferativas, trombopoiese inefetiva, distribuição anormal de plaquetas e mecanismos imunes anormais (anticorpos antiplaquetários, coagulação intravascular disseminada e púrpura trombocitopênica idiopática). A púrpura trombocitopênica idiopática (PTI) pode ser uma das primeiras manifestações do LES.[18]

Durante a doença ativa, a linfadenopatia é observada em cerca de 50% dos pacientes. Os linfonodos são tipicamente pequenos, moles, não-dolorosos à palpação e definidos no pescoço e nas regiões axilar e inguinal.[18]

A esplenomegalia é observada em cerca de 10 a 20% dos pacientes e ocorre, de modo mais frequente, na doença ativa e em associação à linfadenopatia.[18]

1.12 Manifestações relacionadas ao sistema nervoso

O espectro dos quadros de sistema nervoso engloba uma série de condições neurológicas que são identificadas entre 25% e 70% dos pacientes. As síndromes neuropsiquiátricas no LES foram classificadas em 19 síndromes, subdivididas em dois grandes grupos: sistema nervoso central e sistema nervoso periférico. Essas condições podem ser subdivididas em difusas, em que identificamos a convulsão e a psicose, que fazem parte dos critérios, e os quadros focais. A maioria dos quadros epilépticos é do tipo grande-mal, de eventos tônico-clônicos e associação temporal com a doença ou com períodos de exacerbação, o que reforça a hipótese de lúpus. A tabela 5 lista as síndromes neuropsiquátricas descritas no LES.

Tabela 5: Síndromes neuropsiquiátricas do LES (segundo o Comitê de Nomenclatura do Colégio Americano de Reumatologia)

Sistema nervoso central	● Meningite asséptica ● Doença cérebro-vascular ● Síndrome desmielinizante ● Cefaleia (incluindo enxaqueca e hipertensão intracraniana benigna) ● Desordem do movimento (coreia) ● Mielopatia ● Quadro convulsivas ● Estado confusional agudo ● Disfunção cognitiva ● Alterações do humor ● Psicose
Sistema nervoso periférico	● Poliradiculoneuropatia desmielinizante inflamatória aguda (Síndrome de Guillain-Barré) ● Desordens autonômicas

American College of Rheumatology, 1999[30]

Os distúrbios de comportamento também são muito frequentes e podem ocorrer em aproximadamente metade dos pacientes. A psicose ocorre em até 10% dos casos e pode se manifestar nas suas diferentes formas, como esquizofrenia e distúrbios bipolares. Confusão diagnóstica pode ocorrer com quadros de psicose induzida pelo uso de corticóide para tratamento da doença. Os quadros difusos incluem ainda a cefaleia, o pseudotumor cerebral e a síndrome orgânica cerebral, caracterizada por distúrbio de função mental com

delírio, inadequação emocional, prejuízo da memória ou concentração. Nos quadros focais encontram-se acidente vascular cerebral (AVC), mielite transversa, síndrome de Guillain-Barré, meningite asséptica, neuropatia craniana e periférica (mononeurite multiplex) e desordens de movimento, como tremores, coreia e parkinsonismo.[5,18]

1.13 Manifestações gastrointestinais

São comuns durante períodos de exacerbação do LES: náuseas, vômitos, diarreias, dor abdominal difusa causada por peritonite autoimune e/ou vasculite intestinal. Anormalidades nos marcadores hepáticos como a lactato desidrogenase (LDH), alanina aminotransferase (ALT) e aspartatoamino transferase (AST) são comuns durante a doença ativa.[5,18]

1.14 Alterações endócrinas

Alterações no ciclo menstrual podem ocorrer principalmente durante a fase ativa da doença; a menopausa precoce também é descrita em pacientes com LES, mesmo quando na ausência de uso de ciclofosfamida.[9]

1.15 SLEDAI (SLE disease activity index)

Tão importante quanto o diagnóstico é a definição da atividade da doença. Para a quantificação da atividade da doença deve ser utilizado um instrumento padronizado, validado, fiável e sensível à mudança. Para mensurar a atividade da doença e medir a efetividade das diversas modalidades terapêuticas vários índices foram elaborados. São exemplos disso o Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index (SLEDAI)[31], o Systemic Lupus Activity Measure (SLAM)[32], o European Consensus Lupus Activity Measure (ECLAM)[33] ou o Bristish Isles Lupus Assessment Group (BILAG)[34]. Dentre estes índices, o mais utilizado é o SLEDAI, um índice quantitativo de fácil aplicação baseado na presença ou ausência de 24 itens de anormalidades em 9 sistemas orgânicos. Cada item recebe pontos cuja soma pode variar de zero a 105. Este índice deve ser aplicado considerando as anormalidades ocorridas nos últimos dez dias. Assim, este método é mais sensível às mudanças clínico-laboratoriais de atividade da doença. Considera-se doença ativa uma soma maior ou igual a 4 e doença severa uma soma maior que 12. O SLEDAI foi objeto de atualização no ano de 2000 (SLEDAI 2K).[35] A tabela 6 refere-se ao conjunto de manifestações observadas no SLEDAI com as espectivas pontuações.

Tabela 6 : SLE Disease Activity Index 2000 SLEDAI 2K

Pontuação	Manifestação Observada	Definição
8	Convulsões	Início recente. Exclui causa metabólica, infecciosa ou relacionada com fármacos
8	Psicose	Perturbação grave da percepção da realidade. Inclui alucinações, incoerência, perda marcada das associações, pensamento pobre, ilógico; comportamento bizarro, desorganizado ou catatônico. Exclui uremia ou causa relacionada a fármacos
8	Síndrome cerebral orgânica	Funções mentais alteradas de início súbito e caráter flutuante, com dificuldade na orientação, memória ou outras funções intelectuais. Inclui redução da vigilidade com diminuição (ou incapacidade) da atenção e pelo menos mais de dois dos seguintes: perturbação da percepção, discurso incoerente, insônia ou sonolência diurna, aumento ou diminuição da atividade psicomotora. Exclui causas metabólicas infecciosas ou relacionadas com fármacos
8	Distúrbios visuais	Alterações retinianas do LES: corpos citoides, hemorragias retinianas, exsudatos serosos ou hemorragias da coroideia ou nevrite óptica (não causada por HTA, fármacos ou infecção)
8	Distúrbios dos nervos cranianos	Neuropatia sensitiva ou motora de novo envolvendo os pares cranianos
8	Cefaleia lúpica	Cefaleia severa, persistente, pode ter características de enxaqueca; resistente aos analgésicos narcóticos
8	AVC	Acidente vascular cerebral. Exclui aterosclerose
8	Vasculite	Ulceração, gangrena, nódulos digitais dolorosos, enfartes periunguenais, hemorragias subungueais lineares ou vasculite confirmada por biopsia ou angiografia.
4	Artrite	Dor e sinais inflamatórios (palpação dolorosa, tumefação ou derrame articular) em mais de 2 articulações
4	Miosite	Dor ou fraqueza muscular proximal associada a elevação do CK/aldolase, alterações eletromiográficas ou biopsia compatível com miosite
4	Cilindros urinários	Hemáticos, granulosos ou eritrocitários
4	Hematúria	> 5 eritrócitos / campo. Excluir outras causas (litíase, infecção).
4	Proteinúria	> 0,5 g/ 24horas
4	Piúria	> 5 leucócitos / campo na ausência de infecção
2	Rash malar	Rash inflamatório
2	Alopecia	Queda de cabelo excessiva, difusa ou localizada
2	Mucosas	Úlceras orais ou nasais
2	Pleurisia	Dor pleurítica com atrito, derrame ou espessamento pleural
2	Pericardite	Dor pericárdica com mais 1 dos seguintes: atrito, derrame, confirmação por ECG ou ecocardiograma
2	Hipocomplementemia	C3, C4 ou CH50 abaixo dos valores de referência
2	Anti-DNAds	Acima dos valores de referência do laboratório
1	Febre	Temperatura > 38ºC na ausência de infecção
1	Trombicitopenia	Plaquetas < 100.000/mm³ (excluídas causas farmacológicas)
1	Leucopenia	Leucócitos < 3.000/mm³ (excluídas causas farmacológicas)

Gladman, 2002[36]

1.16 Tratamento

O tratamento medicamentoso deve ser individualizado para cada paciente e dependerá dos órgãos e sistemas acometidos, bem como da gravidade destes acometimentos.

Independentemente do órgão afetado, o uso de antimaláricos é indicado com o objetivo de reduzir atividade da doença e tentar poupar o uso de corticóides.[37] A manutenção da droga em pacientes controlados diminui a possibilidade de novo surto de atividade[38]. Ao uso de antimaláricos também são atribuídos efeitos como melhora do perfil lípidico e redução do risco de trombose.[39,40]

Os glicocorticoides também são drogas usadas no tratamento do LES. Estes, devido aos seus múltiplos efeitos colaterais, devem ser usados para o controle da atividade da doença. Deve, logo que possível, haver uma redução gradual da dose usada até atingir uma dose de manutenção. Para pacientes que não conseguem atingir uma dose mínima do medicamento estão indicadas drogas poupadoras de glicocorticoides como a azatioprina e o metotrexate além dos antimaláricos citados anteriormente.[37,41,42]

O melhor entendimento da patogênese do LES e da imunologia tem levado à identificação de novos tratamentos. O interesse atual está principalmente focado na ação imunossupressiva fornecida pela terapia biológica.[43,44] Nos últimos anos, avanços conceituais e a introdução de novas

terapias estão produzindo melhoramentos no manejo da doença. Recentemente, vários estudos clínicos têm sido empreendidos com anticorpos monoclonais no tratamento do LES.

O importante papel das células B na patogênese das desordens autoimunes tem proporcionado uma forte razão para que as células B tornem-se alvo terapêutico no LES. Uma seletiva depleção terapêutica de células B torna-se possível com a eficácia dos anticorpos anti-CD20 (rituximab) e anti-CD22 (epratuzumab). Vários estudos clínicos confirmam a alta atividade do rituximab em pacientes com LES, especialmente com nefrite lúpica e envolvimento neuropsiquiátrico. Novos anticorpos monoclonais anti-CD20 têm sido desenvolvidos, como o anticorpo monoclonal totalmente humano ofatumumab (HuMax CD20), IMMU106 (hA20), o qual tem estrutura mais de 90% humanizada, e GA-101, um anticorpo monoclonal de terceira geração totalmente humanizado. Citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral-alfa (TNFα) e interleucina-6 (IL-6) desempenham importante papel na propagação do processo inflamatório responsável pelo dano tecidual. O bloqueio destas citocinas através de anticorpos monoclonais (Infliximab, Tocilizumab) pode ser também uma terapia bem sucedida para pacientes com LES[45].

1.17 Proteínas de Choque Térmico

A resposta ao choque térmico foi primeiramente descrita em 1962. As proteínas associadas ao choque térmico foram (Hsp) assim chamadas pelo fato de que sua síntese é aumentada pela elevação da temperatura, contrariamente ao que acontece com outras proteínas celulares quando submetidas as mesmas condições.[46,47]

As Hsp estão definidas como proteínas que se ligam não-covalentemente a superfícies hidrofóbicas de proteínas exógenas.[48] Embora muitas Hsp sejam expressas constitutivamente, sua expressão é aumentada por vários estresses, como por exemplo, hipoxia, isquemia, metais pesados, aumento de cálcio, privação de glicose, radiação UV e infecções microbianas. O aumento da expressão das proteínas de choque térmico também tem sido associado a algumas afecções como doenças autoimunes,[49,50] aterosclerose,[51,52,53] alguns tumores[54] e doenças psiquiátricas como a esquizofrenia.[55] A tabela 7 lista as principais condições que induzem a expressão das Hsp.

Tabela 7: Condições que induzem a expressão das Hsp

Fisiológicas	Patológicas	Ambientais
Ciclo de divisão celular	Infecção viral	Mudanças térmicas (choque de calor ou frio)
Fatores de crescimento	Infecção bacteriana	Metais pesados
Diferenciação celular	Infecção parasitária	Etanol
Desenvolvimento tecidos	Febre	Antibióticos
Estímulos hormonais	Inflamação Isquemia Dano oxidativo Malignidade Autoimunidade Toxinas Lipossacarídeos	Radiação

Z Prohászka, 2004[56]

Estas proteínas desempenham funções biológicas essenciais sob condições fisiológicas e estressantes. As Hsp estão diretamente envolvidas na biogênese de proteínas desde a formação das cadeias nascentes até a reunião em complexos multiméricos. Devido a esta função são chamadas de moléculas "chaperones" (protetoras)[56].

As Hsp estão presentes em todos os diferentes compartimentos celulares (núcleo, mitocôndria, cloroplastos, retículos endoplasmático, citosol). A nomenclatura inicial destas proteínas baseou-se no peso molecular aparente (Hsp 84, 85, 86 etc.), e foram agrupadas de acordo com seu tamanho mais próximo (por exemplo família Hsp90 kilodaltons ou kDa)[46,49]. A disponibilidade do nucleotídeo e da sequência de aminoácidos agora permitem uma classificação mais sistemática com uma base filogenética. Membros em uma mesma família exibem alto grau de sequencias idênticas (até mesmo entre procarióticos e eucarióticos), considerando que não há nenhuma homologia entre famílias[47].

Elas conservam sua estrutura molecular, propriedades bioquímicas e, parcialmente, sua estrutura imunológica (epítopo). As Hsp que são melhor entendidas são aquelas com peso de 110, 90 70 e 60 kDa. Essas “principais” Hsp são expressas a 37ºC na ausência de calor. O segundo grupo consiste de Hsp que são induzidas pela privação de glicose e incluem proteínas reguladas pela glicose (grp) com pesos moleculares de 34, 47, 56, 75, 78, 94 e 174 kDa. Um terceiro grupo consiste de Hsps de baixo peso molecular (menores que 20 kDa)[56]. A tabela 8 enumera os principais grupos de Hsp.

Tabela 8: Principais grupos de Hsp

Família	Papel principal
Hsp90	Manutenção de proteínas como receptores de esteróides, ou a tirosina Src quinase na forma inativa até um estímulo apropriado
Hsp 70	Dobramento e desdobramento proteico: montagem de complexos multiméricos
Hsp60	Dobramento e desdobramento proteico: organela de translocação
Hsp27	Proteína protetora

Stephanou A, Latchman DS, Isenberg DA 1998[57]

A tabela 9, por sua vez, descreve a localização genômica das Hsp.

Tabela 9 : Localização genômica das Hsp

Família	Símbolo do gene	Localiação do gene	Localização da Hsp
Hsp110 (C1P)	Hsp105A, Hsp105B	13q12.3	Citosol/núcleo
	APG-1	4q28	Citosol/núcleo
	APG-2H/HspA4	5q, 1-q31.2	Citosol/núcleo
Hsp90 (HtpG)	HspCA	14q32.3(4q3.5,11p14.1-14.2, 1q212-q22,pseudogenes)	Citosol/núcleo
	HspCB	6p12(4q21-q25, 15pter-q21, pseudogenes)	Citosol/núcleo
	TRAP1	16p13.3	Mitocôndria
Hsp70(DnaK)	HspA1A	6p21.3	Citosol/núcleo
	HspA1B	6p21.3	Citosol/núcleo
	HspA1L	6p21.3	Citosol/núcleo
	HspA2	14q24.1	Citosol/núcleo
	HspA3	21	Citosol/núcleo
	HspA5	9q33-q34.1	Retículo endoplasmático
	HspA6	1cen-qter	Citosol/núcleo
	HspA7	1q23.1	Citosol/núcleo
	HspA8	11q23.3-	Citosol/núcleo
	HspA9A	desconhecida em humanos cromossomo 18 em camundongos	Citosol/núcleo
	HspA9B	5q31.1	Citosol/núcleo
Hsp60(GroEL)	HspD1	12q-13.2	Mitocôndria, citosol?

Z Prohászka, 2004[56]

Essas proteínas possuem três atividades bioquímicas intrínsecas. A primeira é a atividade protetora a qual previne uma agregação proteica errada e ajuda na estabilização da conformação de proteínas desnaturadas até sua conformação original. Essa habilidade de estabilizar proteínas em conformações específicas é utilizada por uma variedade de processos de regulação fisiológica, incluindo o ciclo celular, o processamento de receptores de esteróides e vitamina D e, ainda, apresentação de antígenos. As Hsp com atividade protetora são a Hsp70, a Hsp90 e a Hsp60[56].

A segunda atividade essencial das Hsp é a regulação do estado de oxidação e redução celulares; isto é bem ilustrado pela Hsp32, mais conhecida como heme-oxigenase 1. Finalmente, o terceiro papel bioquímico das Hsp é a regulação do equilíbrio entre a síntese e da degradação proteica. É importante notar que todas as atividades das Hsp resumidas acima requerem a clivagem de ATP, que é catalisado pelas próprias Hsp[49].

O importante papel fisiológico dessas proteínas é enfatizado pela sua notável conservação através da evolução das espécies. Foi mostrado que homólogos das Hsp90 kDa, 70 kDa e 60kDa são induzidos em resposta ao calor em todos organismos estudados de bactérias a humanos. As Hsp90 humanas, por exemplo, apresentam 60% dos aminoácidos homólogos aos da proteína em leveduras e 78% com a proteína originada da *Drosophila.*[58]

O interesse imunológico sobre as Hsp envolve a noção de que as mesmas podem se comportar como autoantígenos e, sendo altamente

conservadas durante a evolução, gerar respostas autoimunes. Esta noção é aplicável a doenças como artropatias inflamatórias e diabetes mellitus.

Assim, a grande conservação das Hsp na evolução das espécies resulta em homológos das Hsp humanas em bactérias e protozoários. Assim, as Hsp exógenas constituem o principal alvo da resposta imune a esses patógenos; anticorpos e células T contra as Hsp exógenas têm sido detectadas em indivíduos infectados com organismos tão diferentes como Mycobacteria e protozoários como *Plasmodium falciparum* e *Schistossoma mansoni*[59]. Similarmente, anticorpos dirigidos contra a Hsp90 de *Candida albicans* são comumente observadas em infecções sistêmicas por *Candida* e algumas destas reagem com as Hsp90 humanas também.[60,61]

Embora nesses casos os anticorpos parecem ter um efeito protetor, em outros casos a capacidade de os anticorpos e as células T dirigidos contra Hsp de bactérias ou protozoários reagirem com Hsp humanas pode resultar em autoimunidade[62,63]. É improvável, entretanto, que uma resposta humoral a uma infecção microbiana seja suficiente para induzir uma doença autoimune, uma vez que anticorpos ou células T contra Hsp podem ser detectados tanto em indivíduos saudáveis como naqueles com doenças infecciosas como a tuberculose, sem evidência concomitante de autoimunidade.[64,65]

É provável que algum evento subsequente à exposição inicial às Hsp exógenas seja requerido como um “gatilho” a uma resposta autoimune, de uma resposta que foi inicialmente dirigida contra as Hsps bacterianas. O

desenvolvimento de uma condição autoimune também dependerá de cofatores adicionais como, por exemplo, suscetibilidade genética, equilíbrio hormonal ou dieta[66]. Entretanto, em alguns indivíduos, esses fatores aparecem após a uma exposição inicial a Hsp exógenas, um segundo evento como uma infecção viral poderia levar a um aumento da expressão das Hsp humanas ou de suas localizações na superfície. Esta, por sua vez, induziria anticorpos e células T preparadas contra as bactérias ou mesmo proteínas de protozoários, reagindo contra proteínas humanas, o qual pode ser um importante evento desencadeador para a autoimunidade.[67]

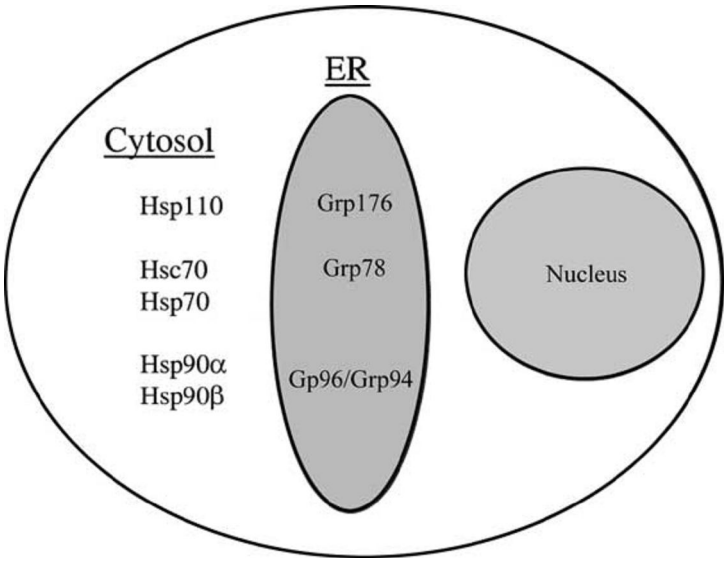
Considerando-se esta hipótese, importante atenção tem sido dada ao papel da Hsp60 em modelos animais de artrite reumatoide, como a indução da artrite adjuvante em ratos. Evidências apontam, também, para um importante papel da Hsp90 no LES.[68] As Hsp microbianas, como a Hsp70 de micobactérias, estão sendo levadas em consideração ao contribuir para o desenvolvimento de vacinas. Também as Hsp, como antígenos, têm sido implicadas em rejeição alogênica.[69]

1.18 Hsp90 - Estrutura e características moleculares

Sabe-se que a Hsp90 constitui cerca de 1% do total de proteínas celulares em células não estressadas. Esta proteína é codificada por dois genes,

Hsp90α e Hsp90β[70,71], os quais são regulados por vias levemente diferentes, embora sejam ambos induzíveis pelo calor. Se qualquer um desses genes for inativado, a célula é incapaz de desenvolver-se sob altas temperaturas (>37,5ºC). Se ambos genes estiverem inativados, a célula torna-se inviável.[72]

A figura 1 mostra que, em vertebrados, dois diferentes membros das Hsp70(Hsp70 e HSC70) são expressos no citoplasma da mesma forma que a Hsp90α e Hsp90β[73,74,75]. O outro membro da família Hsp90, gp96, situa-se no lúmen do retículo endoplasmático (pricipalmente no retículo endopasmático rugoso[76]); e é a mais abundante proteína do retículo endoplasmático.[77]



Robert J[78] Dev Comp Immunol. 2

Figura 1: Localização intracelular de diferentes membros das famílias de Hsp70 e Hsp90 em células eucarióticas

A Hsp90 possui 2 formas, α e β, as quais são idênticas em cerca de 85 % de sua sequencia de aminoácidos[70]. A isoforma Hsp90-β é maior que a Hsp90-α, sendo também conhecidas como Hsp86 e Hsp84. A isoforma β é mais expressada constitutivamente, sendo menos induzível, e o contrário ocorre com forma α[70].

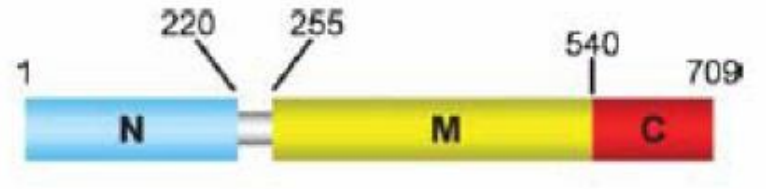
A Hsp90-β é encontrada no citoplasma, com uma grande quantidade de proteína localizada nos arredores do envelope nuclear.[79] Esta isoforma pode ser fosforilada pela proteína quinase dependente de DNAds em seus resíduos de treonina do N-terminal[80]. A Hsp90-α predomina no cérebro e testículos e encontra-se em grande quantidade em outros órgãos periféricos.[81]

Somente uma característica bioquímica distingue a isorfoma α da β: Hsp90α existe predominantemente como um homodímero, enquanto que a Hsp90β existe, também, como um monômero.[82,83]

Ambas formam principalmente homodímeros encontrando-se principalmente na forma β por ser mais estável devido a pequenas diferenças na dimerização do C- terminal.[84,85]

As Hsp90, em células de vertebrados, têm sido extensivamente estudadas; a forma dímera da Hsp90, quando submetida a estímulos, é achada em associação com um grande número de proteínas-chaves, como os receptores para os hormônios esteroidais ou as tirosina quinase Src, em sua forma inativa até convertê-las em seu estado ativo quando as células são expostas a esteroides ou fatores de crescimento, respectivamente.[85,86]

A figura 2 mostra o esquema dos domínios estruturais da Hsp90 em leveduras. O estudo desta proteína em leveduras foi essencial a fim de analisar, tanto a relação entre a estrutura e a função da Hsp90[82] por si mesma, como também para caracterizar outras moléculas "chaperones" que colaboram funcionalmente com ela.[87,88,89,90]



Pearl and Prodromou Annu Ver Biochem[82] ,2006.

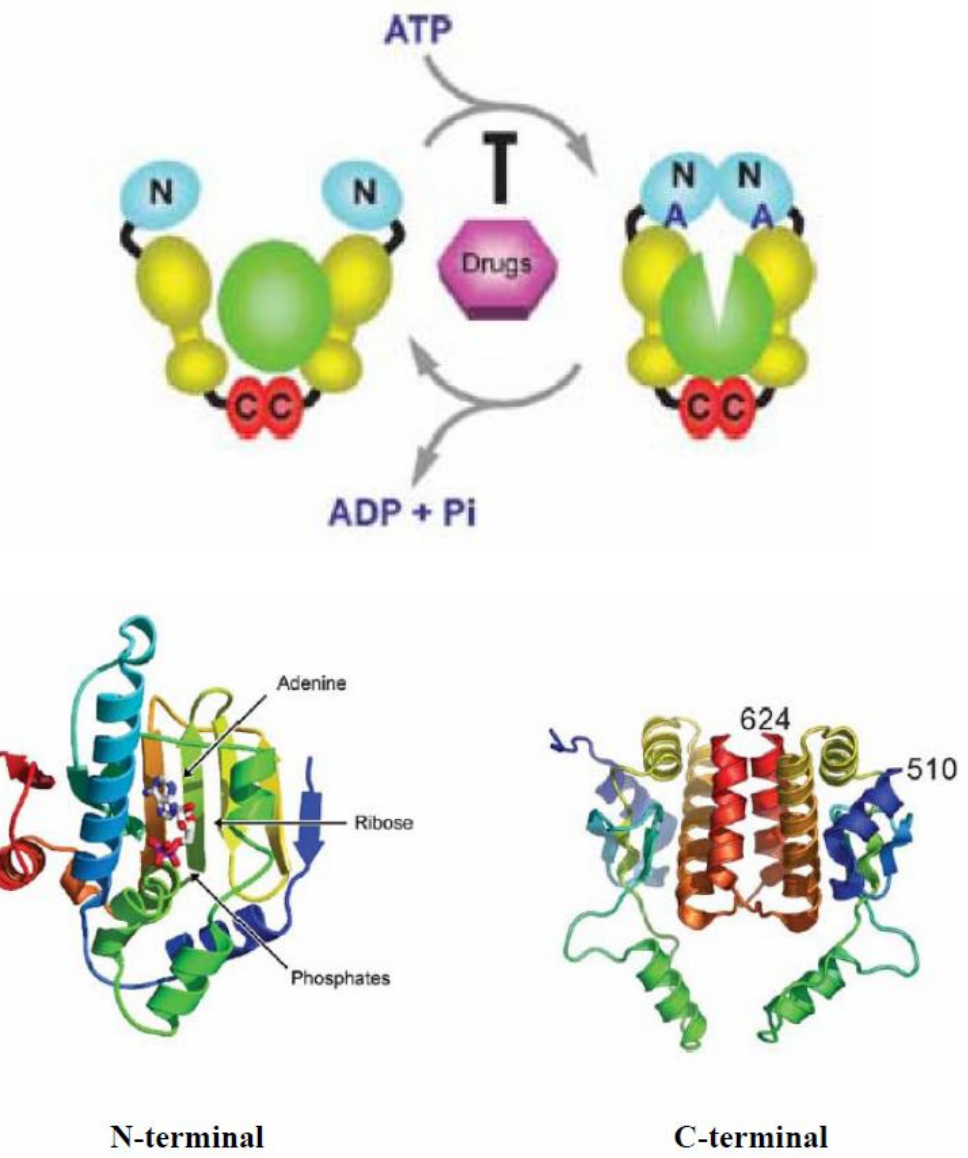
Figura 2: Esquema dos domínios estruturais da Hsp90 em leveduras. O segmento entre as regiões **N** e **M** é variável tanto no comprimento quanto em composição entre as espécies diferentes

A Hsp90 é um dímero fosforilado[91,92] que contém entre 2 a 3 ligações covalentes de moléculas de fosfato por monômero[93]. A dimerização é necessária para a função vital da proteína.[94]

Como outras moléculas "protetoras", a Hsp90 é bastante hidrofóbica. A hidrofobicidade aumenta com o choque térmico. Também forma complexos com numerosas fosfatases e proteínas quinases e ainda pode estar unida a outra série de proteínas como os receptores de hormônios nucleares[95], actina,[96,97] tubulina,[98] fator-1 de choque térmico[99], calmodulina[100] e proteosoma.

A ligação da Hsp90 com o Cdc37 das quinases se realiza através do domínio catalítico da Hsp90.[101,102,103,104] O domínio da Hsp90 utilizado para a ligação inclui regiões envolvidas na dinâmica das quinases durante a ativação e o ciclo catalítico.[105]

Desde os primeiros estudos no assunto, sabe-se que a Hsp90 apresenta sítio de ligação com o ATP, e que pode deflagar auto-fosforilação[106]. A ligação ao ATP leva a uma grande mudança conformacional na Hsp90[107], como evidencia a figura 3.



Pearl and Prodromou Annu Ver Biochem[82] 2006.

Figura 3: Modelo atual para a mudança conformacional da Hsp90 ao se ligar ao ATP. **N** é a região amino terminal a **C** a região carboxila terminal

Ainda que a estrutura primária da Hsp90 seja conhecida há anos, ainda restam alguns segmentos cujo papel funcional se desconhece.

O gene que codifica a Hsp90-α é o 14q32.3. Também se tem visto segmentos cromossômicos como 1q21.2-q22, 4q35 e 11014.1-p14.2 que, provavelmente, contenham pseudogenes para esta isoforma.[108]

A isoforma Hsp90-β, expressada constitutivamente, está codificada pelo gene 6p-21 e, também se tem encontrado pseudogenes em cromossomos 4q21-q25 e 15pter-q21.[109]A expressão destas proteínas é regulada por fatores de transcrição específicos denominados fatores das Hsp.

De uma forma geral esta expressão se baseia em condições normais, mas encontra-se aumentada em situações de estresse.[110,111]Estudos têm demonstrado que os níveis basais de algumas Hsp aumentam com a idade em células mononucleares periféricas (PBMCs). Também comprovou-se que outras proteínas deste tipo, como Hsp32 ou Hsp70 estão relacionadas à presença de citocinas inflamatórias do tipo IFN-γ, Il-6, IL-10 e TNF-α.[112]

1.19 Hsp90 e LES

Há vários trabalhos demonstrando que o níveis de Hsp90 encontram-se elevados em pacientes com LES, tanto em PBMCs como em soros, não se tendo observado aumentos significativos de outras Hsp.[109,110] A uma maior quantidade de Hsp90 disponível, pode incidir a síntese proporicional de autoanticorpos contra esta proteína.[113,114]

A geração de uma resposta imune à elevação de Hsp90 em LES provavelmente requer proteínas localizadas na superfície, onde poderiam se tornar acessíveis ao sistema imune. Contrariamente, em muitas situações, a Hsp90 está localizada no citoplasma da célula. Entretanto uma biodisponibilidade da Hsp90 na superfície celular foi demonstrada em várias situações, notavelmente infecções virais,[115] transformações de linhagens celulares após estimulação de linfócitos por fito-hemaglutinina (PHA)[116] ou estimulação de monócitos HL60 por PMA (um análogo do diacilglicerol).[117]

Estudos mostraram que a expressão de Hsp90 na superfície também ocorre em pacientes com LES. Por citometria de fluxo, Hsp90 foi detectada em monócitos ou linfócitos de sangue periférico em aproximadamente 20% dos pacientes com LES; de interesse, a expressão de superfície de Hsp60 ou Hsp70 não foi observada nesses pacientes, o que sugere uma particular relevância da Hsp90 nesta doença.[118]

Também se tem visto que o aumento de Hsp90 em PBMCs de pacientes com LES está associado ao aumento da transcrição do gene para a forma Hsp90-β[119], que por sua vez é induzida pelas citocinas IL-6[120] e IL-10,[121] as últimas, além de se encontrarem aumentadas em pacientes com LES,[122,123] estão correlacionadas com a atividade da doença. Estes dados foram confirmados por Stephanou et al (1998) em camundongos MRL/1pr, onde encontraram-se dados praticamente idênticos.[124]

2 JUSTIFICATIVAS PARA O ESTUDO

O LES é uma típica doença autoimune caracterizada pela produção de anticorpos contra antígenos nucleares em associação com manifestações clínicas variáveis. Durante as últimas décadas, estudos sobre o sistema imune in vivo e em modelos animais forneceram novas luzes na compreensão da etiopatogenia da doença. Nestes modelos, quase que invariavelmente foi ressaltado o papel dos autoanticorpos na desregulação imune e injúria tecidual.

Sabidamente, algumas moléculas próprias do indivíduo podem deflagrar uma resposta autoimune. Neste contexto, enquadramos neste estudo a Hsp90, proteína de grande interesse na formatação e apresentação de antígenos para o sistema imunológico. A eventual ocorrência de autoanticorpos anti-Hsp90 na população lúpica (com doença ativa ou não) pode fornecer dados adicionais para a compreensão da complexa etiopatogenia desta afecção.

Poucos são os relatos, principalmente em âmbito nacional, que focaram o binômio anti-Hsp90 e LES até o momento, o que contribui para a relevância do presente estudo.

3 OBJETIVO

Avaliar os níveis de anticorpos anti-Hsp90 em pacientes com LES (ativo ou não) e em controles sadios.

4 HIPÓTESES

4.1 Hipótese operacional:

Os níveis de anticorpos anti-Hsp90 circulantes não se encontram elevados em pacientes com LES ativo comparativamente a pacientes com doença inativa e controles sadios.

4.2 Hipótese conceitual

Os níveis de anticorpos anti-Hsp90 circulantes se encontram elevados em pacientes com LES ativo comparativamente a pacientes com doença inativa e controles sadios.

5 REFERÊNCIAS

1. James W; Berger T; Elston D. **Andrews' Diseases of the Skin: Clinical Dermatology**. 10th ed. Saunders; 2005.p 540-41.
2. Ferreira M, Salgueiro AB, Estrada J, Ramos J, Ventura L, Vale MC, Barata D. Lúpus eritematoso sistêmico. **Acta Medica Portuguesa** 2008; 21(2): 199-204.
3. Sato EI, Bonfá ED, Costallt LTL, Silva NA, Brenol JCT,Santiago MB, Szajubok JCM, Rachid-Filho A, Barros RT, Vasconcelos M, Albuquerque EMN . Sociedade Brasileira de Reumatologia. **Projeto Diretrizes – Lúpus Eritematoso Sistêmico: Tratamento do Acometimento Cutâneo/articular**. 2004.
4. D'Cruz DP, Khamashta MA, Hughes GR. Systemic Lupus erithematosus. **Lancet** 2007; 369(9561):587-96.
5. Hahn, B H. Lupus eritematoso sistêmico. In: Fauci AS, Braunwald E, Kasper D, Hauser SL, Longo DL, Jameson L. **Harrison: Medicina Interna**. 17 ed. Rio de Janeiro. McGraw-Hill; 2008. p.2075-2083.
6. Cassidy JT, Petty RE . Systemic lupus erythematosus. In: Cassiddy JT, Petty RE, eds. **Textbook of Pediatric Rheumatology**. Philadelphia: W. B. Saunders Company 2001; p. 218-321.
7. Bader-Meunier B, Quartier P, Deschênes G et al: Childhood-onset systemic lupus erythematosus. **Arch Pedriatr** 2003;10(2):p.147-57.

8. Vilar MJP, Rodrigues JM; Sato, EI. Incidência de lúpus eritematoso sistêmico em Natal, RN – Brasil. **Rev Bras Reumatol** 2003; 43(6):347-351.

9. Sato EI. Lupus eritematoso sistêmico. In: **Guia de Reumatologia – UNIFESP**. Baureri: Manole, 2004.p. 139-154.

10. Freire BFA. Lupus eritematoso sistêmico: novo fator de risco para aterosclerose ? **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. 2006. São Paulo, v. 87 n. 3. ISSN 0066-782X *versão impressa.*

11. Lusis AJ, Mar R, Pajukanta P. Genetics of atherosclerosis. **Annu Rev Genomics Hum Genet**. 2004;5: 189-218.

12. Wilson PW, D'Agostino RB, Levy D, Belanger AM, Silbershastz H. Prediction of coronary heart disease using risk. **Circulation**. 1998; 97:837-847.

13. Wich G, Knoflach M, Xu Q. Autoimmune and inflammatory mechanisms in atherosclerosis. **Ann Rev Immunol**. 2004; 22:361-403.

14. Johsson H, Nived O, Sturfelt G. Outcome of systemic lupus erythematosus: a prospective sutdy of patients from a defined population. **Medicine (*Baltimore***) 1989; 68:141-150.

15. de Carvalho JC, Bonfá E, Borba EF. Lupus erythematosus systemic and "lupus dyslipoproteinemia". **Autoimmune Rev** 2008; 7:246-50.

16. MacGregor A, Dhillon VB, Binder A, Forte CA, Knight BC, Betteridge DJ, Isenberg DA. Fasting lipids and anticardiolipin antibodies as risk factors for vascular disease in systemic lupus erythematosus. **Ann Rheum Dis** 1992; 51:152-55.

17. Hocheberg MC. Updating the American College of Reumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum** 1997; 40:1725.

18. Shur, PH. Lupus Eritematoso Sistêmico. In: Cecil RL, Goldman L, Ausiello D. In: **Cecil: Tratado de Medicina Interna**. 22ª ed. Rio de Janeiro. Elsevier 2005. p. 1937-1949.

19. Oliveira SKF. Lupus Eritematoso Sistêmico Juvenil. In: **Reumatologia para Pediatras**. Rio de Janeiro: Revinter, 2003. cap 6, p.132-152.

20. Petty R, Laxer R. Systemic Lupus Erythematosus. In: **Cassidy T et al. Textbook of Pediatric Rheumatology**. 5ª ed. USA: Elsevier Saunders, 2005. cap16, p.342-391.

21. Azevedo ARM. Lupus Eritematoso Sistêmico em Crianças e Adolescentes. Niterói, 2001. **Dissertação-Faculdade de Medicina, Universidade Federal Fluminense,** Niterói, 2001.p 20 – 27.

22. McGhee JL, Kickingbird LM, Jarvis JN. Clinical utility of antinuclear antibodies tests in children. **BMC Pedriatr** 2004; 9:4-12.

23. Moore JE, Lutz WB. The natural history of systemic lupus erythematosus: on approach to its study through chronic biologic false positive reactors. **J Chron Dis** 1955; 1:297-316.

24. Borba Neto EF, Bonfá E. Lupus Eritematoso Sistêmico. In: **Tratado de Clínica Médica.** São Paulo: Roca, 2006 1:1595-1604.

25. Rothfield NF. Systemic lupus erythematosus: clinical aspects and treatment. In: McCarty DJ, Koopman WJ. **Arthritis and allied conditions**. 12ª ed. Philadelphia: Lea & Febiger 1993; p.155-77.

26. Agarwal S, Elliott JR, Manzi S. atherosclerosis risk factors in systemic lupus erythematosus. **Curr Rheumatol Rep** 2009; 4:241-7.

27. Von Feldt JM. Premature Atherosclerotic Cardiovascular Disease and Systemic lupus Erythematosus. **Bull NYU Hosp Jt Dis** 2008; 66(3):184-7.

28. Frostegard J. SLE, atherosclerosis and cardiovascular disease. **Journal of Internal Medicine** 2005; 257:485-495.

29. Weening JJ, D'Agati VD, Schwartz MM, Seshan SV, Appel GB, Balow JE et al. The classification of glomerulonephrtis in systemic eythematosus revisited**. J Am Nephrol**. 2004; 15(2):241-50.

30. The American College of Rheumatology nomenclature and case definitions for neuropsychiatric lupus syndromes. **Arthritis Rheum** 1999; 42(4):599-608.

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

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

33. Vitali C, Bencivelli W, Isenberg DA, Disease activity in systemic lupus erythematosus of the Consensus Study Group of the European Workshop for rheumatology Research. II. Identification of the variables in the development of na activity score. The European Consensus Study Group for Disease Activity in SLE. **Clin Exp Rheymatol** 1992;10:541-47.

34. Symmons DP, Coppock JS, Bacon PA et al. BILAG 2004. Development and assessment of a computerized index of clinical disease activity in systemic lupus erythematosus. Members of the British Isles Lupus Assessment Group (BILAG). **Q J Med** 1988;69:927-37.

35. Gladman D, Ibañez D, Urowitz M. Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index 2000. **J Rheumatol** 2002;29:288-91.

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

37. Meinao IM, Sato EI, Andrade LE, Ferraz MB, Atra E. Controlled trial with chloroquine diphosphate in systemic lupus erythematosus. **Lupus** 1996; 5:237-41.

38. The Canadian Hydroxychloroquine Study Group. A randomized study of the effect of withdrawing hydroxychloroquine sulfate in systemic lupus erythematosus. **N. Engl J Med** 1991;324:150-4.

39. Petri M, Lakatta C, Magder l, Goldman D. Effect of prednisone and hydroxychloroquine on coronary disease risk factors in systemic lupus erythematosus: a longitudinal data analysis. **Am J Med** 1994;96:254-9.

40. Borba EF, Bonfá E. Long term beneficial effect of chloroquine diphosphate on lipoprotein profile in lupus patients with and without steroid therapy. **J Rheumatol** 2001;28:780-5.

41. Maccune WJ, Riskalla M, Immunossupressive drug therapy. In: Wallace DDJ, Hahn BH, editors. **Dubois lupus erythematosus**. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2002 p.1195-217.

42. Carneiro JR, Sato EI Double blind, randomized, placebo controlled clinical trial of methotrexate in systemic lupus erythematosus. **J Rhematolol** 1999;26:1275-9.

43. Kalanian K, Joan TM. New directions in the treatment of systemic lupus erythematosus. **Curr Med Res Opin** 2009;Maio 11 [no prelo].

44. Robak E, Robak T. monoclonal antibodies in the treatment of systemic lupus erythematosus. **Curr Drug targets** 2009;10:26-37.

45. Sibilia J, Pasquali JL. Systemic lupus erythematosus: news and therapeutic perspectives. **Presse Méd** 2008;37:444-59.

46. Lindquist S. The heat shock response. **Ann Rev Biochem** 1986;55:1151-91.

47. Lindquist S, Craig EA. The heat shock proteins. **Ann Rev Gen** 1988;22:631-77.

48. Csermeley P, Schnaider T, Soti C, Prohászka Z, Nardai G. The 90-kDa molecular chaperone family: struture, funcion and clinical applications. A comprehensive review. **Pharmacol Ther** 1998;79:129-68.

49. Conroy SE, Faulds GB, Williams W, Latchman DS, Isenberg DA. Detection of autoantibodies to the 90 kDa heat shock protein in systemic lupus erythematosus and other autoimmune diseases. **Br J Rheumatol**. 1994;33(10):923-6.

50. Horváth L, Czirjak L, Fekete B, Jarab L, Prohászka Z,Cervenak L et al. Levels of antibodies against C1q and 60 kDa family of heat shock proteins in the sera of patients with various autoimmune diseases. **Immunology Letters** 2001;75:103-9.

51. Zhu J, Quyyumi AA, Rott D, Csako G, Wu H, Halcox J, Epstein SE. Antibodies to human heat-shock protein 69 are associated with the presence and severity of artery disease. **Circulation.**2001;103:1071-1075.

52. Pockley AG, Frostegard J. Heat shock proteins in cardiovascular disease and prognostic value of heat shock protein related measurements. **Heart** 2005;91:1124-6.

53. Staub HL, Norman GL, Crowther TM, Cunha VR, Polanczyk A, Bohn JM, Fernandes JG, Chahade WH, von Mühlen CA. Antibodies to the atherosclerotic plaque components beta2- glycoprotein I and heat shock-proteins as risk factors for acute cerebral ischemia. **Arch Neuropsychiatr** 2003; 61: 757-763.

54. Pick E, Kluger Y, Giltane JM, Moeder C, Camp RL, Rimm DL, Kluger HM. High Hsp90 expression is associated with decreased survival in Breast Cancer. **Câncer Research** 2007; 67:2932-37.

55. Kim JJ, Lee SJ, Toh KY, Lee CU, Lee C, Paik IH. Identification of antibodies to heat shock proteins 90 kDa and 70 kDa in patients with schizo phrenia. **Schizophr Res** 2001;52:127-35.

56. Prohászka Z, Füst G. Immunological aspects of heat shock proteins – the optimum stress of life. **Mol Immunol** 2004; 41(1):29-44.

57. Stephanou A, Latchman DS, Isenberg DA. The regulation of the heat shock proteins and their role in the systemic lupus erythematosus. **Semin Arthritis Rheum** 1998;28(3):155-62.

58. Rebbe NF, Ware J, Bertina RM et al. Nucleotide sequence of a cDNA for a member of the 90-kDa heat-shock protein family. 1987; **Gene** 53:235-245.

59. Young RA, Elliott TJ. Stress porteins infection and immune surveillance. **Cell** 1989; 59:5-8.

60. Matthews R, Burnie J. The role of Hsp90 in fungal infection. **Immunoly Today**. 1992; 13:345-48.

61. Mathewus R. *Candida albicans* hsp90. Link between protective and autoimmunity. **J. Med. Microbiology** 1992;36:367-70.

62. Kaufmann SH. Heat shock proteins and the immune response. **Immunol Today** 1990;11,129-36.

63. Van Eden W, Van Der Zee R, Paul AG, Prakken BJ, wedling U, Anderton SM, Wauben MH. Do heat shock proteins control the balance of T-cell regulation in inflammatory diseases? **Immunol Today** 1998;19:303-7.

64. Kindas-Mügge J, Steiner G, Smolen JS, Similar frequency of autoantibodies against 70kD class heat shock proteins in healthy subjects and systemic lupus erythematosus patients. **Clin Exp Immunol** 1989; 92:46-50.

65. Rees A, Scoging A, mehlert A. Specificity of proliferative response of human CD8 clones to mycobacterial antigens. **Eur J Immunol** 1988; 18:1881-87.

66. Shoenfeld Y, Isenberg DA. The mosaic of Autoimmunity. **Amsterdam, Elsevier**, 1989.

67. Latchman DS, Isenberg DA. The role of Hsp90 in SLE. **Autoimmunity** 1994;19:211-18.

68. Dhillon VB, Latchman DS, Isenberg DA. The expression of heat shock proteins in systemic lupus erythematosus. *In*: **Fundamental and Experimental Aspects of autoimmunity** ed. M. Zoulai. Springer-Verlag 1994;22:90-94.

69. Birk OS, Gur SL, Ellias D. The 60-kDa heat shock protein modulates allograft rejection. **Proc Natl Acad Sci USA** 1999;96:5159-63.

70. HIckey E, Brandon SE, Sadis S, Smale G, Weber L. Molecular cloning of sequences encoding the human heat shock proteins and their expression during hyperthermia. **Gene** 1986; 43:147-154.

71. Hickey E, Brandon SE, Sadis S., Smale G., Weber L. Sequence and regulation of a gene encoding a human 89 kilo dalton heat shock protein. **Molecular and cellular biology** 1989;9:2615-26.

72. Borkovich KA, Farrelly FA, Finkelstein DB, Taulien J, Lindquist S. Hsp90 is na essential protein that is requered in higher concentrations for growth of cells at higher temperatures. **Mol Cell Biol** 1989;9:3919-30.

73. Krone PH, Sass J. Hsp90a and hsp90b genes are present in zebrafish and the differentially regulated in developing embryos. **Biochem Biophys Res Commum** 1994;204:746-52.

74. Moore SK, Kozak C, Robinson EA, Ullrich SJ, Appella E. Murine 86-and 84-kDa heat shock proteins, cDNA sequences, chromossome assigments, and evolutuionary origins. **J Biol Chem** 1989;264:5343-51.

75 . Gupta RS. Phytogenetic analysis of 90 kDa heat shock family of protein sequences and an examination of the relatioship among animals, plants, and fungi species. **Mol Evol** 1995;12:1063-73.

76 . Peter F, Van PN, Soling H-D. different sorting of Lys-Asp-Glu-Leu proteins in rat liver. **J Biol chem** 1992;267:10631-7.

77 Koch G, Smith M, Macer D, Webster P, Mortara R. Endoplasmic reticulum contains a common, abundant calcium-binding glycoprotein, endoplasmin. **J Cell Sci** 1986:86:217-32.

78 . Robert J. Evolution of heat shock protein and immunity. **Developmental and comparative Immunology** 2003;27:449-464.

79 . Perdew GH, Hord N, Hollenback CE, Welsh MJ. Localization and characterization of the 86- and 84-kDa heat shock protein. **Eur J Biochem** 1995; 209(2):350-6.

80 . Lees-Miller SP, Anderson CW. The human doublé-stranded DNA-activated protein kinase phosphorylates the 90-kDa heat shock protein, hsp90 alpha at two NH2-terminal threonine residues. **J Biol Chem** 1989;264(29):17275-80.

81 . Wandlinger SK, Richter K, Buchner J. The Hsp90 molecular chaperone machinery. **J Biol Chem** 2008; 283:18473-477.

82 Pearl LH, Prodromou C. Structure and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone machinery. **Annu Rev Biochem** 2006;75:271-94.

83 . Minami Y, Kawasaki H, Miyata Y, Susuki K, Yahara I. Analysis os native forms of and their isoforms compositions of the mouse 90kDa heat shock protein, HSP90. **J Biol Chem** 1991;266:10099-103 .

84 . Nemoto T, Ohara-Nemoto Y, Ota M, Takagi T, Yokoyama K . Mechanism of dimmer formation of the 90-kDa heat shock protein. **Eur J Biochem** 1995;233(1):1-8.

85 . Smith DG, Toft DO. Steroid receptors and their associated proteins. **Mol Endocrinol** 1993;7:1-11.

86 . Pratt WB, Scherrer LC, Hutchison, Dalman FC. A model of glicocorticoid receptor unfolding and stabilization by a heat shock protein complex. **J steroid Biochem** 1992;41:223-229.

87. Panaretou B, , Siligardi G, Meyer P**,** Maloney A**,** Sullivan JK **,** Singh S**,** Millson SH, Clarke PA**,** Naaby-Hansen S, Stein R**,** Cramer R**,** Mollapour M**,** Workman P**,** Piper PW**,** Pearl LH and Prodromou C. Activation of the ATPase activity of hsp90 by the stress-regulated cochaperone aha1. **Mol Cell** 2002. 10(6):1307-18.

88. Chang HC, Nathan DF, Lindquist S. In vivo analysis of the Hsp90 cochaperone Sti1(p60). **Mol Cell Biol** 1997; 17(1):318-25.

89. Dey B, lighboty JJ, Boschelli F. CDC37 is required for p60v-src activity in yesast. **Mol Biol Cell** 1997;7(9): 1405-17.

90. Fang Y, Fliss AE, Rao J, Caplan AJ. SBA1 encodes a yeast hsp90 cochaperone that is homologous to vertebrate p23 proteins. **N Mol Cell** 1998; 18(7):3727-34.

91. Lees-Miller, SP, Anderson CW. The human double-stranded DNA-activated protein kinase phosphorylates the 90-kDa heat-shock protein, hsp90 alpha at two NH2-terminal threonine residues. **J Biol Chem** 1989; 264(29):17275-80.

92. Rose DW, Wettenhall RE, Kudlicki W, Kramer G, Hardesty B. The 90-kilodalton peptide of the heme-regulated eIF-2 alpha kinase has sequence similatity with the 90-kilodalton heat shock protein. **Biochesmistry** 1987; 26(21):6583-7.

93. Iannotti AM, Rabideau DA, Dougherty JJ. Characterization of purified avian 90,000-Da heat shock protein. **Arch Biochem Biophys** 1988;264(1): 54-60.

94. Minami Y, Kimura Y, Kawasaki H, Suzuki K, Yahara I. The carboxi-terminal region of mammalian HSP90 is requered for its dimerization and function in vivo. **Mol Cell Biol** 1994; 14(2):1459-64.

95. Pratt WB. The role of the hsp90-based chaperone system in signal transduction by nuclear receptors and receptors signaling via AMP kinase. **Annu Rev Pharmacol Toxicol** 1997; 37:297-326.

96. Koyasu S, Two mammamian heat shock proteins, Hsp90 and Hsp100 are actin-binding proteins. **Proc Natl Acad Sci USA** 1986;83(21):8054-8.

97. Czar MJ, Welsh MJ, Pratt WB. Immunofluorescence localization of the 90-kDa heat shock protein to cytoskeleton. **Eur J Cell Biol** 1996; 70(4):322-30.

98. Williams NE, Nelsen EM. HSP7- and HSP90 homologs are associated with tubulin in hetero-oligomeric complexes, cilia and the córtex of Tetrahymena**. J Cell Biol Sci** 1997;110(14):1665-72.

99. Nadeau KA, Das A, Walsh CT. Hsp90 chaperonins posses ATPase activity and bind heat shock protein transcription factors and peptidyl propyl isomerases. **J Biol Chem** 1993;268(2):1479-87.

100. Minami Y, Kawasaki H, Suzuki K, Yahara I . The calmodulin-binding domain of the mouse 90 kDa heat shock protein. **J Biol Chem** 1993;268(13):9604-10.

101. Terasawa K, Yoshimatsu K, Iemura S, Natsume T, Tanaka K, Minami Y. Cdc37 interacts with the glicine-rich loop of Hsp90 client kinases. **Mol Cell Biol** 2006; 26(9):3378-89.

102. Prince T, Sun L Matts RL. Cdk2: a genuine protein kinase client of hsp90 and Cdc37. **Biochesmistry** 2005;44(46):15287-95.

103. Caplan AJ, Mandal AK, Theodoraki MA. Molecular chaperones and protein kinase quality control. **Trends Cell Biol** 2007;17(2):87-92.

104. Zhao Q, Boschelli F, Caplan AJ, Arndt KT. Identification of a conserved sequence motif that promotes Cdc37 and cyclin D1 binding to Cdk4. **J Biol Chem** 2004;279(13):1256-4.

105. Huse M, Kuriyan J. The conformational plasticity of protein kinases. **Cell** 2002;109(3):275-82.

106. Csermely P, Kahn CR. The 90-kDa heat shock protein (hsp90) possesses na ATP binding site and autophosphorylating activity. **J Biol Chem** 1991;266(8):4943-50.

107. Csermely P, Kajtár J, Hollósi M, Jalsovszky G, Holly S, Kahn CR, Gergely P Jr, Söti C, Mihály K, Somogyi J. ATP induces a conformational change of the 90-kDa heat shock protein 90 (hsp90). **J Biol Chem** 1993; 268(3):1901-7.

108. Ozawa K, Murakami Y, Eki T, Soeda E, Yokoyama K. Mapping of the gene family for human heat-shock protein 90 alpha to chromossomes1, 4, 11 and 14. **Genomics** 1992;12(2):214-20.

109. Takahashi I, Tanuma R, Hirata M, Hashimoto K. A cosmid clone at the D6S182 locus on human chromossome 6p12 contains the 90-kDa heat shock protein beta gene (HSPbeta). **Mamm Genome** 1994;5(2):121-2.

110. Njemini R, Bautmans I, Lambert M, Demanet C, Mets T. Heat shock proteins and chemokine/cytokine secretation profile in ageing and inflammation. **Mech Ageing Dev** 2007;128(7-8):450-4.

111. Wallin RP, Lundqvist A, Moré SH, von Bonin A, Kiessling R, Ljunggren HG .Heat shock proteins as activators of innate immune systems. **Trends Immunol** 2002;23(3):130-5.

112. Njemini A, Lambert M, Demanet C, Kooijman R, Mets T. A high-affinity conformation of levels of heat shock proteins in human aging. **Biogerontology** 2007;8(3):353-64.

113. Latchman DS, Isenberg DA. The role of hsp90 in SLE. **Autoimmunity** 1994;25(4):295-9.

114. Latchman DS. Heat shock protein and human disease. **J R Coll Physicians Lond** 1991;25:(4):295-9.

115. La Tangue NB, Latchman DS. A celular protein related to heat shock protein 90 accumulates during herpes simples vírus infection and over-expression in transformed cells. **Experimental Cell Research** 1988;178:169-79.

116. Haire RN, Peterson Ms, O'Leary JJ. Mitogen activation induces synthesis of two heat-shock proteins in human lymphocytes. **J Cell Biol** 1988;106:883-91.

117. Jarjour W, Tsai V, Woods V, Welch W, Pierce SM, Mchta H, Dillmann W, Zvaifler N, Winfield J. Cell surface expression of heat shock proteins. **Arthritis and Rheumatism**. 1989;32:S44.

118. Erkeller-Yusel FM, Isenberg DA, Latchmen DS, Lydyard PM. Surface expression of heat shock protein 90 by blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus. **Journal of autoimmunity** 1992;5:803-14.

119. Twoney BM, Dhillon VB, McCallum S, Isenberg DA, Latchman DS. Elevated of the 90 kD heat shock protein in patients with systemic lupus erythematosus are dependent upon enhanced transcription of the hsp90 beta gene. **J Autoimmun** 1993;6(4):495-506.

120. Stephanou, A. Interleukin 6 activates heat shock protein 90 beta gene expression**. Biochem** 1997;321(Pt1):103-6.

121. Rypley BJ. Interleukin-10 activates heat shock protein 90beta gene expression. **Immunology** 1999;97(2):226-31.

122. Linker-Israeli M, Deans RJ, Wallace DJ, Prehn J, Ozeri-Chen T, Klinenberg JR. Elevated levels of endogenous IL-6 in systemic lupus erythematosus. A putative role in pathogenesis. **J Immunol** 1991;147(1):117-23.

123. Park YB, Lee SK, Kim DS, Lee J, Lee CH, Song CH. Elevated interleukin-10 levels correlated with disease acticity in systemic lupus erythematosus. **Clin Exp Rheumatol** 1998;16(3):283-8.

124. Stephanou A, Latchman DS, Isenberg DA. The regulation of heat shock proteins and their role in systemic lupus erythematosus. **Semin Arthritis Rheum** 1998;28(3): 155-62.

6 ARTIGO EM PORTUGUÊS

Anticorpos anti- Hsp90 e lúpus eritematoso sistêmico

Anti-Hsp90 antibodies and systemic lupus erythematosus

Ester Rosári Raphaelli Dal Ben[1], Henrique L. Staub[2]

---

[1] Farmacêutica-bioquímica. Mestranda em Medicina e Ciências da Saúde com ênfase em Clínica Médica da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS).
[2] Doutor em Reumatologia e Mestre em Imunologia Clínica. Professor Adjunto de Reumatologia da Faculdade de Medicina PUCRS. Professor do Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina da PUCRS.

Endereço para correspondência:
Ester Rosári Raphaelli Dal Ben
Serviço de Reumatologia
Hospital São Lucas – PUCRS
Av. Ipiranga 6690 – sala 220
CEP 90.610-000 – Porto Alegre – Brasil
Email: esterdalbem@ig.com.br

RESUMO

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença autoimune caracterizada por uma considerável diversidade de autoanticorpos circulantes. As proteínas de choque térmico (Hsp), altamente conservadas na evolução das espécies, são um possível alvo para autoanticorpos no LES. A resposta humoral contra a Hsp de 90 kilodaltons (Hsp90) no LES foi pouco estudada até o momento. **Material e métodos**: Neste estudo, tranversal controlado, avaliamos os níveis de anticorpos anti-Hsp90 em pacientes com LES ativo e inativo e em controles sadios. O diagnóstico de LES foi fundamentado nos critérios do Colégio Americano de Reumatologia de 1997. A presença de LES ativo foi confirmada através de SLEDAI acima de 4. Anticorpos IgG anti-Hsp90 foram testados através de ensaio imunoenzimático. Níveis acima de 2 desvios-padrões (DP) em relação à média dos controles foram arbitrariamente considerados positivos. Para comparar variáveis categóricas e contínuas e para obtenção de correlações foram utilizados testes não-paramétricos, test t e coeficiente de Pearson. **Resultados**: Quarenta e cinco pacientes com LES (42 do sexo feminino, 93,3%) e 25 controles sadios (22 do sexo feminino, 88%) foram avaliados. Vinte e dois dos 45 pacientes com LES (49%) apresentaram doença ativa. Proteinúria acima de 0,5 g/dia, alopécia, úlceras mucosas e artrite foram significativamente mais freqüentes no LES ativo do que na doença inativa. Pacientes com LES ativo apresentaram níveis médios de anti-Hsp90 significativamente acima dos controles ($P<0,001$). O teste de Pearson revelou correlação significante entre níveis de anti-Hsp90 e SLEDAI ($R = 0,51$, $P<0,001$). Dezesseis pacientes com LES (36%) tiveram teste positivo para anti-Hsp90 ($P<0,02$ em relação aos controles sadios). Um teste positivo para anti-Hsp90 foi significativamente mais freqüente no LES ativo quando comparado a controles ($P<0,001$) e LES inativo ($P<0,05$). Positividade para anti-Hsp90 se associou à ocorrência de anticorpos anti-DNA, leucopenia e trombocitopenia. A especificidade e a sensibilidade do teste para anti-Hsp90 foram de 100% e 36%, respectivamente. O likelihood ratio positivo (LR+) para anti-Hsp90 acima de 2 DP foi elevado (18,7). **Conclusões**: Os níveis médios de anticorpos anti-Hsp90 foram significantemente mais elevados no LES do que em controles. A testagem positiva para anti-Hsp90 pareceu ser associada à doença lúpica ativa, particulamente anticorpos anti-DNA e alterações hematológicas. O teste se mostrou altamente específico, mas com baixa sensibilidade em pacientes com LES. Em pacientes com níveis anticórpicos acima de 2 DP, a probabilidade de doença lúpica foi elevada. A utilização do anticorpo anti-Hsp90 como biomarcador no LES e outras doenças autoimunes deve ser avaliada em estudos futuros.

Palavras chave: Anti-Hsp90, lúpus eritematoso sistêmico, autoimunidade

ABSTRACT

Introduction. Systemic lupus erythematosus (SLE) is an autoimmune disease characterized by a considerable diversity of circulating autoantibodies. Heat shock proteins (Hsp), highly conserved in the evolution of species, are a possible target for autoantibodies in SLE. The humoral response to the 90 kilodaltons Hsp (Hsp90) in SLE was rarely addressed to date. **Material and methods**. In this cross-sectional and controlled study, we evaluated levels of anti-Hsp90 antibodies in active and inactive SLE patients and in healthy controls. Diagnosis of SLE was based on the American College of Rheumatology criteria of 1997. The presence of active SLE was confirmed by a SLEDAI above 4. IgG anti-Hsp90 antibodies were tested by immunoenzymatic assay. Levels above 2 standard deviation considering the average of controls were arbitrarly considered positive. To compare categoric and continuous variables and to estimate correlations, non-parametric, t test and Pearson coefficient were calculated. **Results**. Forty-five patients with SLE (42 females, 93.3%) and 25 controls 22 females, 88%) were evaluated. Twenty-two of the 45 SLE patients (49%) had active disease. Urinary protein above 0.5 grams/day, alopecia, oral ulcers and arthritis were significantly more frequent in active than inactive SLE patients. Patients with active SLE showed average levels of anti-Hsp90 significantly higher than controls ($P<0.001$). The Pearson test revealed a significant correlation of levels of anti-Hsp90 and SLEDAI ($R = 0.51$, $P<0.001$). Sixteen SLE patients (36%) had a positive test for anti-Hsp90 ($P<0.02$ in comparison to healthy controls). A positive test for anti-Hsp90 was significantly more frequent in active SLE when compared to controls ($P<0.001$) and inactive SLE ($P<0.05$). Positivity for anti-Hsp90 antibodies associated to occurrence of anti-DNA antibodies, leucopenia and thrombocytopenia. Specificity and sensitivity of the anti-Hsp 90 antibody test were 100% and 36%, respectively. The positive likelihood ratio (LR+) for anti-Hsp90 above 2 SD was elevated (18.7). **Conclusions**. The average levels of anti-Hsp90 antibodies were significantly higher in SLE patients than controls. A positive testing for anti-Hsp90 seemed to associated to active disease, particularly anti-DNA antibodies and haematological changes. The test was highly specific, but with low sensitivity in SLE patients. In patients with antibody levels above 2 SD, the probability of SLE was elevated. The utilization of anti-Hsp90 antibodies as biomarkers of SLE and other autoimmune diseases shall be evaluated in future studies.

Key words: Anti-Hsp90, systemic lupus erythematosus, autoimmunity.

1 INTRODUÇÃO

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença autoimune multifocal caracterizada por uma pletora de autoanticorpos. A detecção de alguns autoanticorpos como anti-DNA de dupla hélice e anti-Sm são de grande importância no diagnóstico da doença.[1] Outros, como os dirigidos contra antígenos de membrana de linfócitos, contribuem para a depleção de células T e para a disfunção imune característicos da doença LES.[2]

As proteínas de choque térmico (Hsp) são um grupo de proteínas altamente conservadas na evolução das espécies.[3,4,5,6] São classificadas por peso molecular. A expressão celular de Hsp é aumentada na presença de infecções, anoxia, estresse oxidativo e dano inflamatório.[5,6,7,8]

Tal conservação na evolução das espécies implica que proteínas homólogas às Hsp humanas se encontram presentes em agentes infecciosos. De interesse, anticorpos cruzados e células T autorreativas contra Hsp

exógenas e endógenas foram detectados em indivíduos infectados por diferentes tipos de micro-organismos.[9,10,11] Imunorreatividade contra Hsp60, Hsp70, e Hsp90 foram documentadas em várias doenças autoimunes.[13,14,15] As Hsp, altamente imunogênicas, seriam também capazes de exercer efeito positivo sobre a atividade de células apresentadoras de antígenos.[12]

As Hsp desempenham, também, funções fisiológicas. Neste contexto, incluem-se: a) auxílio na formatação de cadeias proteicas e no transporte intracelular de proteínas (Hsp60 e Hsp70, também conhecidas como chaperones); b) manutenção de proteínas em forma inativa em células não-estimuladas (Hsp90); c) atuação na degradação proteica (ubiquitina).[16,17] A ação das Hsp na formatação de proteínas desnaturadas é um processo ATP-dependente[17,18]. Em termos gerais, Hsp intracelulares são citoprotetoras, enquanto Hsp de superfície medeiam funções imunológicas. Na aterogênese, Hsp60 humanas homólogas a Hsp de agentes infecciosos são alvo de resposta humoral[19,20]. De acordo com dados recentes, a Hsp90 é hiperexpressa na placa aterosclerótica e no soro de pacientes com aterosclerose de carótidas, sendo, possivelmente, um autoantígeno nesta circunstância.[21]

A Hsp90, nosso foco de interesse neste estudo, é uma proteína citoplasmática abundante. Constitui 1% do total das proteínas de células não-estimuladas. A Hsp90 é codificada por dois genes (Hsp 90α e Hsp 90β), ambos indutíveis por ação térmica.[22,23,24] Na fisiologia celular, a Hsp90 é conhecida por manter proteínas-chaves, como receptores de esteróides ou tirosinaquinase Src, em forma inativa até converte-las em estado ativo quando as células são

expostas aos seus ligantes.[25] A expressão celular de Hsp90, Hsp70 e Hsp27 exerce efeito negativo sobre a apoptose desencadeada por estímulos como hipertermia e estresse oxidativo. As referidas Hsp, dados os efeitos antiapoptóticos, conferem resistência à ação de drogas anti-neoplásicas e aumentam a sobrevida de células tumorais.[26,27,28] De interesse, anticorpos anti-Hsp90 se correlacionaram positivamente com resposta à quimioterapia em pacientes com osteossarcoma.[29]

Respostas humorais anti-Hsp90 exacerbadas foram descritas em pacientes com crises maníacas agudas[30] e com doença enxerto versus hospedeiro.[31] Em pacientes com diabetes mellitus tipo I, embora os níveis de anti-Hsp90 não estejam elevados, o perfil isotípico da IgG anti-Hsp90 (IgG1, IgG3) diferiu daquele observado em controles sadios.[32] No que diz respeito à doenças infecciosas, níveis elevados de anti-Hsp90 foram detectados em pacientes com malária.[33]

Embora normalmente de localização citoplasmática, a Hsp90 é expressa na superfície de células mononucleares de sangue periférico em cerca de 20% dos pacientes com LES ativo.[34] Nesta localização, podem se tornar alvo de autoanticorpos. Estudos da década de 80 e 90 reportaram resultados conflitantes quanto a prevalência de anticorpos anti-Hsp90 (anti-Hsp90) no LES.[35,36]

Os ensaios laboratoriais para detecção de anti-Hsp 90 carecem de padronização. O presente estudo tem como objetivo primordial avaliar os níveis

de anti-Hsp90 em pacientes com LES ativo e inativo. O ponto de corte do teste será obtido a partir da testagem de controles sadios. Em paralelo, níveis de anti-Hsp90 serão correlacionados com atividade lúpica e associados com alterações clínicas setoriais da doença. As propriedades diagnósticas do teste serão também analisadas.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Pacientes

O estudo, transversal controlado, incluiu pacientes com LES atendidos no Ambulatório de LES do Serviço de Reumatologia do Hospital São Lucas da PUCRS (Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul), no período de 2008-2009. Pacientes com LES, de acordo com os critérios do Colégio Americano de Reumatologia (ACR) de 1997[37], foram selecionados de forma consecutiva. Os pacientes foram classificados para atividade lúpica de acordo com o SLEDAI[38] em LES ativo (SLEDAI≥4) e LES inativo (SLEDAI<4). A coleta das amostras ocorreu junto à avaliação dos pacientes. As orientações de terapia medicamentosa de cada paciente não foram modificadas neste estudo.

Voluntários saudáveis pareados por sexo e idade compuseram o grupo-controle. As amostras foram coletadas em junho de 2009, após o preenchimento de um questionário relativo às condições gerais de saúde dos mesmos. Indivíduos com queixas reumatológicas, outras doenças autoimunes e teste positivo para anticorpos antinucleares foram excluídos deste grupo.

2.2 Detecção de anticorpos anti-Hsp90

O ensaio imunoenzimático para anticorpos IgG anti-Hsp90 foi procedido de acordo com as orientações do fabricante: 100µL das amostras sorológicas diluídas em 1:100 com PBS-Tween (tampão fosfato salinizado com Tween) foram adicionados, em duplicata, a cada cavidade das placas de ELISA contendo o antígeno (Hsp 90 - Calbiochem – CA – USA) e incubados por 90 minutos à temperatura ambiente. Após este período, as placas foram lavadas três vezes com solução de lavagem (ELISA Plate Wash - Calbiochem). Adicionou-se, em cada cavidade, 100 µL de IgG de cabra conjugado com peroxidase e incubou-se por mais 60 minutos. Após lavagem e secagem das placas, adicionou-se 100 µL do substrato TBM (3,3',5,5'-tetrametil-benzidina) em cada cavidade e incubou-se durante 15 minutos à temperatura ambiente. Finalmente, adicionou-se 100 µL da solução de parada (H_2SO_4 2,5N). A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Microplate BIO-TEK Instruments, modelo EL311) em 450 nm. Os resultados foram considerados válidos quando o

branco de substrato apresentou uma densidade óptica menor que 0,050. O teste para anticorpos anti-Hsp90 foi considerado arbitrariamente positivo em pacientes com LES se o valor da densidade óptica, descontando-se a densidade óptica do branco de substrato, fosse maior do que 2 DP em relação à média dos controles sadios. Todos os ensaios, casos e controles, correram simultaneamente.

2.3 Análise Estatística

Para a comparação de variáveis categóricas, utilizou-se o teste do qui-quadrado e o teste de Fisher. O teste t foi usado na comparação de variáveis contínuas. A análise de variância foi empregada para variáveis quantitativas, lançando-se mão de log para variáveis assimétricas. Foram considerados estatisticamente significativos valores P menores que 0,05. A correlação entre SLEDAI e níveis de anti-Hsp90 foi avaliada através do teste de Pearson. As propriedades diagnósticas do teste incluíram cálculo de sensibilidade, especificidade e razão de verossimilhança positiva (likelihood ratio positivo, LR+). A escala de Deeks foi utilizada na interpretação do LR+: valores acima de 10 para determinado teste se associam à probabilidade considerável de doença e relevante impacto na decisão clínica[39].

3 RESULTADOS

Quarenta e cinco pacientes com LES (42 do sexo feminino, 93,3%) fizeram parte do estudo; 22 pacientes (49%) apresentavam doença em atividade. Vinte e cinco voluntários saudáveis (22 do sexo feminino, 88%) compuseram o grupo-controle. Os grupos (LES ativo, LES inativo, controles) não diferiram significativamente entre si quanto a sexo e idade. A média do SLEDAI foi consideravelmente mais alta nos pacientes com doença ativa. A tabela 1 sumariza os dados demográficos dos pacientes com LES (ativo e inativo) e controles.

Tabela 1 : Dados demográficos dos pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES) total, LES ativo, LES inativo e controles.

	Sexo feminino	**P***	**Idade (anos ± DP)**	**P***	**SLEDAI ± DP**	**P***
LES total (n=45)	42 (93%)	0,69	44,5 ± 11,3	0,61	6,2 ± 5,2	-
Controle (n=25)	22 (88%)		43,1 ± 11,2		3(1-18)**	
LES ativo (n=22)	19 (82%)	0,99	44,7 ± 10,2	0,62	10,3 ± 4,6	-
Controle (n=25)	22 (88%)		43,1 ± 11,2		-	

LES inativo (n=23)	23 (100 %)	0,24	44,3 ± 12,4	0,73	2,2 ± 0,5	-
Controle (n=25)	22 (88 %)		43,1 ± 11,2		-	
LES ativo (n=22)	19 (82 %)	0,11	44,7 ± 10,2	0,91	10,3 ± 4,6	< 0,001
LES inativo (n=23)	23 (100 %)		44,3 ± 12,4		2,2 ± 0,5	

n : número amostral;
DP : desvio padrão;
SLEDAI : indice de atividade da doença lúpus eritematoso sistêmico (doença ativa SLEDAI > 4);
* Teste do qui-quadrado;
** Mediana (mínimo-máximo).

A tabela 2 compara as manifestações clínicas em pacientes com LES ativo e inativo. Proteinúria acima de 0,5 g/dia, alopecia, úlceras mucosas e artrite foram significativamente mais frequentes nos casos de LES ativo.

Tabela 2 : Manifestações clínicas na população de pacientes com LES.

Manifestações clínicas	**LES total (n = 45)**	**LES ativo (n = 22)**	**LES inativo (n = 23)**	**P#**
Proteinúria*	5 (11%)	5 (23%)	0	0,022
Alopecia	16 (36%)	15 (50%)	1 (4 %)	0,002
Úlceras de mucosa	14 (31%)	13 (59 %)	1 (4 %)	< 0,001
Artrite	11(24%)	11 (50 %)	0	< 0,001

Eritema malar	20 (44%)	12 (55 %)	8 (35 %)	0,301
Anti DNA	13 (29%)	8 (36 %)	5 (22 %)	0,451
Leucopenia	15 (33%)	9 (41 %)	6 (26 %)	0,46
C baixo**	3 (7%)	3 (14 %)	0	0,109
Psicose	2 (4%)	2 (9 %)	0	0,23
Piúria	1 (2%)	1 (5 %)	0	0,49
Hematúria	2 (4%)	2 (9 %)	0	0,23
Febre	1 (2%)	1 (5 %)	0	0,49
Distúrbios visuais	1 (2%)	1 (5 %)	0	0,49
Pericardite	1 (2%)	1 (5 %)	0	0,49
CPC***	1 (2%)	1 (5 %)	0	0,49
Miosite	1 (2%)	1 (5 %)	0	0,49
Trombocitopenia	2 (4%)	1 (5 %)	1 (4 %)	0,999

LES – Lúpus eritematoso sistêmico;
*Proteinúria > 0,5 g/dia;
**Complemento baixo – diminuição de C3 e C4;
*** Comprometimento dos pares cranianos;
# Teste qui-quadrado ou exato de Fisher.

A figura 1 mostra a distribuição dos níveis de anti-Hsp90 em controles, pacientes com LES ativo e pacientes com LES inativo. A densidade óptica média para controles foi de 0,15 (0,07-0,25). Em pacientes com LES inativo, foi de 0,15 (0,06-0,5); em indivíduos com LES ativo, foi de 0,25 (0,10-0.68). A média de densidade óptica no imunoensaio foi signicativamente mais alta no LES ativo em comparação a controles (P=0,001) e, também, em comparação a pacientes com LES inativo (P=0,001). A densidade óptica média de pacientes com LES inativo não diferiu significativamente daquela do grupo-controle (P>0,05).

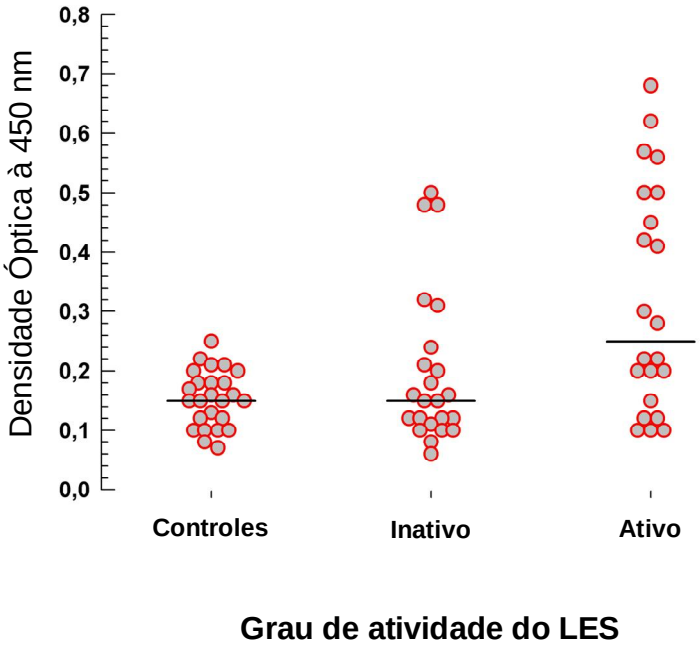


Figura 1 : Níveis de anti-Hsp90 em controles sadios, pacientes com LES inativo e LES ativo.

A figura 2 ilustra a correlação, obtida através do método de Pearson, entre níveis de anticorpos anti-Hsp90, medidos por densidade óptica, e índice de atividade da doença (SLEDAI). A correlação de Pearson foi significativa ($R=0,52$, $P<0,001$), indicando que, possivelmente, níveis crescentes de anti-Hsp90 acompanham o grau de atividade da doença.

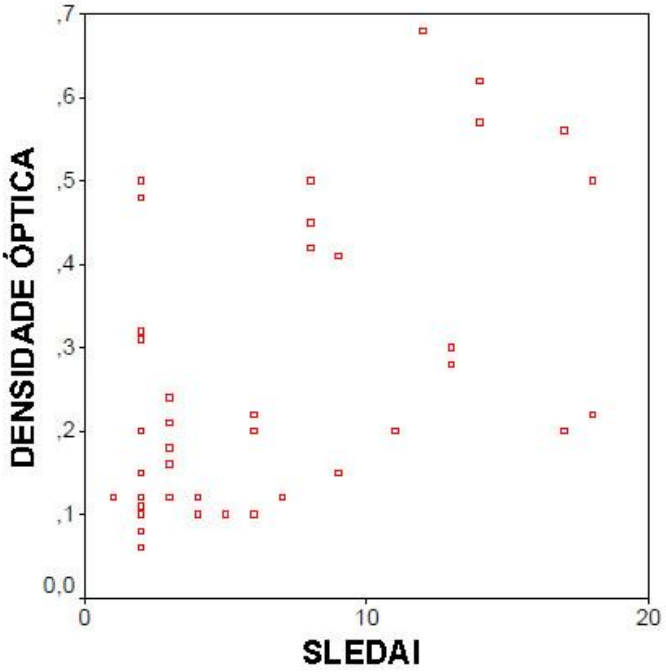


Figura 2. Relação entre níveis de anti-Hsp90 (densidade óptica lida a 450 nm) e índice de atividade da doença (SLEDAI).

Níveis elevados de IgG anti-Hsp90 (densidade óptica>2 DP em relação à média dos controles sadios) foram detectados em um terço (36%) dos 45 pacientes com LES e em nenhum controle (P<0,002). Pacientes com LES ativo apresentaram positividade significativa para anti-Hsp90 em relação a controles e também em relação a pacientes com LES inativo. Não houve diferença no grau de positividade para o anticorpo quando se comparou LES inativo a controles. Estes dados estão sumarizados na tabela 3.

Tabela 3. Frequencia de teste positivo para anti-Hsp90 nos 3 grupos estudados.

	Anti-Hsp 90 positivo	Anti-Hsp90 negativo	P*
LES (n = 45)	16 (36%)	29 (64%)	< 0,002
Controles (n = 25)	0	25 (100%)	
LES ativo (n =22)	11 (50%)	11 (50 %)	< 0,001
Controles (n = 25)	0	25 (100 %)	
LES inativo (n =23)	5 (22 %)	18 (82%)	> 0,05
Controles (n =25)	0	25 (100%)	
LES ativo (n =22)	11 (50%)	11 (50%)	< 0,05
LES inativo (n =23)	5 (22%)	18 (82%)	

LES : lúpus eritematoso sistêmico;
Hsp90 : proteína de choque térmico 90kDa;
n : número amostral;
*Teste do qui-quadrado ou exato de Fisher

A tabela 4 analisa a associação entre teste positivo para anti-Hsp90 e achados clínico-laboratoriais do LES. Houve associação entre teste positivo para anti-Hsp90 e presença de anticorpos anti-DNA, leucopenia e trombocitopenia, mas não com outras variáveis clínico-laboratoriais.

Tabela 4: Dados clínicos e laboratoriais de pacientes com LES anti Hsp90 positivos e anti-Hsp90 negativos

	Anti-Hsp90 positivo n =16	Anti-Hsp90 negativo n = 29	P#
Idade, anos ± DP	45,2 ± 12,5	44,1 ± 10,7	0,377

Sexo, fem : masc	14 : 2	28 : 1	-
Proteinúria*	4 (19 %)	1 (3 %)	0,088
Alopecia	6 (37 %)	6 (21 %)	0,385
Úlcera de mucosa	8 (50 %)	6 (21 %)	0,090
Artrite	6 (37 %)	5 (17 %)	0,250
Eritema malar	9 (56 %)	11 (38 %)	0,384
Anti-DNA	9 (56 %)	4 (14 %)	0,008
Febre	1 (6 %)	1 (3 %)	1,.000
Distúrbios visuais	1 (6 %)	0	0,760
CPC**	1 (6 %)	0	0,760
C baixo***	3 (18 %)	0	0,074
Hematúria	2 (12 %)	0	0,233
Piúria	1 (6 %)	0	0,760
Psicose	2 (12 %)	0	0,233
Leucopenia	9 (56%)	6 (21%)	0,036
Pericardite	1 (6 %)	0	0,760
Miosite	1 (6 %)	0	0,760
Trombocitopenia	1(6 %)	1 (3 %)	0,008

Hsp90– proteína de choque térmico de 90 kDa;

n: número amostral;

DP : desvio padrão;
*Proteinúria > 0,5 g/dia;
**Comprometimento de pares cranianos;
***Complemento baixo - diminuição de C3 e C4;
teste do qui-quadrado ou exato de Fisher.

A tabela 5 se reporta às propriedades diagnósticas do teste IgG anti-Hsp90 no total de pacientes com LES e também nos grupos com doença ativa e inativa. A sensibilidade do teste para a casuística global de LES foi baixa (36%). Em pacientes com doença ativa, a sensibilidade foi um pouco mais elevada; no LES inativo, a sensibilidade foi bastante baixa. A especificidade do teste foi de 100% nos três grupos estudados. Os LR+ obtidos sugerem que um teste

positivo para IgG anti-Hsp90 (> 2 DP) indica probabilidade considerável de doença lúpica.

Tabela 5. Propriedades diagnósticas do teste IgG anti-Hsp90, considerando-se teste positivo > 2 DP.

	LES TOTAL	LES ATIVO	LES INATIVO
Sensibilidade (IC%)	36% (22 – 51)	50% (28 – 72)	22% (7- 44)
Especificidade (IC%)	100% (86 – 100)	100% (86 – 100)	100% (86 – 100)
LR+	18,7	26	11,9

LES : lúpus eritematoso sistêmico
IC: intervalo de confiança
LR+: likelihood ratio positivo, ou razão de verorossimilhança positiva

4 DISCUSSÃO

Há indícios convincentes de que Hsp estejam envolvidas em fenômenos de autoimunidade. Como moléculas citoplasmáticas de papel fisiológico na formatação proteica, as Hsp endógenas de organismos eucarióticos são candidatas óbvias para regular a apresentação de antígenos para linfócitos. A Hsp90, além de controlar a interação de receptores e seus ligantes no meio intracelular, parece ter papel crítico no processamento de antígenos.[40]

A literatura acerca da relação anticorpos anti-Hsp90 e LES é escassa. Neste estudo, original em nosso meio, avaliamos níveis de anticorpos IgG anti-Hsp90 em pacientes com LES ativo e inativo. Controles sadios pareados por sexo e idade foram utilizados na testagem por ensaio imunoenzimático (ELISA).

O teste por ELISA nos permitiu uma análise quantitativa do anticorpo. Assim, averiguamos também uma possível associação entre níveis do anticorpo e índice de atividade do LES (SLEDAI).[38] Algumas propriedades diagnósticas do teste foram também analisadas.

Quarenta e cinco pacientes compreenderam a casuística global de LES. Houve, como esperado, uma grande predominância do sexo feminino em nossa população lúpica, o que está de acordo com a literatura.[41] A média de idade ficou em torno de 44 anos para a população global de LES. Esta faixa etária média está de acordo com relatos prévios que situam o deflagramento de doença lúpica principalmente em mulheres em idade fértil (entre 16 e 55 anos).[42,43,44]

Uma vez que o grupo-controle foi pareado por sexo e idade, não houve diferenças significantes nestas variáveis quando se comparou distribuição de sexo e média etária da população total de LES com os controles; da mesma forma, houve equidade na distribuição de sexo e na média de idade nos grupos de LES ativo e inativo comparativamente a controles.

Nos 22 pacientes com doença lúpica ativa o SLEDAI médio foi de 10,3, enquanto nos 23 pacientes inativos a média de SLEDAI foi de 2,2; esta estratificação dicotômica do SLEDAI esteve dentro do esperado, considerando-se o delineamento do estudo. Eritema malar, alopecia, úlceras mucosas e leucopenia compreenderam as manifestações mais frequentes na nossa população global de LES. Estes achados encontram suporte na literatura, onde

de 90% dos pacientes com LES têm acometimento músculo-esquelético ou cutâneo-mucoso no decurso da doença.[36] Proteinúria > 0,5g/dia, alopecia, úlceras mucosas e artrite foram achados particularmente frequentes na população com LES ativo ($P < 0,05$). De interesse, anticorpos anti-DNA foram documentados indistintamente em pacientes com LES ativo e inativo, dado de certa forma inesperado considerando-se a clássica associação deste autoanticorpo com nefrite lúpica ativa.[45]

O teste de ELISA para anticorpos IgG anti-Hsp90 não é internacionalmente padronizado. Não há ponto de corte definido para conceituação de positividade no ensaio imunoenzimático. Assim, analisamos comparativamente os níveis médios de densidade óptica a 450 nm em pacientes com LES ativo, inativo e no grupo-controle. A média da densidade óptica dos pacientes com LES ativo foi consideravelmente maior do que a dos controles e do que a dos indivíduos com LES inativo. Estes dados são compatíveis com uma resposta anti-Hsp90 exacerbada em pacientes com SLEDAI elevado.

Quando da utilização do teste de Pearson, obteve-se correlação significante entre níveis crescentes de anti-Hsp90 e graus de atividade da doença medido pelo SLEDAI ($R = 0,52$, $P < 0,001$). Este dado, provavelmente, reflete a maior biodisponibilidade da proteína para ligação ao anticorpo na doença ativa em comparação à doença inativa.[46]

Mais do que uma simples resposta ao estresse celular, o aumento da expressão de Hsp90 (e não de outras Hsp) no LES deflagra uma resposta anti-Hsp90 que parece ser uma particularidade da doença.[47,48,49] Em murinos transgênicos, a expressão aumentada de Hsp90 e a consequente produção de anticorpos anti-Hsp90 foi mediada pela interleucina-6.[50]

De interesse, a expressão de Hsp90 é maior em modelos murinos espontâneos para LES do que em animais controles. Em camundongos MRL/lpr, a hiperexpressão de Hsp90 pareceu ocorrer seletivamente no baço e se iniciou aproximadamente 2 meses antes do início da doença.[51] Neste mesmo modelo murino, a ocorrência de anticorpos anti-Hsp90 aumentou com a idade, mas não se correlacionou com algum parâmetro clínico em especial.[52]

Arbitrariamente, o teste para IgG anti-Hsp90 foi por nós considerado positivo quando a densidade óptica da amostra superasse em 2 DP ou mais a média dos controles sadios. Positividade para o teste foi documentada em 36% dos nossos pacientes com LES e em nenhum indivíduo do grupo-controle, dado de significância estatística.

Estes resultados estão de acordo com os descritos por Conroy *et al*[47], onde IgG anti-Hsp90 e IgM anti-Hsp90 foram reportados em 26% e 35%, respectivamente, dos pacientes lúpicos, quando comparados a pacientes saudáveis ($P < 0,025$). Níveis de anti-Hsp90 foram averiguados por ELISA em uma população pediátrica; 33 casos de LES, 55 de artrite idiopática da infância, 11 de dermatomiosite e 19 controles foram avaliados. A positividade para anti-

Hsp90 no LES pediátrico foi de 24%.[53] Esta prevalência de anti-Hsp90 foi semelhante a do LES adulto.[47] Os dados sugerem pontos de convergência na etiopatogenia do LES adulto e infanto-juvenil. Em casuística de 15 pacientes com LES, Minota *el al*[35] reportaram positividade para IgG anti-Hs90 por western blot em cerca de metade dos pacientes lúpicos.

De interesse, nossos pacientes com LES ativo apresentaram significante positividade para anti-Hsp90 em relação a controles e também em relação a pacientes com doença lúpica inativa. O grau de positividade para o anticorpo não diferiu quando se comparou casos de LES inativo com os controles.

Em análise univariada, analisamos o perfil de manifestações clínicas da doença lúpica em pacientes com ou sem anticorpos anti-Hsp90. A positividade para anti-Hsp90 se associou de forma definida com a presença de anticorpos anti-DNA, embora não com nefropatia. Mais da metade de nossos pacientes anti-Hsp90 positivos apresentavam concomitantemente anticorpos anti-DNA de dupla hélice. Esta associação é de interesse e deve ser testada em casuísticas maiores. Uma testagem positiva para anti-DNA sabidamente tem valor diagnóstico para LES e prediz doença glomerular. Três quartos dos pacientes com LES apresentam positividade para anti-DNA em alguma fase da doença.[54]

A associação de anti-Hsp90 com alterações hematológicas (leucopenia e trombocitopenia) deve ser vista com reservas em nosso estudo, dado o baixo contingente de indivíduos com essas alterações. Nenhuma outra associação

clínica ou laboratorial foi obtida a partir de um teste positivo para anti-Hsp90 em nossos pacientes.

Diferentemente de nossos achados, Conroy *et al*[47] reportaram uma associação definida entre níveis altos de anti-Hsp90 (IgG e IgM), e níveis baixos de C3; os mesmos autores correlacionaram presença de anticorpos IgM anti-Hsp90 com doença renal ativa.[47] Depósitos glomerulares de Hsp90 foram pesquisados em biópsias renais de 7 pacientes com LES e de 17 pacientes com glomerulonefrites de outras origens. Seis dos 7 pacientes com LES tiveram fluorescência positiva para Hsp90, com predomínio de padrão granular; depósitos subepiteliais, subendoteliais e mesangiais foram notados. Estes depósitos de Hsp90 não foram detectados em pacientes sem LES. Os anticorpos anti-Hsp séricos destes pacientes com LES não se comportaram com anticorpos naturais, uma vez que foram apenas moderadamente adsorvidos em porções Fab de IgG norma.[55] Digno de menção, autoanticorpos anti-Hsp90 naturais podem ser eventualmente isolados da IgG humana policlonal, e são representativos do repertório de IgG normal dirigido contra moléculas altamente conservadas.[56]

Dhillon et al[48] documentaram níveis elevados da proteína Hsp90 em pacientes com LES neuropsiquiátrico ou cardiorrespiratório ativos, sucedendo-se o contrário nos níveis da proteína quando do controle clínico destas manifestações.

Quanto às propriedades diagnósticas do teste IgG anti-Hsp90, alguns aspectos são de interesse, embora devamos considerar o número amostral pequeno. A sensibilidade encontrada na casuística global de LES não foi alta (36%), mas elevou-se na doença ativa. A sensibilidade para outros autoanticorpos estudados no LES varia de 98% (anticorpos antinucleares) a 10% (anti-SSB). [57]

Como não houve teste positivo para o anticorpo em nossos controles, a especificidade do teste foi de 100% em todos os grupos de pacientes com LES. A interpretação da especificidade fica prejudicada pelo fato de não termos testado outras populações controles (outras doenças autoimunes, por exemplo), onde o anticorpo poderia estar eventualmente presente. De interesse, a especificidade para anticorpos antinucleares e anti-DNA no LES é de 80% e 50%, respectivamente.[58,59]

Os LR+ obtidos indicam que um teste positivo para IgG anti-Hsp90 confere probabilidade de doença lúpica. Nos 3 grupos de pacientes (LES total, pacientes com LES ativo e com LES inativo), os valores de LR+, todos acima de 10, implicam relevância do teste positivo na interpretação clínica. Em termos práticos, a probabilidade de LES foi 18,7 maior em pacientes anti-Hsp90 positivos do que naqueles com o teste negativo; esta estimativa foi ainda maior em pacientes com LES em atividade.

5 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Gostaríamos de considerar algumas limitações de nosso estudo. A primeira diz respeito ao tamanho da amostra de pacientes com LES; embora estivesse dentro do cálculo amostral, foi relativamente pequena. O número amostral restrito não se deveu propriamente à indisponibilidade de pacientes de nosso ambulatório, mas ao custo do teste para anti-Hsp90, bastante elevado. Um maior número amostral por certo melhoraria a acuidade de interpretação das propriedades diagnósticas do teste para anti-Hsp90.

A Hsp90 é, certamente, uma proteína interessantíssima do ponto de vista fisiopatológico. Seus efeitos no processamento de antígenos e na apresentação destes para linfócitos devem ser detalhados, no futuro, em várias outras doenças autoimunes e também em neoplasias. A não testagem dos níveis do antígeno Hsp90 em paralelo à pesquisa de anti-Hsp90 foi uma das limitações de nosso estudo. Do ponto de vista prático, pudemos testar apenas o isotipo IgG (de memória) anti-Hsp90; a testagem da IgM anti-Hsp90, de fase aguda, poderia acrescentar dados importantes na compreensão da resposta humoral anti-Hsp90 e sua relação com atividade lúpica.

Como visto, o papel da Hsp90 e da resposta humoral anti-Hsp90 é matéria aberta em doenças autoimunes. A literatura disponível no momento é limitada em quantidade. Além disso, o número amostral de boa parte dos estudos é pequeno. Novos estudos deverão contribuir para um conhecimento mais detalhado do binômio anti-Hsp90-autoimunidade. Uma futura padronização laboratorial do teste para anti-Hsp90 será também passo

importante para a utilização deste anticorpo como biomarcador de LES ou outras doenças autoimunes.

6 CONCLUSÕES

I) Os níveis médios de anticorpos anti-Hsp90 foram significantemente mais elevados no LES do que em controles.

II) Um teste positivo para anti-Hsp90 pareceu se associar à doença lúpica ativa, particulamente anticorpos anti-DNA e alterações hematológicas.

III) O teste se mostrou altamente específico, mas com baixa sensibilidade em pacientes com LES. Em pacientes com teste positivo acima de 2 DP, a probabilidade de doença lúpica foi elevada.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1 Tan EM. Antibodies to nuclear antigens (ANA): their immunobiology and medicine. **Adv Immunol** 1982; 33: 167-240.

2 Winfield JB. Anti-lymphocyte antibodies in systemic lupus erythematosus . **Clin Rheum Dis** 1985; 11:523-549.

3 Lindquist S. The heat shock response. **Ann Rev Biochem** 1986; 55: 1151-91.

4 Lindquist S, Craig EA. The heat shock proteins. **Ann Rev Gen** 1988; 22: 631-775.

5 Shinnick TM, Vodkin MH, Williams JC, The Mycobacterium tuberculosis 65 kDa antigen is a heat shock protein wich corresponds to common antigen and to E. coli GroEL protein. **Infect Immun** 1988; 56: 446-51.

6 Young D, Lathigra R, Handrix R, Sweetsa D, Young RA. Stress proteins are immune targets in Leprosy and tuberculosis. **Proc Natl Acad Sci USA** 1988; 58: 4267-70.

7 Donati Y, Sloman D, Polla B. Oxidative injuryand the heat shock response. **Biochem Pharmacol** 1990; 40: 2571-7.

8 Gonzales M, Shiraishi K, Hisanaga K, Sagar S, Mandbach M, Sharp F. Heat Shock Proteins as markers of natural injury. **Mol Brain Res** 1989; 6: 93-100.

9 Young RA, Elliott TJ. Stress proteins infection and immune surveillance. **Cell** 1989; 59: 5-8.

10 Matthews R. Candida albicans hsp90; link between protective and autoimmunity. **J Med Microbiology** 1992; 36:367-70.

11 Matthews R, Burnie J. The role of hsp90 in fungal infection. **Immunology Today** 1992; 13: 345-48.

12 Galluccci S, Matzinger P. Danger signals: SOS to the immune system. **Curr Opin Immunol** 2001; 13: 114-9.

13 Winfield J, Jarjour W. Stress protein in autoimmunity. **Adv Exp Med Biol** 1994; 347; 99-113.

14 Pockley AG. Heat shock proteins, inflamation, and cardiovascular disease. **Circulation** 2002;105:1012-7.

15 Park HK, Park EC, Bae SW, Park MY, Kim SW, Yoo HS, et al. Expression of heat shock protein 27 in human atherosclerotic plaques and increased plasma level of heat shock protein 27 in patients with acute coronary syndrome. **Circulation** 2006; 114: 886-93.

16 Latchman DS. Heat shock proteins and human disease. **J Royal Coll Physicians** 1991; 25: 295-9.

17 Horváth L, Czirják L, Fekeete B, Jakab L, Prohászka Z, Cervenak L, Romics L, Singh M, Daha MR, Füst G. Levels of antibodies against C1q and 60 kDa of heat shock proteins in the será of patients with various autoimmune diseases. **Immunology Letters** 2001; 75: 103-9.

18 Ellis RJ. The molecular chaperone concept. **Semin Cell Biol** 1990; 1(1): 1-9.

19 Pelham HRB. Heat shock proteins: coming in the from cold. **Nature** 1988; 332: 776-7.

20 Ellis J. Proteins as molecular chaperons. **Nature** 1987;328:378-9.

21 Businaro R, Profumo E, Tagliani A, Leone S, D'Amati G, Ippoliti F, Leopizzi M, D'Arcangelo D, capoano R, FumagalliL, Salvati B, Riganò R. Heat-shock protein-90: a novel autoantigen in human carotid atherosclerosis. **Atherosclerosis** 2009;207(1):74-83.

22 Hickey E, Brandon SE, Sadis S, Smale G, Weber LA. Molecular cloning of sequences encoding the human heat shock proteins and their expression during hypertermia. **Gene** 1986; 43:147- 57.

23 Hickey E, Brandon SE, Sadis S, Smale G, Weber LA. Sequence and regulation of a gene encoding a human 89 kilo Dalton heat shock protein. **Mol Cell Biol** 1987; 2615-16.

24 Barnier JV, Bensaude O, Morange M, Babinet C, Mouse 89 kD heat shock protein: Two polypeptides with distinct development regulation. **Exp Cell Res** 1987; 170: 186-94.

25 Smith DG, Toft DO. Steroid receptors and their associated proteins. **Mol Endocrinol**; 1993; 7:1-11.

26 Parcellier A, Gurbunaxi S, Schitt E, Garrido C. Heat shock proteins, celular chaperones that modulate mitochondrial cell death pathways. **Biochem Biophys Res Commun** 2003; 304-505-12.

27 Garrido C, Ottavi P, Fromentin A, Arrigo AP, Chauffert B, Mehlen P. Hsp27 as a mediator of confluence-dependent resistence to cell death induced by anticancer drugs. **Cancer Res** 1997;57: 26662-7.

28 Lanneau D, de Thonel Aurelie, Maurel S, Didelot C. Garrido C. Apoptosis Versus Cell Differentiation: Role of Heat Shock proteins Hsp90, Hsp70 and Hsp27. **Prion** 2007; 1(1):53-60.

29 Trieb K, Gerth R, Holzer G, Grhns JG, Berger P, Kotz R. Antibodies to heat shock protein 90 in osteosarcoma patients correlate with response to neoadjuvant chemotherapy. **Br J Cancer** 2000; 82(1):85-7.

30 Shen WW, Liu HC, Yang YY, Lin CY, Chen KP, Yeh TS, Leu SJ. Anti-heat shock protein 90 is increased in acute mania. **Aust N Z J Psychiatry** 2006 ;40(8):712-6.

31 Goral J, Shenoy S, Mohanakumar T, Clany J Jr. Antibodies to 70 kD and 90 kD heat shock proteins are associated with graft-versus-host disease in peripheral blood stem cell transplant recipients. **Clin Exp Immunol**. 2002 March; 127(3): 553–559.

32 Qin HY, Mahon JL, Atkinson MA, Chaturvedi P, Lee-Chan E, Singh B. Type 1 diabetes alters anti-hsp90 autoantibody isotype. **J Autoimmun** 2003;20(3):237-45.

33 Zhang M, Hisaeda H, Kano S, Hao YP, Looaresuwan S, Aikawa M, Himeno K. Antibodies specif for heat shock proteins in human and murine malaria. **Clin Exp Immunol** 2002; 129(1):169-76.

34 Deguchi Y, Negoro S, Kishimoto S. Heat shock protein synthesis by human peripheral mononuclear cells from SLE patients. **Biochem Biophys Res Commun** 1987; 148:1063-68.

35 Minota S, Koyasu S, Yahara I, Winfield JB. Antibodies to the heat-shock protein hsp90 in systemic lupus erythematosus. **J Clin Invest** 1988; 81:106-9.

36 Jarjour WN, Jeffries BD, Davis JS, Welch WJ, Minura T, Winfield JB. Autoantibodies to human stress proteins. A survey of various rheumatic and other inflammatory diseases. **Arthrits and Rheumatism** 1991; 168:1475-80.

37 Hocheberg MC. Updating the American College of Rhematology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum** 1997; 40:1725.

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

39 Deeks JJ, Altmann DG. Diagnostic tests 4: likehood ratios. **BJM** 2004; 329: 168-9.

40 Hayem G, Bandt M De, Palazzo E, Roux S, Combe B, Eliaou JF, Kahn MF, Meyer O. Anti-heat shock protein 70 kDa and 90 kDa antibodies in serum of patients with rheumatoid arthritis. **Ann Rheum Dis** 1999; 58: 291-96.

41 Fairweather D, Frisancho-Kiss S, Rose NR. Sex differences in autoimmune disease from a pathological perspective. **Am J Pathol** 2008; 173(3): 600-9.

42 Hahn, B H. Lupus eritematoso sistêmico. In: Fauci AS, Braunwald E, Kasper D, Hauser SL, Longo DL, Jameson L. **Harrison: Medicina Interna**. 17 ed. Rio de Janeiro. Ed. McGraw-Hill; 2008. p.2075- 2083.

43 D'Cruz DP, Khamashta MA, Hughes GR. Systemic lupus erithematosus. **Lancet** 2007;369(9561):587-96.

44 Santos MJ, Capela S, Figueira R, Nero P, Matos AA, Silva C, Miranda L,Barcelos A, Marques A, Teixeira A, Branco J, da Silva JC, de Queiroz MV. Caracterização de uma população portuguesa de doentes com Lúpus Eritematoso Sistêmico. **Acta Reumatol Port** 2007; 32: 153-61

45 Sato EI, Bonfá ED, Costallt LTL, Silva NA, Brenol JCT, Santiago MB, Szajubok JCM, Rachid-Filho A, Barros RT, Vasconcelos M, Albuquerque EMN. Sociedade Brasileira de Reumatologia. **Projeto Diretrizes – Lúpus Eritematoso Sistêmico: Tratamento do Acometimento Cutâneo/articular**. 2004.

46 Hayem G, Bandt M De, Palazzo E, Roux S, Combe B, Eliaou JF, Kahn MF, Meyer O. Anti-heat shock protein 70 kDa and 90 kDa antibodies in serum of patients with rheumatoid arthritis. **Ann Rheum Dis** 1999; 58: 291-96.

47 Conroy SE, Faulds GB, Williams W, Latchman DS, Isenberg DA. Detection of autoantibodies to the 90 kDa heat shock protein in the systemic lupus erythematosus and other autoimmune diseases. **Br J Rheumatol** 1994; 33:923-26.

48 Dhillon VB, McCallum S, Norton PM, Twomey BM, Erkeller-Yuksel F, Lydyard P, Isenberg DA, Latchman DS.Differential heat shock protein over-expression and its clinical relevance in system lupus erythematosus. **Annals of the Rheumatic Diseases** 1993; 52: 436-42.

49 Norton PM, Isenberg DA, Latchman DS. levated levels of the 90kD heat shock protein in a proportion of SLE patients with active disease. **Journal of Autoimmunity** 1988; 2: 287-195.

50 Stephanou A, Conroy S, Isenberg DA, Maione D, Poli V, Ciliberto G, Latchman DS. Elevation of IL-6 in transgenic mice results in increased levels of the 90 kDa heat shock protein (hsp90) and production of anti-hsp90 antibodies. **J Autoimmun** 1998;11(3):249-53.

51 Faulds G, Isenberg DA, Latchman DS. The tissue specific elevation of the 90kDa heat shock protein precedes the onset of disease in lupus prone MRL/lpr mice. **J Rheumatol** 1994; 21: 234-38.

52 Faulds G, Conroy S, Madaio M, Isenberg D, Latchman D. Increased levels of antibodies to heat shock proteins with increasing age in Mrl/Mp-Ipr mice. **Br J Rhematolo** 1995; 34(7):610-5.

53 Conroy SE, Tucker L, Latchman DS, Isenberg DA. Incidence of anti Hsp 90 and 70 antibodies in children with SLE, juvenile dermatomyositis and juvenile chronic arthritis. **Clin Exp Rhematol** 1996; 14(1):99-104.

54 Neilson EG, Courser WG. Imunologic Renal Diseases. Philadelphia, ed Lippincott rares, 1996, p 1055-1089.

55 Kenderov A, Minkova V, Mihailova D, Giltiay N, Kyurkchiev S, Kehayov I, Kazatchkine M, Kaveri S, Pashov A. Lupus-specific kidney deposits of HSP90 are associated with altered IgG idiotypic interactions of anti-HSP90 autoantibodies. **Clin Exp Immunol** 2002 ;129(1):169-76.

56 Pashov A, Kenderov A, Kyurkchiev S, Kehayov I, Hristova S, Lacroix-Desmazes S, Giltiay N, Varamballi S, Kazatchkine MD, Kaveri SV. Autoantibodies to heat shock protein 90 in the human natural antibody repertoire. **Int Immuol** 2002; 14(5):453-61.

57 Neilson EG, Courser WG. Imunologic Renal Diseases. Philadelphia, ed Lippincott rares, 1996, p 1055-1089.

58 Shur, PH. Lupus Eritematoso Sistêmico. In: Cecil RL, Goldman L, Ausiello D. In: **Cecil: Tratado de Medicina Interna**. 22ª ed. Rio de Janeiro. Elsevier 2005. p.1939.

59 Egner W. The use of laboratory tests in the diagnosis of SLE. **J Clin Pathol** 2000; 53: 424- 32.

7 ARTIGO EM INGLÊS

Anti-Hsp90 antibodies and systemic lupus erythematosus

Ester Rosári Raphaelli Dal Ben[1], Henrique L. Staub[2]

1 Pharmacist and Biochemist Undertaking Master´s in Medicine and Health Science with major in Medical Clinic at the Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS)
2 PhD in Rheumatology; Consultant Professor of Rheumatology of Faculty of Medicine of Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS); Professor of the Post-Graduate Program of Faculty of Medicine of PUCRS.

Adress for correspondence:
Ester Rosári Raphaelli Dal Ben
Serviço de Reumatologia
Hospital São Lucas – PUCRS
Av. Ipiranga 6690 – sala 220
CEP 90.610-000 – Porto Alegre – Brasil
Email: esterdalbem@ig.com.br

ABSTRACT

Introduction. Systemic lupus erythematosus (SLE) is an autoimmune disease characterized by a considerable diversity of circulating autoantibodies. Heat shock proteins (Hsp), highly conserved in the evolution of species, are a possible target for autoantibodies in SLE. The humoral response to the 90 kilodaltons Hsp (Hsp90) in SLE was rarely addressed to date. **Material and methods**. In this cross-sectional and controlled study, we evaluated levels of anti-Hsp90 antibodies in active and inactive SLE patients and in healthy controls. Diagnosis of SLE was based on the American College of Rheumatology criteria of 1997. The presence of active SLE was confirmed by a SLEDAI above 4. IgG anti-Hsp90 antibodies were tested by immunoenzymatic assay. Levels above 2 standard deviation considering the average of controls were arbitrarly considered positive. To compare categoric and continuous variables and to estimate correlations, non-parametric, t test and Pearson coefficient were calculated. **Results**. Forty-five patients with SLE (42 females, 93.3%) and 25 controls 22 females, 88%) were evaluated. Twenty-two of the 45 SLE patients (49%) had active disease. Urinary protein above 0.5 grams/day, alopecia, oral ulcers and arthritis were significantly more frequent in active than inactive SLE patients. Patients with active SLE showed average levels of anti-Hsp90 significantly higher than controls ($P<0.001$). The Pearson test revealed a significant correlation of levels of anti-Hsp90 and SLEDAI ($R = 0.51$, $P<0.001$). Sixteen SLE patients (36%) had a positive test for anti-Hsp90 ($P<0.02$ in comparison to healthy controls). A positive test for anti-Hsp90 was significantly more frequent in active SLE when compared to controls ($P<0.001$) and inactive SLE ($P<0.05$). Positivity for anti-Hsp90 antibodies associated to occurrence of anti-DNA antibodies, leucopenia and thrombocytopenia. Specificity and sensitivity of the anti-Hsp 90 antibody test were 100% and 36%, respectively. The positive likelihood ratio (LR+) for anti-Hsp90 above 2 SD was elevated (18.7). **Conclusions**. The average levels of anti-Hsp90 antibodies were significantly higher in SLE patients than controls. A positive testing for anti-Hsp90 seemed to associated to active disease, particularly anti-DNA antibodies and haematological changes. The test was highly specific, but with low sensitivity in SLE patients. In patients with antibody levels above 2 SD, the probability of SLE was elevated. The utilization of anti-Hsp90 antibodies as biomarkers of SLE and other autoimmune diseases shall be evaluated in future studies.

Key words: Anti-Hsp90, systemic lupus erythematosus, autoimmunity.

1 INTRODUCTION

Systemic Lupus erythematosus (SLE) is an autoimmune multifocal disease characterized by a plethora of autoantibodies. The detection of some autoantibodies as double strand anti-DNA and anti-Sm are very important to diagnose this disease.[1] Others, such as those directed against lymphocyte membrane antigens, contribute to T cells depletion and to the immune dysfunctions characteristics of SLE.[2] Heat shock proteins (Hsp) are a group of proteins highly preserved during the evolution of species.[3,4,5,6] They are classified according to their molecular weight. Cellular expression of Hsp is increased in the presence of infections, anoxia, oxidative stress, and inflammatory damage.[5,6,7,8]

This preservation during the evolution of species implies that proteins that are homologous to human Hsp are found in infectious agents. Crossed antibodies and autoreactive T cells against exogenous and endogenous Hsp were detected in subjects infected by a number of pathogens[9,10,11]. Immunoreactivitity against of 60 kilodaltons (kDa), Hsp70, and Hsp 90 was documented in several autoimmune diseases.[13,14,15] Hsp are highly immunogenic, and probably also have a positive effect on antigen presenting.[12]

Hsp are also involved in physiological roles. In this context we can mention: (a) folding of peptides and intracellular transport of proteins (mainly Hsp60 and Hsp70, also known as chaperons); (b) maintaining of proteins in their inactive form in non-stimulated cells (Hsp90); (c) protein degradation

(ubiquitin).[16,17] Hsp roles on denaturations of proteins is ATP-dependent.[17,18] In general terms, intracellular Hsp are cytoprotective, while surface Hsp mediate humoral responses.[19,20] According to recent data, Hsp90 is hyperexpressed in atherosclerotic plaques and in the serum of patients with carotid atherosclerosis .[21]

Hsp90, our main focus in this study, is an abundant cytoplasm protein representing 1% of the total proteins of non-stimulated proteins. Hsp90 is encoded by two genes (Hsp 90α and Hsp 90β), both heat inducible.[22,23,24] In cell physiology, Hsp90 is known to keep key proteins as steroid receptors or tyrosine kinase Src inactive until converting them to the active form, when cells are exposed to their ligands.[25] The cellular expression of Hsp90, Hsp70, and Hsp27 have a negative effect on apoptosis triggered by stimuli such as hyperthermia and oxidative stress. Due to their anti-apoptosis effect, these Hsp confer resistance to anti-cancer drugs and increase the survival of tumor cells. [26,27,28] Of note, anti-Hsp antibodies correlate positively to chemotherapy response in patients with osteosarcoma.[29]

Exacerbated humoral anti-Hsp90 responses were also described in patients with acute mania episodes [30] and with graft versus host disease.[31] In type I diabetes mellitus, although anti-Hsp90 levels are not increased, the isotypic profile of anti-IgG Hsp90 (IgG1, IgG3) differed from those of healthy subjects.[32] Regarding infectious diseases, high levels of anti-Hsp90 were detected in malaria patients .[33]

Although normally found in the cytoplasm, Hsp90 is expressed on the surface of peripheral blood mononuclear cells in about 20% of patients with active SLE.[34] There they can be targeted by autoantibodies. SLE studies from the 1980's and 1990's reported conflicting results on the prevalence of anti-Hsp90 antibodies (anti-Hsp90) in SLE. [35, 36]

The assays utilized for detection of anti-Hsp90 have not been standardized. The aim of this study is to assess anti-Hsp90 levels in patients with active and inactive SLE. The cutoff point will be obtained by testing healthy controls. Additionally, anti-Hsp90 levels will be correlated to the lupus activity and clinical manifestations of the disease. Diagnostic properties of the anti-Hsp90 test will be also evaluated.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Patients

This cross-sectional and controlled study included SLE patients seen at the Outpatient Clinics of the Rheumatology Department of the São Lucas Hospital of Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS) in 2008 and 2009. SLE patients fulfilling the 1997[37] criteria of the American College of Rheumatology (ACR) were selected consecutively. Their lupus state of activity

was classified, according to SLEDAI [38], in active SLE (SLEDAI≥4) and inactive SLEDAI ≤4).

Healthy volunteers matched by gender and age composed the control group. Subjects with rheumatologic symptoms and positive testing for anti-nuclear antibodies were excluded.

2.2 Detection of anti-Hsp90 antibodies

The immunoenzymatic assay to detect IgG anti-Hsp90 antibodies was performed according to the manufacturer's guidelines: 100 µL of serum samples diluted in 1:100 PBS-Tween (phosphate buffer in Tween saline) were added, in pairs, to each ELISA microplate well containing the antigen (Hsp 90 - Calbiochem – CA – USA) was incubated for 90 minutes at room temperature. Afterwards, the plates were washed 3 times in washing solution (ELISA Plate Wash - Calbiochem). Then 100µL of goat IgG conjugated with peroxidase were added to each well and incubated for additional 60 minutes. After washing and drying the plates, 100 µL of the TBM (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) substrate was added to each well and incubated for 15 minutes at room temperature. Later, 100 µL of H_2SO_4 2,5N halting solution was added. Reading was performed using a spectrophotometer (Microplate BIO-TEK Instruments, model EL311) at 450 nm. The anti-Hsp antibodies test was arbitrarily considered positive in SLE patients if the value of optic density was higher than 2 SD when compared to healthy controls.

2.3 Statistical analysis:

The chi-square and Fisher's test were used to compare categorical variables. The t test was used to compare continuous variables. Variance analysis was used in quantitative variables using log for asymmetric variables. P values <0.05 were considered significant. The correlation of anti-Hsp90 with SLEDAI was assessed by the Pearson test. The diagnostic properties of the test include calculating sensitivity, specificity, and the positive likelihood ratio (LR+). The Deeks scale was used to interpret LR+: values above 10 are associated with a high probability of disease and have relevant impact on medical decisions.[39]

3 RESULTS

This study included 45 patients (42 females, 93.3%), 22 (49%) with active disease. The control group consisted of 25 healthy volunteers (22 females, 88%). The groups (active SLE, inactive SLE, and controls) did not differ significantly as to gender and age. Mean SLEDAI was considerably higher in patients with active disease. Table 1 summarizes demographic data of active and inactive SLE, and controls.

Table 1: Demographic data of patients with systemic lupus erythematosus (SLE) and controls

	Female Gender	**P***	**Age (years ± SD)**	**P***	**SLEDAI ± SD**	**P***
Total SLE (n=45)	42 (93%)	0,69	44.5 ± 11.3	0,61	6+2 ± 5.2	-
Controls (n=25)	22 (88%)		43.1 ± 11.2		3 (1-18)**	
Active SLE (n=22)	19 (82%)	0,99	44.7 ± 10.2	0.62	10.3 ± 4.6	-
Controls (n=25)	22 (88%)		43.1 ± 11.2		-	
Inactive SLE (n=23)	23 (100 %)	0.24	44.3 ± 12.4	0.73	2.2 ± 0.5	-
Controls (n=25)	22 (88 %)		43+1 ± 11.2		-	
Active SLE (n=22)	19 (82 %)	0.11	44.7 ± 10.2	0.91	10.3 ± 4.6	< 0.001
Inactive SLE (n=23)	23 (100 %)		44.3 ± 12.4		2.2 ± 0.5	

n sample size;
SD: standard deviation;
SLEDAI: activity rate of systemic lupus erythematosus (active disease SLEDAI > 4);
* Chi-square test;
** Median (minimum-maximum).

Table 2 compares clinical manifestations of patients with active and inactive SLE. Proteinuria above 0.5 g/day, alopecia, mucosal ulcers, and arthritis were significantly more frequent in active than inactive SLE patients.

Table 2: Clinical manifestations in SLE patients

Clinical manifestations	**Total SLE (n = 45)**	**Active SLE (n = 22)**	**Inactive SLE (n = 23)**	**P#**
Proteinuria*	5 (11%)	5 (23%)	0	0.022
Alopecia	16 (36%)	15 (50%)	1 (4 %)	0.002
Mucosal ulcers	14 (31%)	13 (59 %)	1 (4 %)	< 0.001
Arthritis	11(24%)	11 (50 %)	0	< 0.001
Malar erythema	20 (44%)	12 (55 %)	8 (35 %)	0.301
Anti-DNA	13 (29%)	8 (36 %)	5 (22 %)	0.451
Leucopenia	15 (33%)	9 (41 %)	6 (26 %)	0.46
Low C**	3 (7%)	3 (14 %)	0	0.109
Psychosis	2 (4%)	2 (9 %)	0	0.23
Pyuria	1 (2%)	1 (5 %)	0	0.49
Hematuria	2 (4%)	2 (9 %)	0	0.23
Fewer	1 (2%)	1 (5 %)	0	0.49
Visual disorders	1 (2%)	1 (5 %)	0	0.49
Pericarditis	1 (2%)	1 (5 %)	0	0.49
CPC***	1 (2%)	1 (5 %)	0	0.49
Myositis	1 (2%)	1 (5 %)	0	0.49
Thrombocytopenia	2 (4%)	1 (5 %)	1 (4 %)	0.999

SLE – systemic lupus erythematosus;
*Proteinuria > 0.5 g/day;
**Low Complement – decrease of C3 and C4;
*** Cranial nerves committed;
# Chi square or Fisher's exact test

Figure 1 shows the distribution of anti-Hsp90 levels in controls and SLE patients. The mean optic density of controls was 0.15 (0.07-0.25). In inactive SLE it was 0.15 (0.06-0.5); in active SLE, it was 0.25 (0.10-0.68). The mean optic density of the immunoassay were significantly higher in active SLE when compared to controls (P=0.001) and to inactive SLE (P= 0.001). The mean optic

density of inactive SLE patients did not differ significantly from the control group (P>0.05).

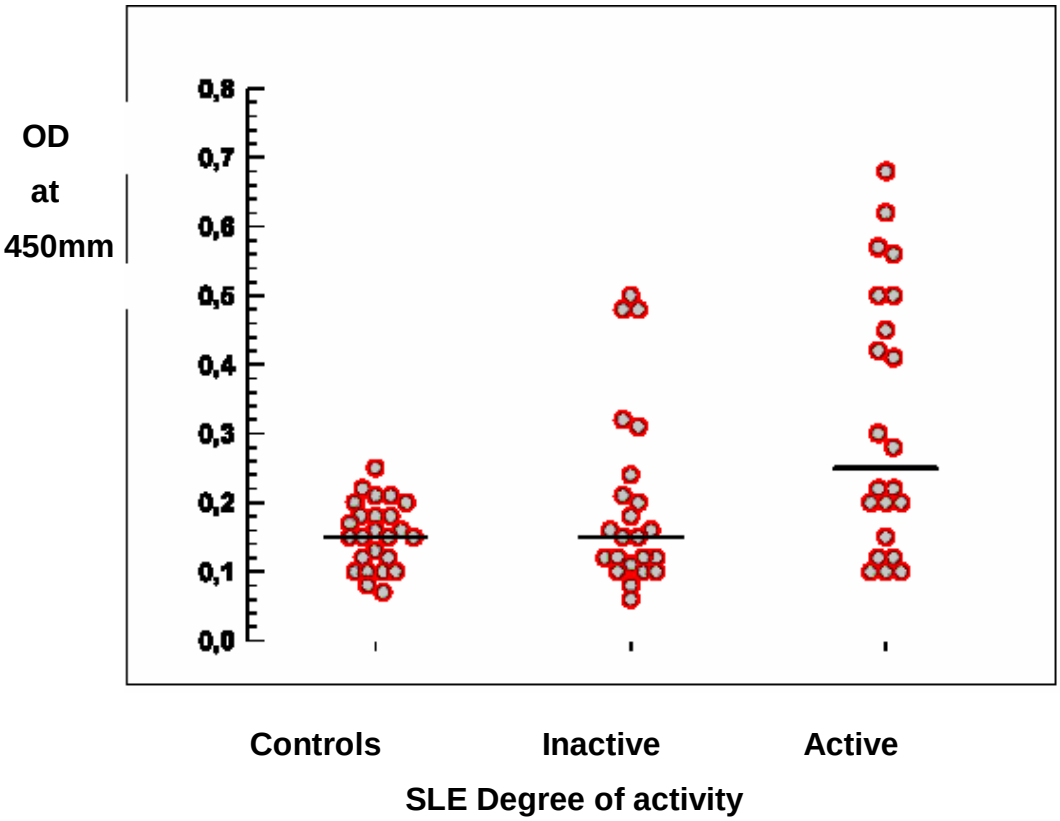


Figure 1: Anti-Hsp90 antibodies levels in healthy controls and patients with inactive or active SLE (OD = optic density)

Figure 2 illustrates the correlation, obtained by the Pearson test, of anti-Hsp90 antibodies levels and the SLEDAI. The Pearson correlation was significant (R= 0.52, P<0.001) indicating that, possibly, increased anti-Hsp90 levels are linked to the degree of activity of the disease.

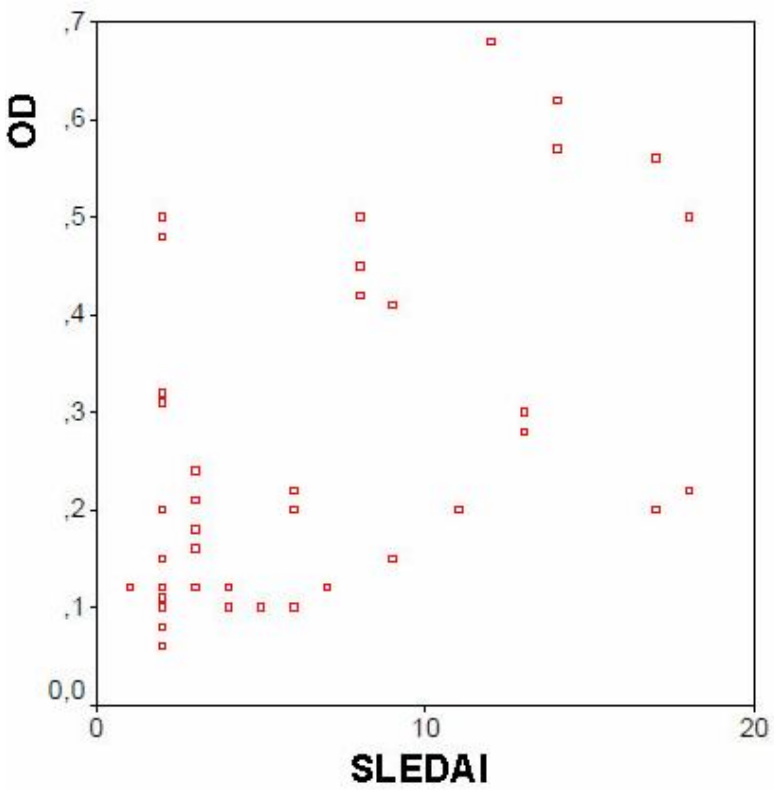


Figure 2 Relation among anti-Hsp90 levels (optic density at 450 nm) and disease activity rate (SLEDAI)

High anti-Hsp90 IgG levels (optic density>2 SD when compared to the healthy controls) were detected in one third (36%) of the 45 SLE patients and in none of the controls (P<0.002). Patients with active SLE had significant positivity for anti-Hsp90 when compared to controls and inactive SLE patients. There was no difference in the degree of antibody positivity when inactive SLE patients and controls were compared. These data are summarized in Table 3.

Table 3. Frequency of anti-Hsp90 positive test in the 3 groups studied

	Positive Anti-Hsp90	Negative Anti-Hsp90	P*
SLE (n = 45)	16 (36%)	29 (64%)	< 0.002
Controls (n = 25)	0	25 (100%)	
Active SLE (n =22)	11 (50%)	11 (50 %)	< 0.001
Controls (n = 25)	0	25 (100 %)	
Inactive SLE (n =23)	5 (22 %)	18 (82%)	> 0.05
Controls (n =25)	0	25 (100%)	
Active SLE (n =22)	11 (50%)	11 (50%)	< 0.05
Inactive SLE (n =23)	5 (22%)	18 (82%)	

SLE: systemic lupus erythematosus;
Hsp90: heat shock protein 90kDa;
n: sample;
*Chi-square or Fisher's exact test

Table 4 analyses the association of a positive anti-Hsp90 test and clinical and laboratory findings. An association of anti-Hsp90 antibodies with anti-DNA antibodies, leucopenia, and thrombocytopenia, but not with other variables, were obtained.

Table 4: Clinical and laboratory data on SLE patients with positive and negative anti-Hsp90

	Positive Anti-Hsp90 n =16	**Negative Anti-Hsp90 n = 29**	**P#**
Age, years ± SD	45.2 ± 12.5	44.1 ± 10.7	0.377
Gender, fem : male	14 : 2	25 : 1	-
Proteinuria*	4 (19 %)	1 (3 %)	0.088
Alopecia	6 (37 %)	6 (21 %)	0.385
Mucosal ulcer	8 (50 %)	6 (21 %)	0.090
Arthritis	6 (37 %)	5 (17 %)	0.250
Malar erythema	9 (56 %)	11 (38 %)	0.384
Anti-DNA	9 (56 %)	4 (14 %)	0.008
Fewer	1 (6 %)	1 (3 %)	1.000
Visual disorders	1 (6 %)	0	0.760
CPC**	1 (6 %)	0	0.760
Low C***	3 (18 %)	0	0.074
Hematuria	2 (12 %)	0	0.233
Pyuria	1 (6 %)	0	0.760
Psychosis	2 (12 %)	0	0.233
Leucopenia	9 (56%)	6 (21%)	0.036
Pericarditis	1 (6 %)	0	0.760
Myositis	1 (6 %)	0	0.760
Thrombocytopenia	1(6 %)	1 (3 %)	0,.008

Hsp90– heat shock protein 90 kDa;
n: sample size;
SD: standard deviation;
*Proteinuria > 0.5 g/day;
**Cranial nerve commitment;
***Low Complement – decrease of C3 and C4;
Chi square test or Fishers' exact test

Table 5 shows the diagnostic properties of the anti-Hsp90 IgG test in all SLE patients and in the groups with active or inactive disease. The test sensitivity was low for the whole group (36%). In patients with active disease sensitivity was a little higher; in inactive SLE it was quite low. Test specificity

was 100% in the 3 studied SLE groups. LR+ data suggest that a positive IgG anti-Hsp90 test (> 2 SD) indicates a high probabilityof SLE.

Table 5 Diagnostic properties of anti-Hsp90 IgG test; it was considered positive when SD was >2

	TOTAL SLE	ACTIVE SLE	INACTIVE SLE
Sensitivity (CI %)	36% (22 – 51)	50% (28 – 72)	22% (7- 44)
Specificity (CI %)	100% (86 – 100)	100% (86 – 100)	100% (86 – 100)
LR+	18,7	26	11,9

SLE: systemic lupus erythematosus
CI: confidence interval
LR+: positive likelihood ratio

4 DISCUSSION

There is convincing evidence that Hsp are involved in autoimmune phenomena. As cytoplasmatic molecules with a role in protein formation, endogenous Hsp of eukaryotic organisms are clear candidates to regulate the presentation of antigens to lymphocytes. Apart from controlling the interaction of receptors and their ligands, Hsp90 seems to have a key role in antigen processing.[40]

Literature about the relationship between anti-Hsp90 antibodies and SLE is scanty. In this study, the first carried out in Brazil, levels of IgG anti-Hsp90 antibodies were assessed in patients with active and inactive SLE paired by

gender and age. The ELISA test allowed a quantitative assessment of the antibodies. Thus, a possible association between antibody levels and SLE activity rate (SLEDAI) could be determined.[38] Some diagnostic properties of this test were also analyzed.

The total casuistic of SLE was 45 individuals. As expected[41], there was a predominance of females in our lupus population. The mean age of our patients (44 years) was in accordance to previous reports.[42,43,44] There were no significant differences on gender and mean age of the all SLE patients as compared to control group.

In the 22 patients with active SLE the mean SLEDAI was 10.3, while in the 23 patients with inactive disease the mean SLEDAI was 2.2; this dichotomic stratification was expected, considering the study design. Malar erythema, alopecia, mucosal ulcers, and leucopenia were the most frequent clinical manifestations in our total SLE sample. These findings are supported by literature, in which 90% of SLE patients have musculoskeletal or mucocutaneous symptoms.[36] Proteinuria > 0.5g/day, alopecia, mucous ulcers, and arthritis were especially important in the active SLE group ($P<0.05$). It should be stressed that anti-DNA antibodies were documented indistinctively in active and inactive SLE, data somewhat unexpected when considering the classic association of this antibody with active lupic nephritis.[45]

The ELISA test for IgG anti-Hsp90 antibodies has not been globally standardized. Therefore, we carried out comparative analyses of the mean optic

density of patients with active or inactive SLE with that of the control group. The mean optic density of patients with active SLE was considerably higher than those of controls or patients with inactive SLE. These data are compatible with an exacerbated anti-Hsp90 response in patients with high SLEDAI.

When using the Pearson test, a significant correlation of growing levels of anti-Hsp90 and the degree of disease activity measured by SLEDAI ($R= 0.52$; $P<0.001$). These data probably reflect the higher bioavailability of Hsp90 to bind to the antibody in active SLE than in the inactive SLE.[46]

More than a simple response to cell stress, the increased expression of Hsp90 in SLE triggers an anti-Hsp90 response that seems to be particular of such disease.[47,48,49] In genetically modified murine, the increased Hsp90 expression and the subsequent production of anti-Hsp antibodies was mediated by Interleucine-6.[50]

It is also interesting to note that Hsp90 expression is higher in spontaneous murine SLE models than in control animals. In MRL/lpr mice the overexpression of Hsp90 seems to happen selectively in the spleen 2 months after the disease onset.[51] In this murine model the frequency of anti-Hsp90 antibodies increased with age, but it was not correlated with any special clinical parameter.[52]

Arbitrarily, the IgG anti-Hsp90 test was considered to be positive when the sample optic density was > 2 SD, higher than the mean of healthy controls.

Test positivity was documented in 36% of our SLE patients, and not found in any control-group subject.

These results are in agreement with those described by Conroy et al[47], where anti-Hsp90 IgG and anti-Hsp90 IgM were reported in, respectively, 26% and 35% of SLE patients ($P<0.025$ as compared to controls). Anti-Hsp90 levels were tested by ELISA in a pediatric population with 33 SLE cases, 55 juvenile idiopathic arthritis, 11 dermatomyositis cases. Anti-Hsp90 positivity in pediatric SLE was 24%.[53] This anti-Hsp90 prevalence was similar to adult SLE.[47] These data suggest a commom pathogenic pathway for juvenile and adult SLE. In a 15 patient survey, Minota et al.[35] reported anti-Hsp90 IgG positivity by western blot in about half of the lupus patients.

It should be emphasized that our active SLE patients had significant anti-Hsp90 positivity when compared to controls and inactive SLE. The degree of antibody positivity did not differ when comparing inactive SLE cases with controls.

In univariate analysis, the clinical and laboratory profile of our SLE patients was assessed in patients with or without anti-Hsp90 antibodies. Anti-Hsp90 antibody positivity was associated, in a well-defined way, to the presence of anti-DNA antibodies, but not to nephropathy. More than half of our anti-Hsp90 positive patients had simultaneous anti-DNA antibodies. This association is noteworthy and should be tested in other studies. A positive anti-DNA test is

known to predict glomerular disease. Of all SLE patients, 70% have anti-DNA positivity at some phase of their disease.[54]

The association of anti-Hsp90 with hematologic changes (leucopenia and thrombocytopenia) should be viewed with caution in this study, once the number of patients with such abnormalities was small. No other clinical or laboratory association was obtained from a positive anti-Hsp90 test in this sample.

In contrast to our findings, Conroy et al[47] reported a definite association between high levels of anti-Hsp90 (IgG and IgM) and low C3 levels; these authors also correlated the presence of IgM anti-Hsp90 antibodies with active kidney disease.[47] Hsp90 glomerular deposits were studied in kidney biopsies of 7 SLE patients and 17 patients with glomerulonephritis of other origins. Six of the 7 SLE patients had positive fluorescence for Hsp90; subepithelial, subendothial, and mesangial deposits were noticed. These Hsp90 deposits were lacking in non-SLE patients. Serum anti-Hsp antibodies of such SLE patients did not behave as natural antibodies, once they were only mildly absorbed in Fab fragments of the normal IgG.[55] It is also worthy to mention that natural anti-Hsp90 autoantibodies sometimes can be isolated from human polyclonal IgG and are representative of the normal IgG repertoire directed against highly preserved molecules.[56]

Dhillon et al[48] documented high levels of the Hsp90 protein in neuropsychiatric or cardiorespiratory in active disease in SLE patients, but

the opposite was seen in protein levels when these clinical manifestations were controlled.

As to the diagnostic properties of the anti-Hsp90 IgG test, some aspects are noteworthy, despite the small sample size. The sensitivity observed in the total SLE sample was not high (36%), but increased in active disease. The sensitivity for other studied SLE antibodies varies from 98% (anti-nuclear antibodies) to 10% (anti-SSB).[57]

As there was no positive antibody test in our control-group, the test specificity was 100% in all SLE groups. The interpretation of specificity is affected by the fact that no other controls were tested in this study (for instance, other autoimmune diseases) in which the antibody could be present. Needed to say, the specificity for antinuclear and anti-DNA antibodies in SLE is 80% and 50%, respectively.[58, 59]

The LR+ obtained indicates that a positive test for IgG anti-Hsp90 makes the diagnosis of SLE highly probable. In the 3 patient groups (total SLE, active SLE, and inactive SLE) the LR+ values, all above 10, imply the relevance of a positive test in medical decision making. In practice, the probability of SLE was 18.7 higher in patients with anti-Hsp90 than in those with a negative test; this becomes even more important in patients with active SLE.

5 LIMITATIONS OF THIS STUDY

Some limitations of this study should be mentioned. The first one regards the sample size of SLE patients; although within the sample calculation, it was quite small. The small sample size was not due to unavailability of patients in our Outpatient Clinic, but rather due to the high cost of anti-Hsp90 antibody test. A greater sample size would certainly improve interpretation of the diagnostic properties of the anti-Hsp90 test.

Hsp90 is certainly a most interesting protein from the physiopathological point of view. Its effect in processing and presentation of antigens to lymphocytes needs to be detailed in various other autoimmune diseases and also in tumors. Not having tested the Hsp90 antigen levels in parallel to the anti-Hsp90 antobodies was another limitation of our study. From a practical point of view, we could only test the IgG anti- Hsp90 isotype; testing of acute phase IgM anti-Hsp90 could have enriched the understanding of the anti-Hsp90 humoral response and its correlation to lupic activity.

As shown, the role of Hsp90 and humoral anti-Hsp90 response is and open subject in autoimmune diseases. At the moment, the available literature on the issue is rather limited. Moreover, casuistic of the majority of these studies are small. Newer studies should contribute to a more detailed knowledge of the anti-Hsp90–autoimmunity binome. A future laboratory standardization of the anti-Hsp90 antibody test will be an important step towards the use of this antibody as a biomarker for SLE or other autoimmune diseases.

6 CONCLUSIONS

I) The average levels of anti-Hsp90 antibodies were significantly higher in SLE than in controls;

II) A positive test for anti-Hsp90 seemed to associate to active lupic disease, particularly with anti-DNA antibodies and haematological abnormalities;

III) The test was shown to be highly specific, but with a low sensitivity in SLE patients. In patients with a positive IgG anti-Hsp90 test, the probability of SLE was considerable.

7 REFERENCES

1 Tan EM. Antibodies to nuclear antigens (ANA): their immunobiology and medicine. **Adv Immunol** 1982; 33: 167-240.

2 Winfield JB. Anti-lymphocyte antibodies in systemic lupus erythematosus . **Clin Rheum Dis** 1985; 11:523-549.

3 Lindquist S. The heat shock response. **Ann Rev Biochem** 1986; 55: 1151-91.

4 Lindquist S, Craig EA. The heat shock proteins. **Ann Rev Gen** 1988; 22: 631-775.

5 Shinnick TM, Vodkin MH, Williams JC, The Mycobacterium tuberculosis 65 kDa antigen is a heat shock protein wich corresponds to common antigen and to E. coli GroEL protein. **Infect Immun** 1988; 56: 446-51.

6 Young D, Lathigra R, Handrix R, Sweetsa D, Young RA. Stress proteins are immune targets in Leprosy and tuberculosis. **Proc Natl Acad Sci USA** 1988; 58: 4267-70.

7 Donati Y, Sloman D, Polla B. Oxidative injuryand the heat shock response. **Biochem Pharmacol** 1990; 40: 2571-7.

8 Gonzales M, Shiraishi K, Hisanaga K, Sagar S, Mandbach M, Sharp F. Heat Shock Proteins as markers of natural injury. **Mol Brain Res** 1989; 6: 93-100.

9 Young RA, Elliott TJ. Stress proteins infection and immune surveillance. **Cell** 1989; 59: 5-8.

10 Matthews R. Candida albicans hsp90; link between protective and autoimmunity. **J Med Microbiology** 1992; 36:367-70.

11 Matthews R, Burnie J. The role of hsp90 in fungal infection. **Immunology Today** 1992; 13: 345-48.

12 Galluccci S, Matzinger P. Danger signals: SOS to the immune system. **Curr Opin Immunol** 2001; 13: 114-9.

13 Winfield J, Jarjour W. Stress protein in autoimmunity. **Adv Exp Med Biol** 1994; 347; 99-113.

14 Pockley AG. Heat shock proteins, inflamation, and cardiovascular disease. **Circulation** 2002;105:1012-7.

15 Park HK, Park EC, Bae SW, Park MY, Kim SW, Yoo HS, et al. Expression of heat shock protein 27 in human atherosclerotic plaques and increased plasma level of heat shock protein 27 in patients with acute coronary syndrome. **Circulation** 2006; 114: 886-93.

16 Latchman DS. Heat shock proteins and human disease. **J Royal Coll Physicians** 1991; 25: 295-9.

17 Horváth L, Czirják L, Fekeete B, Jakab L, Prohászka Z, Cervenak L, Romics L, Singh M, Daha MR, Füst G. Levels of antibodies against C1q and 60 kDa of heat shock proteins in the será of patients with various autoimmune diseases. **Immunology Letters** 2001; 75: 103-9.

18 Ellis RJ. The molecular chaperone concept. **Semin Cell Biol** 1990; 1(1): 1-9.

19 Pelham HRB. Heat shock proteins: coming in the from cold. **Nature** 1988; 332: 776-7.

20 Ellis J. Proteins as molecular chaperons. **Nature** 1987;328:378-9.

21 Businaro R, Profumo E, Tagliani A, Leone S, D'Amati G, Ippoliti F, Leopizzi M, D'Arcangelo D, capoano R, FumagalliL, Salvati B, Riganò R. Heat-shock protein-90: a novel autoantigen in human carotid atherosclerosis. **Atherosclerosis** 2009;207(1):74-83.

22 Hickey E, Brandon SE, Sadis S, Smale G, Weber LA. Molecular cloning of sequences encoding the human heat shock proteins and their expression during hypertermia. **Gene** 1986; 43:147- 57.

23 Hickey E, Brandon SE, Sadis S, Smale G, Weber LA. Sequence and regulation of a gene encoding a human 89 kilo Dalton heat shock protein. **Mol Cell Biol** 1987; 2615-16.

24 Barnier JV, Bensaude O, Morange M, Babinet C, Mouse 89 kD heat shock protein: Two polypeptides with distinct development regulation. **Exp Cell Res** 1987; 170: 186-94.

25 Smith DG, Toft DO. Steroid receptors and their associated proteins. **Mol Endocrinol**; 1993; 7:1-11.

26 Parcellier A, Gurbunaxi S, Schitt E, Garrido C. Heat shock proteins, celular chaperones that modulate mitochondrial cell death pathways. **Biochem Biophys Res Commun** 2003; 304-505-12.

27 Garrido C, Ottavi P, Fromentin A, Arrigo AP, Chauffert B, Mehlen P. Hsp27 as a mediator of confluence-dependent resistence to cell death induced by anticancer drugs. **Cancer Res** 1997;57: 26662-7.

28 Lanneau D, de Thonel Aurelie, Maurel S, Didelot C. Garrido C. Apoptosis Versus Cell Differentiation: Role of Heat Shock proteins Hsp90, Hsp70 and Hsp27. **Prion** 2007; 1(1):53-60.

29 Trieb K, Gerth R, Holzer G, Grhns JG, Berger P, Kotz R. Antibodies to heat shock protein 90 in osteosarcoma patients correlate with response to neoadjuvant chemotherapy. **Br J Cancer** 2000; 82(1):85-7.

30 Shen WW, Liu HC, Yang YY, Lin CY, Chen KP, Yeh TS, Leu SJ. Anti-heat shock protein 90 is increased in acute mania. **Aust N Z J Psychiatry** 2006 ;40(8):712-6.

31 Goral J, Shenoy S, Mohanakumar T, Clany J Jr. Antibodies to 70 kD and 90 kD heat shock proteins are associated with graft-versus-host disease in peripheral blood stem cell transplant recipients. **Clin Exp Immunol**. 2002 March; 127(3): 553–559.

32 Qin HY, Mahon JL, Atkinson MA, Chaturvedi P, Lee-Chan E, Singh B. Type 1 diabetes alters anti-hsp90 autoantibody isotype. **J Autoimmun** 2003;20(3):237-45.

33 Zhang M, Hisaeda H, Kano S, Hao YP, Looaresuwan S, Aikawa M, Himeno K. Antibodies specif for heat shock proteins in human and murine malaria. **Clin Exp Immunol** 2002; 129(1):169-76.

34 Deguchi Y, Negoro S, Kishimoto S. Heat shock protein synthesis by human peripheral mononuclear cells from SLE patients. **Biochem Biophys Res Commun** 1987; 148:1063-68.

35 Minota S, Koyasu S, Yahara I, Winfield JB. Antibodies to the heat-shock protein hsp90 in systemic lupus erythematosus. **J Clin Invest** 1988; 81:106-9.

36 Jarjour WN, Jeffries BD, Davis JS, Welch WJ, Minura T, Winfield JB. Autoantibodies to human stress proteins. A survey of various rheumatic and other inflammatory diseases. **Arthrits and Rheumatism** 1991; 168:1475-80.

37 Hocheberg MC. Updating the American College of Rhematology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum** 1997; 40:1725.

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

39 Deeks JJ, Altmann DG. Diagnostic tests 4: likehood ratios. **BJM** 2004; 329: 168-9.

40 Hayem G, Bandt M De, Palazzo E, Roux S, Combe B, Eliaou JF, Kahn MF, Meyer O. Anti-heat shock protein 70 kDa and 90 kDa antibodies in serum of patients with rheumatoid arthritis. **Ann Rheum Dis** 1999; 58: 291-96.

41 Fairweather D, Frisancho-Kiss S, Rose NR. Sex differences in autoimmune disease from a pathological perspective. **Am J Pathol** 2008; 173(3): 600-9.

42 Hahn, B H. Lupus eritematoso sistêmico. In: Fauci AS, Braunwald E, Kasper D, Hauser SL, Longo DL, Jameson L. **Harrison: Medicina Interna**. 17 ed. Rio de Janeiro. Ed. McGraw-Hill; 2008. p.2075- 2083.

43 D'Cruz DP, Khamashta MA, Hughes GR. Systemic lupus erithematosus. **Lancet** 2007;369(9561):587-96.

44 Santos MJ, Capela S, Figueira R, Nero P, Matos AA, Silva C, Miranda L,Barcelos A, Marques A, Teixeira A, Branco J, da Silva JC, de Queiroz MV. Caracterização de uma população portuguesa de doentes com Lúpus Eritematoso Sistêmico. **Acta Reumatol Port** 2007; 32: 153-61

45 Sato EI, Bonfá ED, Costallt LTL, Silva NA, Brenol JCT, Santiago MB, Szajubok JCM, Rachid-Filho A, Barros RT, Vasconcelos M, Albuquerque EMN. Sociedade Brasileira de Reumatologia. **Projeto Diretrizes – Lúpus Eritematoso Sistêmico: Tratamento do Acometimento Cutâneo/articular**. 2004.

46 Hayem G, Bandt M De, Palazzo E, Roux S, Combe B, Eliaou JF, Kahn MF, Meyer O. Anti-heat shock protein 70 kDa and 90 kDa antibodies in serum of patients with rheumatoid arthritis. **Ann Rheum Dis** 1999; 58: 291-96.

47 Conroy SE, Faulds GB, Williams W, Latchman DS, Isenberg DA. Detection of autoantibodies to the 90 kDa heat shock protein in the systemic lupus erythematosus and other autoimmune diseases. **Br J Rheumatol** 1994; 33:923-26.

48 Dhillon VB, McCallum S, Norton PM, Twomey BM, Erkeller-Yuksel F, Lydyard P, Isenberg DA, Latchman DS. Differential heat shock protein over-expression and its clinical relevance in system lupus erythematosus. **Annals of the Rheumatic Diseases** 1993; 52: 436-42.

49 Norton PM, Isenberg DA, Latchman DS. levated levels of the 90kD heat shock protein in a proportion of SLE patients with active disease. **Journal of Autoimmunity** 1988; 2: 287-195.

50 Stephanou A, Conroy S, Isenberg DA, Maione D, Poli V, Ciliberto G, Latchman DS. Elevation of IL-6 in transgenic mice results in increased levels of the 90 kDa heat shock protein (hsp90) and production of anti-hsp90 antibodies. **J Autoimmun** 1998;11(3):249-53.

51 Faulds G, Isenberg DA, Latchman DS. The tissue specific elevation of the 90kDa heat shock protein precedes the onset of disease in lupus prone MRL/lpr mice. **J Rheumatol** 1994; 21: 234-38.

52 Faulds G, Conroy S, Madaio M, Isenberg D, Latchman D. Increased levels of antibodies to heat shock proteins with increasing age in Mrl/Mp-Ipr mice. **Br J Rhematolo** 1995; 34(7):610-5.

53 Conroy SE, Tucker L, Latchman DS, Isenberg DA. Incidence of anti Hsp 90 and 70 antibodies in children with SLE, juvenile dermatomyositis and juvenile chronic arthritis. **Clin Exp Rhematol** 1996; 14(1):99-104.

54 Neilson EG, Courser WG. Imunologic Renal Diseases. Philadelphia, ed Lippincott rares, 1996, p 1055-1089.

55 Kenderov A, Minkova V, Mihailova D, Giltiay N, Kyurkchiev S, Kehayov I, Kazatchkine M, Kaveri S, Pashov A. Lupus-specific kidney deposits of HSP90 are associated with altered IgG idiotypic interactions of anti-HSP90 autoantibodies. **Clin Exp Immunol** 2002 ;129(1):169-76.

56 Pashov A, Kenderov A, Kyurkchiev S, Kehayov I, Hristova S, Lacroix-Desmazes S, Giltiay N, Varamballi S, Kazatchkine MD, Kaveri SV. Autoantibodies to heat shock protein 90 in the human natural antibody repertoire. **Int Immuol** 2002; 14(5):453-61.

57 Neilson EG, Courser WG. Imunologic Renal Diseases. Philadelphia, ed Lippincott rares, 1996, p 1055-1089.

58 Shur, PH. Lupus Eritematoso Sistêmico. In: Cecil RL, Goldman L, Ausiello D. In: **Cecil: Tratado de Medicina Interna**. 22ª ed. Rio de Janeiro. Elsevier 2005. p.1939.

59 Egner W. The use of laboratory tests in the diagnosis of SLE. **J Clin Pathol** 2000; 53: 424- 32.

8 SUBMETIDO AO JOURNALOF CLINICAL PATHOLOGY

Submission Confirmation

Your submission is now complete. Thank you for submitting your work to Journal of Clinical Pathology.

Your manuscript has been given the ID JCP/2010/075770. Please use this to refer to your manuscript in any communications.

You may check on the status of your submission at any time by visiting your author area.

You can direct any other inquiries regarding this submission to jclinpath@bmjgroup.com.

Ester Rosári Raphaelli Dal Ben

Address for correspondence:
Éster Rosári Raphaelli Dal Bem
Hospital São Lucas da PUCRS
Av. Ipiranga 6690/220
CEP: 90610-000
Porto Alegre - RS. Brasil.
E-mail: reumatopucrs@gmail.com

Porto Alegre, January 14th, 2010

J Clin Pathol

Anti-Hsp90 antibodies and systemic lupus erythematosus

Ester Rosári Raphaelli Dal Ben[1], Henrique L. Staub[2]

1 Pharmacist and Biochemist.
2 PhD in Rheumatology; Consultant Professor of Rheumatology of Faculty of Medicine of Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS); Professor of the Post-Graduate Program of Faculty of Medicine of PUCRS.

Address for correspondence:
Ester Rosári Raphaelli Dal Ben
Serviço de Reumatologia
Hospital São Lucas da PUCRS
Av. Ipiranga 6690, sala 220
CEP 90610-000 – Porto Alegre – Brasil
e-mail: esterdalbem@ig.com.br

ABSTRACT

Systemic lupus erythematosus (SLE) is an autoimmune disease characterized by a considerable diversity of circulating autoantibodies. Heat shock proteins (Hsp), highly conserved in the evolution of species, are a possible target for autoantibodies in SLE. The humoral response to the 90 kilodaltons Hsp (Hsp90) in SLE was rarely addressed to date.

Key words: Anti-Hsp90 antibodies, systemic lupus erythematosus, autoimmunity.

Material and methods. In this cross-sectional and controlled study, we evaluated levels of anti-Hsp90 antibodies in active and inactive SLE patients and in healthy controls. Diagnosis of SLE was based on the American College of Rheumatology criteria of 1997. The presence of active SLE was confirmed by a SLEDAI above 4. IgG anti-Hsp90 antibodies were tested by immunoenzymatic assay. Levels above 2 standard deviation considering the average of controls were arbitrarly considered positive. To compare categoric and continuous variables and to estimate correlations, non-parametric, t test and Pearson coefficient were calculated.

Results. Forty-five patients with SLE (42 females, 93.3%) and 25 controls 22 females, 88%) were evaluated. Twenty-two of the 45 SLE patients (49%) had active disease. Urinary protein above 0.5 grams/day, alopecia, oral ulcers and arthritis were significantly more frequent in active than inactive SLE patients. Patients with active SLE showed average levels of anti-Hsp90 significantly higher than controls ($P<0.001$). The Pearson test revealed a significant correlation of levels of anti-Hsp90 with the SLEDAI ($R=0.51$, $P<0.001$). Sixteen SLE patients (36%) had a positive test for anti-Hsp90 ($P<0.02$ in comparison to healthy controls). A positive test for anti-Hsp90 was significantly more frequent in active SLE when compared to controls ($P<0.001$) and to inactive SLE ($P<0.05$). Positivity for anti-Hsp90 antibodies associated to occurrence of anti-DNA antibodies, leucopenia and thrombocytopenia. Specificity and sensitivity of the anti-Hsp 90 antibody test were 100% and 36%, respectively. The positive likelihood ratio (LR+) for anti-Hsp90 above 2 SD was elevated (18.7).

Conclusions. The average levels of anti-Hsp90 antibodies were significantly higher in SLE patients than controls. A positive testing for anti-Hsp90 seemed to associated to active disease, particularly anti-DNA antibodies and haematological changes. The test was highly specific, but its sensitivity was low in SLE patients. In individuals with antibody levels above 2 SD, the probability of SLE was elevated. The utilization of anti-Hsp90 antibodies as biomarkers of SLE and other autoimmune diseases shall be evaluated in future studies.

INTRODUCTION

Systemic Lupus erythematosus (SLE) is an autoimmune multifocal disease characterized by a plethora of autoantibodies. The detection of some autoantibodies as double strand anti-DNA and anti-Sm are very important to diagnose this disease[1]. Others, such as those directed against lymphocyte membrane antigens, contribute to T cells depletion and to immune dysfunctions characteristics of SLE[2]. Heat shock proteins (Hsp) are a group of proteins highly preserved during the evolution of species.[3,4,5,6] They are classified according to their molecular weight. Cellular expression of Hsp is increased in the presence of infections, anoxia, oxidative stress, and inflammatory damage.[5,6,7,8]

This preservation during the evolution of species implies that proteins that are homologous to human Hsp are found in infectious agents. Crossed antibodies and autoreactive T cells against exogenous and endogenous Hsp were detected in subjects infected by a number of pathogens[9,10,11]. Immunoreactivitity against Hsp of 60 kilodaltons (kDa), Hsp70, and Hsp 90 was documented in several autoimmune diseases.[13,14,15]. Hsp are highly immunogenic, and probably also have a positive effect on antigen presentation.[12]

Hsp are also involved in physiological roles. In this context we can mention: (a) folding of peptides and intracellular transport of proteins (mainly Hsp60 and Hsp70, also known as chaperons); (b) maintaining of proteins in

their inactive form in non-stimulated cells (Hsp90); (c) protein degradation (ubiquitin).[16,17] Hsp roles on denaturations of proteins is ATP-dependent[17,18]. In general terms, intracellular Hsp are cytoprotective, while surface Hsp mediate humoral responses.[19,20] According to recent data, Hsp90 is hyperexpressed in atherosclerotic plaques and in the serum of patients with carotid atherosclerosis.[21]

Hsp90, our main focus in this study, is an abundant cytoplasm protein representing 1% of the total of non-stimulated proteins. Hsp90 is encoded by two genes (Hsp 90α and Hsp 90β), both heat inducible.[22,23,24] In cell physiology, Hsp90 is known to keep key proteins as steroid receptors or tyrosine kinase Src inactive until converting them to the active form when cells are exposed to their ligands.[25] The cellular expression of Hsp90, Hsp70, and Hsp27 have a negative effect on apoptosis triggered by stimuli such as hyperthermia and oxidative stress. Due to their anti-apoptosis effect, these Hsp confer resistance to anti-cancer drugs and increase survival of tumor cells.[26,27,28] Of note, anti-Hsp antibodies correlate positively to chemotherapy response in patients with osteosarcoma.[29]

Exacerbated humoral anti-Hsp90 responses were described in patients with acute mania episodes[30] and with graft versus host disease[31]. In type I diabetes mellitus, although anti-Hsp90 levels are not increased, the isotypic profile of anti-IgG Hsp90 (IgG1, IgG3) differed from those of healthy subjects[32]. Regarding infectious diseases, high levels of anti-Hsp90 were detected in malaria patients.[33]

Although normally found in the cytoplasm, Hsp90 is expressed on the surface of peripheral blood mononuclear cells in about 20% of patients with active SLE[34]. There they can be targeted by autoantibodies. SLE studies from the 1980's and 1990's reported conflicting results on the prevalence of anti-Hsp90 antibodies in SLE[35, 36.]

The assays utilized for detection of anti-Hsp90 antibodies have not been standardized. The aim of this study is to assess anti-Hsp90 levels in patients with active and inactive SLE. The cutoff point will be obtained by testing healthy controls. Additionally, anti-Hsp90 levels will be correlated to lupus activity and clinical manifestations of the disease. Diagnostic properties of the anti-Hsp90 test will be also evaluated.

MATERIAL AND METHODS

2.1 Patients

This cross-sectional and controlled study included SLE patients seen at the Outpatient Clinics of the Rheumatology Department of the São Lucas Hospital of Pontifícal Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS) in 2008 and 2009. SLE patients fulfilling the 1997[37]criteria of the American College of Rheumatology (ACR) were selected consecutively. Their lupus state of activity

was classified according to the SLEDAI[38] in active SLE (SLEDAI≥4) and inactive SLEDAI ≤4).

Healthy volunteers matched by gender and age composed the control group. Subjects with rheumatologic symptoms and positive testing for antinuclear antibodies were excluded.

2.2 Detection of anti-Hsp90 antibodies

The immunoenzymatic assay to detect IgG anti-Hsp90 antibodies was performed according to the manufacturer's guidelines: 100 µL of serum samples diluted in 1:100 PBS-Tween (phosphate buffer in Tween saline) were added, in pairs, to each ELISA microplate well containing the antigen (Hsp 90 - Calbiochem – CA – USA) and incubated for 90 minutes at room temperature. Afterwards, the plates were washed 3 times in washing solution (ELISA Plate Wash - Calbiochem). Then 100 µL of goat IgG conjugated with peroxidase were added to each well and incubated for additional 60 minutes. After washing and drying the plates, 100 µL of the TBM (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) substrate was added to each well and incubated for 15 minutes at room temperature. Later, 100 µL of H_2SO_4 2,5N halting solution was added. Reading was performed using a spectrophotometer (Microplate BIO-TEK Instruments, model EL311) at 450 nm. The anti-Hsp antibodies test was arbitrarily

considered positive for SLE patients if the value of optic density was higher than 2 SD comparatively to the average of healthy controls.

2.3 Statistical analysis:

The chi-square and Fisher's test were used to compare categorical variables. The t test was used to compare continuous variables. Variance analysis was used in quantitative variables using log for asymmetric variables. P values <0.05 were considered significant. The correlation of anti-Hsp90 with SLEDAI was assessed by the Pearson test. The diagnostic properties of the test include calculating sensitivity, specificity, and the positive likelihood ratio (LR+). The Deeks scale was used to interpret LR+: values above 10 are associated with a high probability of disease and have relevant impact on medical decisions.[39]

RESULTS

The study included 45 patients (42 females, 93.3%), 22 (49%) with active disease. The control group consisted of 25 healthy volunteers (22 females, 88%). The groups (active SLE, inactive SLE, and controls) did not differ significantly as to gender and age. Mean SLEDAI was considerably higher in patients with active disease. Table 1 summarizes demographic data of active and inactive SLE patients and controls.

Table 1: Demographic data of patients with systemic lupus erythematosus (SLE) and controls

	Female Gender	P*	Age (years ± SD)	P*	SLEDAI ± SD	P*
Total SLE (n=45)	42 (93%)	0,69	44.5 ± 11.3	0,61	6+2 ± 5.2	-
Controls (n=25)	22 (88%)		43.1 ± 11.2		3 (1-18)**	
Active SLE (n=22)	19 (82%)	0,99	44.7 ± 10.2	0.62	10.3 ± 4.6	-
Controls (n=25)	22 (88%)		43.1 ± 11.2		-	
Inactive SLE (n=23)	23 (100 %)	0.24	44.3 ± 12.4	0.73	2.2 ± 0.5	-
Controls (n=25)	22 (88 %)		43+1 ± 11.2		-	
Active SLE (n=22)	19 (82 %)	0.11	44.7 ± 10.2	0.91	10.3 ± 4.6	< 0.001
Inactive SLE (n=23)	23 (100 %)		44.3 ± 12.4		2.2 ± 0.5	

n sample size;
SD: standard deviation;
SLEDAI: activity rate of systemic lupus erythematosus (active disease SLEDAI > 4);
* Chi-square test;
** Median (minimum-maximum).

Table 2 compares clinical manifestations of patients with active and inactive SLE. Proteinuria above 0.5 g/day, alopecia, mucosal ulcers, and arthritis were significantly more frequent in active than inactive SLE patients.

Table 2: Clinical manifestations in SLE patients

Clinical manifestations	Total SLE (n = 45)	Active SLE (n = 22)	Inactive SLE (n = 23)	P#
Proteinuria*	5 (11%)	5 (23%)	0	0.022
Alopecia	16 (36%)	15 (50%)	1 (4 %)	0.002
Mucosal ulcers	14 (31%)	13 (59 %)	1 (4 %)	< 0.001
Arthritis	11(24%)	11 (50 %)	0	< 0.001
Malar erythema	20 (44%)	12 (55 %)	8 (35 %)	0.301
Anti-DNA	13 (29%)	8 (36 %)	5 (22 %)	0.451
Leucopenia	15 (33%)	9 (41 %)	6 (26 %)	0.46
Low C**	3 (7%)	3 (14 %)	0	0.109
Psychosis	2 (4%)	2 (9 %)	0	0.23
Pyuria	1 (2%)	1 (5 %)	0	0.49
Hematuria	2 (4%)	2 (9 %)	0	0.23
Fewer	1 (2%)	1 (5 %)	0	0.49
Visual disorders	1 (2%)	1 (5 %)	0	0.49
Pericarditis	1 (2%)	1 (5 %)	0	0.49
CPC***	1 (2%)	1 (5 %)	0	0.49
Myositis	1 (2%)	1 (5 %)	0	0.49
Thrombocytopenia	2 (4%)	1 (5 %)	1 (4 %)	0.999

SLE – systemic lupus erythematosus
*Proteinuria > 0.5 g/day
**Low Complement – decrease of C3 and C4;
*** Cranial nerves committed;
# Chi square or Fisher's exact test

Figure 1 shows the the distribution of anti-Hsp90 levels in controls and SLE patients. The mean optic density of controls was 0.15 (0.07-0.25). In inactive SLE it was 0.15 (0.06-0.5); in active SLE, it was 0.25 (0.10-0.68). The mean optic density were significantly higher in active SLE when compared to controls (P=0.001) and to inactive SLE (P=0.001). The mean optic density of inactive SLE patients did not differ significantly from the control group (P>0.05).

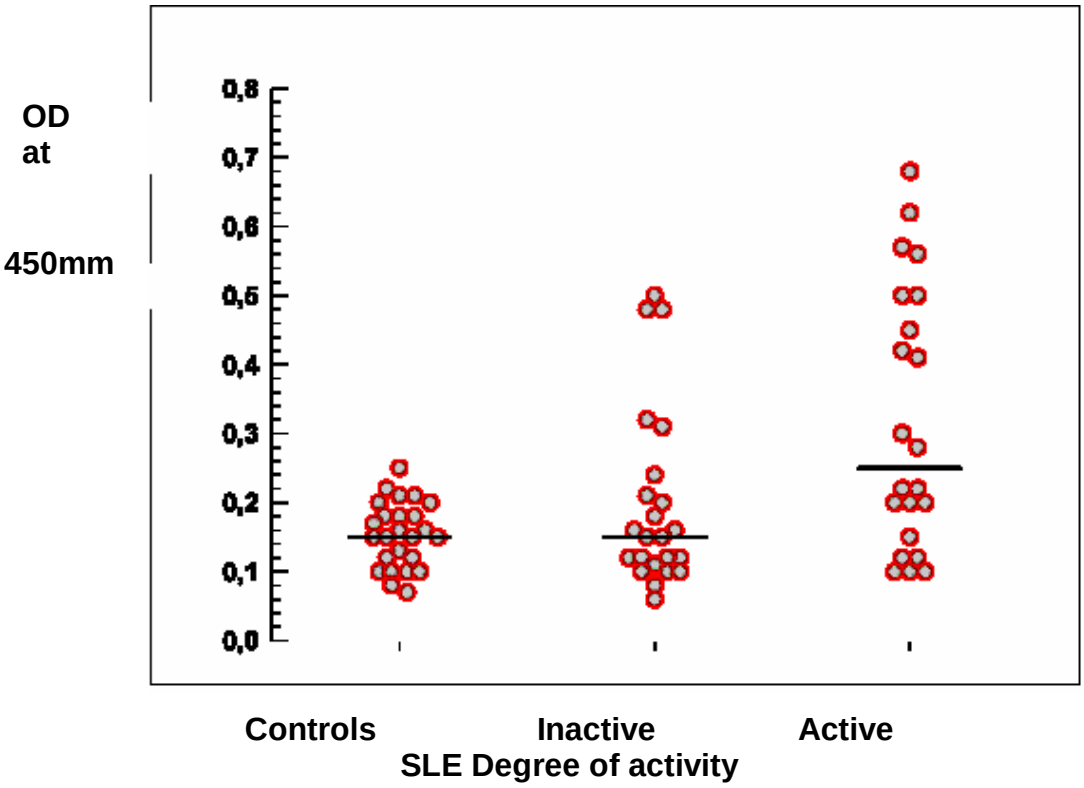


Figure 1: Anti-Hsp90 antibodies levels in healthy controls and patients with inactive or active SLE (OD = optic density)

Figure 2 illustrates the correlation, obtained by the Pearson test, of anti-Hsp90 antibodies levels and the SLEDAI. The Pearson correlation was significant (R= 0.52, P<0.001) indicating that, possibly, increased anti-Hsp90 levels are linked to the degree of activity of the disease.

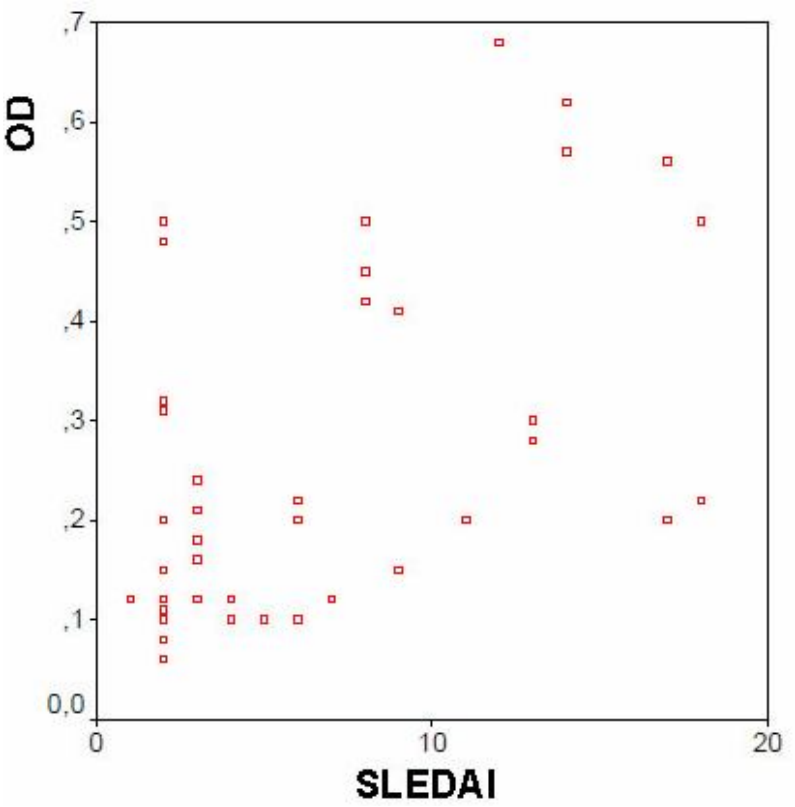


Figure 2 Relation among anti-Hsp90 levels (optic density at 450 nm) and disease activity rate (SLEDAI)

High IgG anti-Hsp90 levels (optic density>2 SD when compared to the healthy controls) were detected in one third (36%) of the 45 SLE patients and in none of the controls (P<0.002). Patients with active SLE had significant positivity for anti-Hsp90 when compared to controls and inactive SLE patients. There was no difference in the degree of antibody positivity when inactive SLE patients and controls were compared. These data are summarized in Table 3.

Table 3. Frequency of anti-Hsp90 positive test in the 3 groups studied

	Positive Anti-Hsp90	**Negative Anti-Hsp90**	**P***
SLE (n = 45)	16 (36%)	29 (64%)	< 0.002
Controls (n = 25)	0	25 (100%)	
Active SLE (n =22)	11 (50%)	11 (50 %)	< 0.001
Controls (n = 25)	0	25 (100 %)	
Inactive SLE (n =23)	5 (22 %)	18 (82%)	> 0.05
Controls (n =25)	0	25 (100%)	
Active SLE (n =22)	11 (50%)	11 (50%)	< 0.05
Inactive SLE (n =23)	5 (22%)	18 (82%)	

SLE: systemic lupus erythematosus;
Hsp90: heat shock protein 90kDa;
n: sample;
*Chi-square or Fisher's exact test

Table 4 analyses the association of a positive anti-Hsp90 test and clinical and laboratory findings. An association of anti-Hsp90 antibodies with anti-DNA antibodies, leucopenia, and thrombocytopenia, but not with other variables, were obtained.

Table 4: Clinical and laboratory data on SLE patients with positive and negative anti-Hsp90

	Positive Anti-Hsp90 n =16	**Negative Anti-Hsp90 n = 29**	**P**
Age, years ± SD	45.2 ± 12.5	44.1 ± 10.7	0.377
Gender, fem : male	14 : 2	25 : 1	-
Proteinuria*	4 (19 %)	1 (3 %)	0.088
Alopecia	6 (37 %)	6 (21 %)	0.385
Mucosal ulcer	8 (50 %)	6 (21 %)	0.090
Arthritis	6 (37 %)	5 (17 %)	0.250
Malar erythema	9 (56 %)	11 (38 %)	0.384
Anti-DNA	9 (56 %)	4 (14 %)	0.008
Fewer	1 (6 %)	1 (3 %)	1.000
Visual disorders	1 (6 %)	0	0.760
CPC**	1 (6 %)	0	0.760
Low C***	3 (18 %)	0	0.074
Hematuria,	2 (12 %)	0	0.233
Pyuria	1 (6 %)	0	0.760
Psychosis	2 (12 %)	0	0.233
Leucopenia	9 (56%)	6 (21%)	0.036
Pericarditis	1 (6 %)	0	0.760
Myositis	1 (6 %)	0	0.760
Thrombocytopenia	1(6 %)	1 (3 %)	0,.008

Hsp90– heat shock protein 90 kDa;
n: sample size;
SD: standard deviation;
*Proteinuria > 0.5 g/day;
**Cranial nerve commitment;
***Low Complement – decrease of C3 and C4;
Chi square test or Fishers' exact test

Table 5 shows the diagnostic properties of the IgG anti-Hsp90 test in all SLE patients and also in the groups with active or inactive disease. The test sensitivity was low for the whole group (36%). In patients with active disease, the sensitivity was a little higher; in inactive SLE it was quite low. Test specificity was 100% in the 3 studied SLE groups. The LR+ data suggest that a positive IgG anti-Hsp90 test (> 2 SD) indicates a high probability of SLE.

Table 5 Diagnostic properties of anti-Hsp90 IgG test; it was considered positive when SD was >2

	TOTAL SLE	ACTIVE SLE	INACTIVE SLE
Sensitivity (CI %)	36% (22 – 51)	50% (28 – 72)	22% (7- 44)
Specificity (CI %)	100% (86 – 100)	100% (86 – 100)	100% (86 – 100)
LR+	18,7	26	11,9

SLE: systemic lupus erythematosus
CI: confidence interval
LR+: positive likelihood ratio

DISCUSSION

There is convincing evidence that Hsp are involved in autoimmune phenomena. As cytoplasmatic molecules with a role in protein formation, endogenous Hsp of eukaryotic organisms are clear candidates to regulate the presentation of antigens to lymphocytes. Apart from controlling the interaction of receptors and their ligands, Hsp90 seems to have a key role in antigen processing.[40]

Literature on the relationship of anti-Hsp90 antibodies and SLE is scanty. In this study, the first carried out in Brazil, levels of IgG anti-Hsp90 antibodies were assessed in patients with active and inactive SLE and in healthy controls paired by gender and age. The ELISA test allowed a quantitative assessment of the antibodies. Thus, a possible association of antibody levels and SLE activity

rate (SLEDAI) could be determined.[38] Some diagnostic properties of this test were also analyzed.

The total casuistic of SLE was 45 individuals. As expected[41], there was a predominance of females in our lupus population. The mean age of our patients (44 years) was in accordance to previous reports.[42,43,44] There were no significant differences on gender and mean age of all SLE patients as compared to controls; likewise, there was an equal distribution of gender and mean age in the groups of active or inactive SLE when compared to the control group.

In the 22 patients with active SLE, the mean SLEDAI was 10.3, while in the 23 patients with inactive disease the mean SLEDAI was 2.2; this dichotomic stratification was expected, considering the study design. Malar erythema, alopecia, mucosal ulcers, and leucopenia were the most frequent clinical manifestations in our total SLE sample. These findings are supported by literature, in which 90% of SLE patients have musculoskeletal or mucocutaneous symptoms.[36] Proteinuria > 0.5g/day, alopecia, mucous ulcers, and arthritis were especially important in the active SLE group ($P<0.05$). It should be stressed that anti-DNA antibodies were documented indistinctively in active and inactive SLE, data somewhat unexpected when considering the classic association of this antibody with active nephritis.[45]

The ELISA test for IgG anti-Hsp90 antibodies has not been globally standardized. Therefore, we carried out comparative analyses of the mean

optic density of patients with active or inactive SLE with that of the control group. The mean optic density of patients with active SLE was considerably higher than those of controls or patients with inactive SLE. These data are compatible with an exacerbated anti-Hsp90 response in patients with high SLEDAI.

When using the Pearson test, a significant correlation of growing levels of anti-Hsp90 and degree of disease activity measured by SLEDAI ($R=0.52$; $P<0.001$) was found. These data probably reflect the higher bioavailability of Hsp90 to bind to the antibody in active SLE than in the inactive SLE[46].

More than a simple response to cell stress, the increased expression of Hsp90 in SLE triggers an anti-Hsp90 response that seems to be particular of such disease.[47,48,49] In genetically modified murine, the increased Hsp90 expression and the subsequent production of anti-Hsp antibodies was mediated by interleukin-6.[50.]

It is also interesting to note that Hsp90 expression is higher in spontaneous murine SLE models than in control animals. In MRL/lpr mice the overexpression of Hsp90 seems to happen selectively in the spleen 2 months after the disease onset[51]. In this murine model, the frequency of anti-Hsp90 antibodies increased with age, but it was not correlated with any special clinical parameter.[52]

Arbitrarly, in our study the IgG anti-Hsp90 test was considered to be positive when the sample optic density was>2 SD higher than the mean of

healthy controls. Test positivity was documented in 36% of our SLE patients, and not found in any control-group subject.

These results are in agreement with those described by Conroy et al,[47] where anti-Hsp90 IgG and anti-Hsp90 IgM were reported in, respectively, 26% and 35% of SLE patients (P<0.025 as compared to controls). Anti-Hsp90 levels were tested by ELISA in a pediatric population of 33 SLE, 55 juvenile idiopathic arthritis, and 11 dermatomyositis cases. Anti-Hsp90 positivity in pediatric SLE was 24%.[53] This anti-Hsp90 prevalence was similar to adult SLE[47]. These data suggest a commom pathogenic pathway for juvenile and adult SLE. In a 15 patient survey, Minota et al[35] reported anti-Hsp90 IgG positivity by western blot in about half of the lupus patients.

It should be emphasized that our active SLE patients had significant anti-Hsp90 positivity when compared to controls and inactive SLE. The degree of antibody positivity did not differ when comparing inactive SLE cases with controls.

In a univariate analysis, the clinical and laboratory profile of our SLE patients was assessed in patients with or without anti-Hsp90 antibodies. Anti-Hsp90 antibody positivity was associated, in a well-defined way, to the presence of anti-DNA antibodies, but not to nephropathy. More than half of our anti-Hsp90 positive patients had simultaneous anti-DNA antibodies. This association is noteworthy and should be tested in other studies. A positive anti-

DNA test is known to predict glomerular disease. Of all SLE patients, 70% have anti-DNA positivity at some phase of their disease.[54]

The association of anti-Hsp90 with haematological changes (leucopenia and thrombocytopenia) should be viewed with caution in this study, once the number of patients with such abnormalities was small. No other clinical or laboratory association was obtained from a positive anti-Hsp90 test in our study.

In contrast to our findings, Conroy et al[47] reported a definite association of high levels of anti-Hsp90 (IgG, and IgM) and low C3 levels; these authors also correlated the presence of IgM anti-Hsp90 antibodies with active kidney disease[47]. Hsp90 glomerular deposits were studied in kidney biopsies of 7 SLE patients and 17 patients with glomerulonephritis of other origins. Six of the 7 SLE patients had positive fluorescence for Hsp90; subepithelial, subendothial, and mesangial deposits were noticed. These Hsp90 deposits were lacking in non-SLE patients. Serum anti-Hsp antibodies of such SLE patients did not behave as natural antibodies, oncethey were only mildly absorbed in Fab fragments of the normal IgG[55]. It is also worthy to mention that natural anti-Hsp90 autoantibodies sometimes can be isolated from human polyclonal IgG and are representative of the normal IgG repertoire directed against highly preserved molecules.[56]

Dhillon et al[48] documented high levels of the Hsp90 protein in neuropsychiatric or cardiorespiratory active disease in SLE patients, but the

opposite was seen in protein levels when these clinical manifestations were controlled.

As to the diagnostic properties of the anti-Hsp90 IgG test, some aspects are noteworthy, despite the small sample size. The sensitivity observed in the total SLE sample was not high (36%), but increased in active disease. The sensitivity for other studied SLE antibodies varies from 98% (anti-nuclear antibodies) to 10% (anti-SSB).[57]

As there was no positive antibody test in our control-group, the test specificity was 100% in all SLE groups. The interpretation of specificity is affected by the fact that no other controls were tested in this study (for instance, other autoimmune diseases) in which the antibody could be present. Needed to say, the specificity for antinuclear and anti-DNA antibodies in SLE is 80% and 50%, respectively.[58,59]

The LR+ obtained indicates that a positive test for IgG anti-Hsp90 makes the diagnosis of SLE highly probable. In the 3 patient groups (total SLE, active SLE, and inactive SLE) the LR+ values, all above 10, bring relevance for a positive test in medical decision making. In practice, the probability of SLE was 18.7 higher in patients with anti-Hsp90 antibodie3s than in those with a negative test; this becomes even more important in patients with active SLE.

LIMITATIONS OF THIS STUDY

Some limitations of this study should be mentioned. The first one regards the sample size of SLE patients; although within the limits of the sample calculation, it was quite small. The small sample size was not due to unavailability of patients in our Outpatient Clinic, but rather due to the high cost of the anti-Hsp90 antibody test. A greater sample size would certainly improve interpretation of the diagnostic properties of the anti-Hsp90 test.

Hsp90 is certainly a most interesting protein from the physiopathological point of view. Its effect in processing and presentation of antigens to lymphocytes needs to be detailed in various other autoimmune diseases and also in tumors. Not having tested the Hsp90 antigen levels in parallel to anti-Hsp90 antibodies was another limitation of our study. From a practical point of view, we could only test the IgG anti-Hsp90 isotype; testing of acute phase IgM anti-Hsp90 could have enriched the understanding of the anti-Hsp90 humoral response and its correlation to lupic activity.

As shown, the role of Hsp90 and humoral anti-Hsp90 response is and open matter in autoimmune diseases. At the moment, the available literature on the issue is rather limited. Moreover, casuistic of the majority of these studies are small. Newer studies should contribute to a more detailed knowledge of the anti-Hsp90-autoimmunity binome. A future laboratory standardization of the

anti-Hsp90 antibody test will be an important step towards the use of this antibody as a biomarker of SLE and other autoimmune diseases.

CONCLUSIONS

I) The mean levels of anti-Hsp90 antibodies were significantly higher in SLE patients than controls;

II) A positive test for anti-Hsp90 seemed to associate to active lupus disease, particularly anti-DNA antibodies and haematological abnormalities;

III) The test was shown to be highly specific, but with a low sensitivity in SLE patients. In patients with a positive IgG anti-Hsp90 test, the probability of SLE was considerable.

REFERENCES

1 Tan EM. Antibodies to nuclear antigens (ANA): their immunobiology and medicine. **Adv Immunol** 1982; 33: 167-240.

2 Winfield JB. Anti-lymphocyte antibodies in systemic lupus erythematosus . **Clin Rheum Dis** 1985; 11:523-549.

3 Lindquist S. The heat shock response. **Ann Rev Biochem** 1986; 55: 1151-91.

4 Lindquist S, Craig EA. The heat shock proteins. **Ann Rev Gen** 1988; 22: 631-775.

5 Shinnick TM, Vodkin MH, Williams JC, The Mycobacterium tuberculosis 65 kDa antigen is a heat shock protein wich corresponds to common antigen and to E. coli GroEL protein. **Infect Immun** 1988; 56: 446-51.

6 Young D, Lathigra R, Handrix R, Sweetsa D, Young RA. Stress proteins are immune targets in Leprosy and tuberculosis. **Proc Natl Acad Sci USA** 1988; 58: 4267-70.

7 Donati Y, Sloman D, Polla B. Oxidative injuryand the heat shock response. **Biochem Pharmacol** 1990; 40: 2571-7.

8 Gonzales M, Shiraishi K, Hisanaga K, Sagar S, Mandbach M, Sharp F. Heat Shock Proteins as markers of natural injury. **Mol Brain Res** 1989; 6: 93-100.

9 Young RA, Elliott TJ. Stress proteins infection and immune surveillance. **Cell** 1989; 59: 5-8.

10 Matthews R. Candida albicans hsp90; link between protective and autoimmunity. **J Med Microbiology** 1992; 36:367-70.

11 Matthews R, Burnie J. The role of hsp90 in fungal infection. **Immunology Today** 1992; 13: 345-48.

12 Galluccci S, Matzinger P. Danger signals: SOS to the immune system. **Curr Opin Immunol** 2001; 13: 114-9.

13 Winfield J, Jarjour W. Stress protein in autoimmunity. **Adv Exp Med Biol** 1994; 347; 99-113.

14 Pockley AG. Heat shock proteins, inflamation, and cardiovascular disease. **Circulation** 2002;105:1012-7.

15 Park HK, Park EC, Bae SW, Park MY, Kim SW, Yoo HS, et al. Expression of heat shock protein 27 in human atherosclerotic plaques and increased plasma level of heat shock protein 27 in patients with acute coronary syndrome. **Circulation** 2006; 114: 886-93.

16 Latchman DS. Heat shock proteins and human disease. **J Royal Coll Physicians** 1991; 25: 295-9.

17 Horváth L, Czirják L, Fekeete B, Jakab L, Prohászka Z, Cervenak L, Romics L, Singh M, Daha MR, Füst G. Levels of antibodies against C1q and 60 kDa of heat shock proteins in the será of patients with various autoimmune diseases. **Immunology Letters** 2001; 75: 103-9.

18 Ellis RJ. The molecular chaperone concept. **Semin Cell Biol** 1990; 1(1): 1-9.

19 Pelham HRB. Heat shock proteins: coming in the from cold. **Nature** 1988; 332: 776-7.

20 Ellis J. Proteins as molecular chaperons. **Nature** 1987;328:378-9.

21 Businaro R, Profumo E, Tagliani A, Leone S, D'Amati G, Ippoliti F, Leopizzi M, D'Arcangelo D, capoano R, FumagalliL, Salvati B, Riganò R. Heat-shock protein-90: a novel autoantigen in human carotid atherosclerosis. **Atherosclerosis** 2009;207(1):74-83.

22 Hickey E, Brandon SE, Sadis S, Smale G, Weber LA. Molecular cloning of sequences encoding the human heat shock proteins and their expression during hypertermia. **Gene** 1986; 43:147- 57.

23 Hickey E, Brandon SE, Sadis S, Smale G, Weber LA. Sequence and regulation of a gene encoding a human 89 kilo Dalton heat shock protein. **Mol Cell Biol** 1987; 2615-16.

24 Barnier JV, Bensaude O, Morange M, Babinet C, Mouse 89 kD heat shock protein: Two polypeptides with distinct development regulation. **Exp Cell Res** 1987; 170: 186-94.

25 Smith DG, Toft DO. Steroid receptors and their associated proteins. **Mol Endocrinol**; 1993; 7:1-11.

26 Parcellier A, Gurbunaxi S, Schitt E, Garrido C. Heat shock proteins, celular chaperones that modulate mitochondrial cell death pathways. **Biochem Biophys Res Commun** 2003; 304-505-12.

27 Garrido C, Ottavi P, Fromentin A, Arrigo AP, Chauffert B, Mehlen P. Hsp27 as a mediator of confluence-dependent resistence to cell death induced by anticancer drugs. **Cancer Res** 1997;57: 26662-7.

28 Lanneau D, de Thonel Aurelie, Maurel S, Didelot C. Garrido C. Apoptosis Versus Cell Differentiation: Role of Heat Shock proteins Hsp90, Hsp70 and Hsp27. **Prion** 2007; 1(1):53-60.

29 Trieb K, Gerth R, Holzer G, Grhns JG, Berger P, Kotz R. Antibodies to heat shock protein 90 in osteosarcoma patients correlate with response to neoadjuvant chemotherapy. **Br J Cancer** 2000; 82(1):85-7.

30 Shen WW, Liu HC, Yang YY, Lin CY, Chen KP, Yeh TS, Leu SJ. Anti-heat shock protein 90 is increased in acute mania. **Aust N Z J Psychiatry** 2006 ;40(8):712-6.

31 Goral J, Shenoy S, Mohanakumar T, Clany J Jr. Antibodies to 70 kD and 90 kD heat shock proteins are associated with graft-versus-host disease in peripheral blood stem cell transplant recipients. Clin Exp Immunol. 2002 March; 127(3): 553–559.

32 Qin HY, Mahon JL, Atkinson MA, Chaturvedi P, Lee-Chan E, Singh B. Type 1 diabetes alters anti-hsp90 autoantibody isotype. **J Autoimmun** 2003;20(3):237-45.

33 Zhang M, Hisaeda H, Kano S, Hao YP, Looaresuwan S, Aikawa M, Himeno K. Antibodies specif for heat shock proteins in human and murine malaria. **Clin Exp Immunol** 2002; 129(1):169-76.

34 Deguchi Y, Negoro S, Kishimoto S. Heat shock protein synthesis by human peripheral mononuclear cells from SLE patients. **Biochem Biophys Res Commun** 1987; 148:1063-68.

35 Minota S, Koyasu S, Yahara I, Winfield JB. Antibodies to the heat-shock protein hsp90 in systemic lupus erythematosus. **J Clin Invest** 1988; 81:106-9.

36 Jarjour WN, Jeffries BD, Davis JS, Welch WJ, Minura T, Winfield JB. Autoantibodies to human stress proteins. A survey of various rheumatic and other inflammatory diseases. **Arthrits and Rheumatism** 1991; 168:1475-80.

37 Hocheberg MC. Updating the American College of Rhematology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum** 1997; 40:1725.

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

39 Deeks JJ, Altmann DG. Diagnostic tests 4: likehood ratios. **BJM** 2004; 329: 168-9.

40 Hayem G, Bandt M De, Palazzo E, Roux S, Combe B, Eliaou JF, Kahn MF, Meyer O. Anti-heat shock protein 70 kDa and 90 kDa antibodies in serum of patients with rheumatoid arthritis. **Ann Rheum Dis** 1999; 58: 291-96.

41 Fairweather D, Frisancho-Kiss S, Rose NR. Sex differences in autoimmune disease from a pathological perspective. **Am J Pathol** 2008; 173(3): 600-9.

42 Hahn, B H. Lupus eritematoso sistêmico. In: Fauci AS, Braunwald E, Kasper D, Hauser SL, Longo DL, Jameson L. **Harrison: Medicina Interna**. 17 ed. Rio de Janeiro. Ed. McGraw-Hill; 2008. p.2075- 2083.

43 D'Cruz DP, Khamashta MA, Hughes GR. Systemic lupus erithematosus. **Lancet** 2007;369(9561):587-96.

44 Santos MJ, Capela S, Figueira R, Nero P, Matos AA, Silva C, Miranda L,Barcelos A, Marques A, Teixeira A, Branco J, da Silva JC, de Queiroz MV. Caracterização de uma população portuguesa de doentes com Lúpus Eritematoso Sistêmico. **Acta Reumatol Port** 2007; 32: 153-61

45 Sato EI, Bonfá ED, Costallt LTL, Silva NA, Brenol JCT, Santiago MB, Szajubok JCM, Rachid-Filho A, Barros RT, Vasconcelos M, Albuquerque EMN. Sociedade Brasileira de Reumatologia. **Projeto Diretrizes – Lúpus Eritematoso Sistêmico: Tratamento do Acometimento Cutâneo/articular**. 2004.

46 Hayem G, Bandt M De, Palazzo E, Roux S, Combe B, Eliaou JF, Kahn MF, Meyer O. Anti-heat shock protein 70 kDa and 90 kDa antibodies in serum of patients with rheumatoid arthritis. **Ann Rheum Dis** 1999; 58: 291-96.

47 Conroy SE, Faulds GB, Williams W, Latchman DS, Isenberg DA. Detection of autoantibodies to the 90 kDa heat shock protein in the systemic lupus erythematosus and other autoimmune diseases. **Br J Rheumatol** 1994; 33:923-26.

48 Dhillon VB, Callum S, Norton PM, Twomey BM, Erkeller-Yuksel F, Lydyard P, Isenberg DA, Latchman DS. Differential heat shock protein over-expression and its clinical relevance in system lupus erythematosus. **Annals of the Rheumatic Diseases** 1993; 52: 436-42.

49 Norton PM, Isenberg DA, Latchman DS. Elevated levels of the 90kD heat shock protein in a proportion of SLE patients with active disease. **Journal of Autoimmunity** 1988; 2: 287-195.

50 Stephanou A, Conroy S, Isenberg DA, Maione D, Poli V, Ciliberto G, Latchman DS. Elevation of IL-6 in transgenic mice results in increased levels of the 90 kDa heat shock protein (hsp90) and production of anti-hsp90 antibodies. **J Autoimmun** 1998;11(3):249-53.

51 Faulds G, Isenberg DA, Latchman DS. The tissue specific elevation of the 90kDa heat shock protein precedes the onset of disease in lupus prone MRL/lpr mice. **J Rheumatol** 1994; 21: 234-38.

52 Faulds G, Conroy S, Madaio M, Isenberg D, Latchman D. Increased levels of antibodies to heat shock proteins with increasing age in Mrl/Mp-lpr mice. **Br J Rhematolo** 1995; 34(7):610-5.

53 Conroy SE, Tucker L, Latchman DS, Isenberg DA**.** Incidence of anti Hsp 90 and 70 antibodies in children with SLE, juvenile dermatomyositis and juvenile chronic arthritis. **Clin Exp Rhematol** 1996; 14(1):99-104.

54 Neilson EG, Courser WG. Imunologic Renal Diseases. Philadelphia, ed Lippincott rares, 1996, p 1055-1089.

55 Kenderov A, Minkova V, Mihailova D, Giltiay N, Kyurkchiev S, Kehayov I, Kazatchkine M, Kaveri S, Pashov A. Lupus-specific kidney deposits of HSP90 are associated with altered IgG idiotypic interactions of anti-HSP90 autoantibodies. **Clin Exp Immunol** 2002 ;129(1):169-76.

56 Pashov A, Kenderov A, Kyurkchiev S, Kehayov I, Hristova S, Lacroix-Desmazes S, Giltiay N, Varamballi S, Kazatchkine MD, Kaveri SV. Autoantibodies to heat shock protein 90 in the human natural antibody repertoire. **Int Immuol** 2002; 14(5):453-61.

57 Neilson EG, Courser WG. Imunologic Renal Diseases. Philadelphia, ed Lippincott rares, 1996, p 1055-1089.

58 Shur, PH. Lupus Eritematoso Sistêmico. In: Cecil RL, Goldman L, Ausiello D. In: **Cecil: Tratado de Medicina Interna**. 22ª ed. Rio de Janeiro. Elsevier 2005. p.1939.

59 Egner W. The use of laboratory tests in the diagnosis of SLE. **J Clin Pathol** 2000; 53: 424- 32.

9 APÊNDICE

9.1 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

PROJETO

Anticorpos anti Hsp 90 e lúpus eritematoso sistêmico.

Por que este estudo está sendo realizado?

O ambulatório de Reumatologia do Hospital São Lucas da PUCRS atende centenas de pacientes portadores de diversas doenças reumáticas, entre elas, o Lúpus Eritematoso Sistêmico.

Este estudo está sendo realizado com o objetivo de estabelecer uma relação entre a quantidade de anticorpos que o paciente produz contra um tipo de proteína - Hsp 90 - e o lúpus eritematoso sistêmico. Estes dados servirão como dados adicionais para a compreensão e diagnóstico da doença .

De que consta o estudo?

O estudo será feito pela análise do prontuário do paciente para verificar o estágio (nível da doença) e de exames de sangue em pacientes com lupus e pacientes saudáveis .

Quais as vantagens em participar deste estudo?

Contribuir para o avanço e progresso do conhecimento sobre Lúpus Eritematoso Sistêmico;

Inexistência de qualquer risco para paciente;

A coleta dos dados será realizada durante consulta de rotina no ambulatório de Reumatologia, o que não implica em comparecimento adicional para participar da pesquisa.

Quais as desvantagens em participar deste estudo?

Tempo maior de permanência no ambulatório para coleta de dados.

Realizar punção venosa para coleta de sangue, que pode causar dor temporária e coleção de sangue na pele (equimose ou hematoma).

Dados relativos à proteção do paciente?

Os dados coletados neste estudo são confidenciais, e não serão revelados os dados que permitam identificar os pacientes em hipótese alguma;

A adesão ao estudo é voluntária, ou seja, cada pacientes é livre para decidir não participar;

A decisão de não participar não irá interferir no acompanhamento e tratamento normal dos pacientes no Ambulatório, na Emergência e nem na internação do Hospital São Lucas da PUCRS;

O paciente é livre para desistir do estudo em qualquer momento, sem necessidade de fornecer justificativa.

Compreensão e Autorização.

Tendo compreendido as informações do presente termo de consentimento e concordado com elas, autorizo a revisão do prontuário e coleta de sangue para doação à pesquisa e armazenamento pelo Serviço de Reumatologia do Hospital São Lucas da PUCRS.

Caso tiver dúvidas sobre este estudo, posso chamar Dr. Henrique Staub ou Ester Rosári R. Dal Ben nos telefones abaixo citados para qualquer pergunta sobre meus direitos como participante deste estudo. Declaro que recebi cópia do presente Termo de Consentimento.

Paciente:_____
Registro:_____Assinatura:_____
_____

Pesquisador:_____
Assinatura do pesquisador:_____

Porto Alegre, _____ de_____ de 2009.

Pesquisadores responsáveis:

Dr Henrique Luiz Staub – Tel(51) 3339-1622 ou (51) 3320-3000 – Ramal: 2368

Farm. Bioq. Ester Rosári Raphaelli Dal Ben – Tel : (51) 3656-1260

Comitê de Ética e Pesquisa – Tel (51) 3320-3345

9.2 ÍNDICE DE ATIVIDADE DA DOENÇA – LES TOTAL:.....

Paciente : .....Prontuário : .....
Idade: ..... Data da coleta:..... **SLEDAI**

Pontuação Score	Manifestação observada	Definição
( ) 8	Convulsão	Início recente, excluídas causas metabólicas, infecciosas e drogas
( ) 8	Psicose	Distúrbio severo da realidade, excluídas causas metabólicas e drogas
( ) 8	Síndrome orgânico-cerebral (delirium)	Alteração da atenção, memória e outras funções intelectuais, de início rápido e características flutuantes
( ) 8	Distúrbios visuais	Alteração da retina: corpos cistóides, hemorragia, exsudato seroso ou hemorrágico do plexo coróide ou neurite óptica. Excluir infecções e drogas
( ) 8	Comprometimento dos pares cranianos	Neuropatia sensorial ou motora, de início ou reinício recente
( ) 8	Cefaléia lúpica	Severa e persistente, tipo enxaqueca, mas não responsiva a analgésicos
( ) 8	AVE	Excluir aterosclerose
( ) 8	Vasculites	Ulcerações, gangrenas, infartos periunguinais, nódulos digitais dolorosos, áreas hemorrágicas ou biópsia de qualquer área com vasculite
( ) 4	Artrites	Em 2 ou mais articulações
( ) 4	Miosite	Dor, fraqueza muscular/aumento de CPK e/ou aldolase/EMG alterada
( ) 4	Cilindrúria	Cilindros hemáticos ou granulosos
( ) 4	Hematúria	> hemáceas/campo. Excluir litíase, infecção ou outra causa
( ) 4	Proteinúria	> 0,5 g /dia
( ) 4	Piúria	> 5/campo, excluir infecção
( ) 2	Rash cutâneo	Início recente ou recorrente
( ) 2	Alopécia	Início recente ou recorrente
( ) 2	Úlcera de mucosa	Início recente ou recorrente
( ) 2	Pericardite	Dor com, pelo menos, atrito e/ou efusão e/ou confirmação no ECG ou ECO
( ) 2	Complemento baixo	Diminuição de CH50, C3 e C4
( ) 2	Anti-DNA	>25% por FAR ou aumentado por outros testes
( ) 1	Febre	> 38ºC excluindo infecção
( ) 1	Trombocitopenia	< 100.000/mm³
( ) 1	Leucopenia	< 3.000/mm³ - excluir drogas

9.3 PACIENTES CONTROLES - QUESTIONÁRIO

Nome: .....

Sexo : M ☐ F ☐

Idade: ..... anos

Doenças reumáticas : S ☐ N ☐

Doenças autoimunes (outras): S ☐ N ☐

Diabetes : S ☐ N ☐

Hipertensão : S ☐ N ☐

Aterosclerose: S ☐ N ☐

Neoplasia : S ☐ N ☐

Infecções recentes: S ☐ N ☐ Quando?.....

Medicação de uso crônico : S ☐ N ☐ Qual (ais)?.....

Fator antinuclear : P ☐ N ☐ Título:.....

F = feminino

M = masculino

S = sim

P = positivo

N = não, negativo