



ACTA REUMATOLÓGICA PORTUGUESA

Publicação Trimestral • ISSN: 0303-464X • 10 €

Vol 33 • Nº 2
Abril/Junho 2008

*Med*farma
edições

ACTA REUMATOLÓGICA PORTUGUESA

CONSELHO EDITORIAL

Editor Chefe (Chief Editor)

Maria José Parreira Santos

Editores Associados (Associated Editors)

António Albino Teixeira	José António Pereira da Silva
Elizabeth Benito-Garcia	José Carlos Romeu
Helena Canhão	Maria José Leandro
Luís Graça	Paulo Nicola
João Eurico Fonseca	Teresa Carvalho

CONSELHO EDITORIAL INTERNACIONAL

Alfonse Masi (E.U.A.)	Ian Chikanza (Reino Unido)	Maurizio Cutolo (Itália)
Anisur Rahman (Reino Unido)	Jaime C. Branco (Portugal)	Maxime Dougados (França)
António Lopes Vaz (Portugal)	Jan Dequeker (Bélgica)	Michel Revel (França)
Auli Toivanen (Finlândia)	Johannes Bijlsma (Holanda)	Patricia Woo (Reino Unido)
Dafna Gladman (Canada)	JCW Edwards (Reino Unido)	Piet van Riel (Holanda)
David Isenberg (Reino Unido)	Joachim Kalden (Alemanha)	Rainer H. Straub (Alemanha)
Eliseo Pascual (Espanha)	John Isaacs (Reino Unido)	Ralph Schumacher (E.U.A.)
Emilia Sato (Brasil)	Joseph Smolen (Áustria)	Raashid Luqmani (Reino Unido)
Francisco Airtton da Rocha (Brasil)	Juan Gómez-Reino (Espanha)	Steffen Gay (Suíça)
Gabriel Herrero-Beaumont (Espanha)	Loreto Carmona (Espanha)	Tim Spector (Reino Unido)
Gerd Burmester (Alemanha)	Marcos Bosi Ferraz (Brasil)	Tore Kvien (Noruega)
Graciela Alarcon (E.U.A.)	Maria Odete Hilário (Brasil)	Yehuda Shoenfeld (Israel)
Hasan Yazici (Turquia)	Mário Viana de Queiroz (Portugal)	Yrjö Kontinen (Finlândia)

EDITOR TÉCNICO

J. Cavaleiro

Administração, Direcção Comercial e Serviços de Publicidade

Medfarma - Edições Médicas, Lda
Alameda António Sérgio 22, 4º B
Edif. Amadeo de Souza-Cardoso
1495-132 Alges
Tel: 214 121 142
Fax: 214 121 146

Redacção

Sociedade Portuguesa de Reumatologia
Rua D. Estefânia 177, 1º D
1000-154 Lisboa

Registo

Isenta de inscrição no I.C.S. nos termos da alínea a) do n.º 1 do artigo 12.º do Decreto Regulamentar n.º 8/99, de 9 de Junho.

Assinaturas Anuais (4 Números)

Yearly Subscriptions (4 Issues)

Individual/Personal Rate

Portugal30 e

Outside Portugal50 e

Instituições/Institutional Rate

Portugal40 e

Outside Portugal60 e

Depósito Legal: 86.955/95

Tiragem: 7.500 exemplares

Impressão e Acabamento

Selenova – Artes Gráficas, Lda.
Casais da Serra • 2665-305 Milharado

Produção Gráfica

Rita Correia

Periodicidade

Publicação Trimestral

Revista referenciada no Index Medicus, Medline, Pubmed desde Janeiro 2006.

Journal referred in Index Medicus, Medline, Pubmed since January 2006.

Revista incluída nos produtos e serviços disponibilizados pela Thomson Reuters, com indexação e publicação de resumos desde Janeiro de 2007 em:

- Science Citation Index Expanded (also known as SciSearch®)
- Journal Citation Reports/Science Edition

Journal selected for coverage in Thomson Reuters products and custom information services.

This publication is indexed and abstracted since January 2007 in the following:

- Science Citation Index Expanded (also known as SciSearch®)
- Journal Citation Reports/Science Edition

Proibida a reprodução, mesmo parcial, de artigos e ilustrações, sem prévia autorização da Acta Reumatológica Portuguesa.
Exceptua-se a citação ou transcrição de pequenos excertos desde que se faça menção da fonte.



O papel utilizado nesta publicação cumpre os requisitos da ANSI/NISO Z39.48-1992 (Permanence of Paper).
The paper used in this publication meets the requirements of ANSI/NISO Z39.48-1992 (Permanence of Paper).

ÓRGÃOS SOCIAIS DA SPR
BIÉNIO 2007-2008

DIRECÇÃO

Presidente	Dr. Augusto Faustino
Vice-Presidente	Dr. José Carlos Romeu
Vice-Presidente	Prof. Dr. João Eurico Fonseca
Sec. Geral	Dr. Luís Maurício Santos
Sec. Geral Adjunto	Dr. ^a Maria José Santos
Tesoureiro	Dr. ^a Helena Canhão
Vogal Região Norte	Dr. Armando Filipe Brandão
Vogal Região Centro	Dr. ^a Anabela Barcelos Figueiredo
Vogal Região Sul	Dr. ^a Ana Assunção Teixeira
Vogal Ilhas	Dr. Herberto Jesus

MESA DA ASSEMBLEIA GERAL

Presidente	Dr. Domingos Araújo
Secretário	Dr. ^a Paula Valente de Oliveira
Vogal	Dr. ^a Ana Cristina Cordeiro

CONSELHO FISCAL

Presidente	Dr. Armando Malcata
Relator	Dr. ^a Cláudia Margarida Cruz
Vogal	Dr. ^a Cândida Almeida Silva

PRESIDENTE ELEITO

Dr. Rui André Santos

SUMÁRIO / CONTENTS

EDITORIAIS / EDITORIALS

Rheumatology Training in Europe: new paradigms recommended 123
by the European Board of Rheumatology

Treino de Reumatologistas na Europa: novos paradigmas propostos
pelo European Board of Rheumatology

José António P. Silva, Maria João Salvador, Cátia Duarte

ARTIGOS DE REVISÃO / REVIEWS

SF-36 and the Development of New Assessment Tools for Quality of Life 127

O SF-36 e o Desenvolvimento de Novas Medidas de Avaliação de Qualidade de Vida

Alessandro Campolina, Rozana Ciconelli

O SF-36 é um dos questionários de qualidade de vida mais usados na actualidade. São abordados os aspectos relacionados à construção, propriedades psicométricas e aplicações desta ferramenta e de outras dela derivadas.

B cells: from the bench to the clinical practice 137

Linfócitos B: do laboratório à prática clínica

Rita Moura, Ana Água-Doce, Pamela Weinmann, Luís Graça, João Eurico Fonseca

Os autores fazem uma revisão do desenvolvimento dos linfócitos B, do seu papel nas respostas imunitárias adaptativas e do contributo destas células para a autoimunidade.

Novel Therapies in Lupus – Focus on Nephritis 157

Novas Terapêuticas no Lúpus – Foco na Nefrite

Ana C Cordeiro, David Isenberg

A nefrite é uma complicação *major* do Lúpus Eritematoso Sistémico e um desafio terapêutico. São aqui resumidos os mecanismos de acção e os resultados clínicos obtidos com fármacos de uso clínico recente ou ainda em fase de desenvolvimento para o tratamento do lúpus renal.

ARTIGOS ORIGINAIS / ORIGINAL PAPERS

Anti-Ro, Anti-La, Anti-RNP Antibodies and PR Interval in Adult Patients with Systemic Lupus Erythematosus 173

Anticorpos Anti-Ro, Anti-La e Anti-RNP e Intervalo PR do Eletrocardiograma de Adultos com Lúpus Eritematoso Sistémico

Militino Costa, Marília Barreto Gameiro Silva, José Antonio Silva, Thelma L Skare

Foi avaliada a influência dos anticorpos anti-Ro, La e RNP no intervalo PR do eletrocardiograma de pacientes adultos com Lúpus Eritematoso Sistémico.

SUMÁRIO / CONTENTS

- Genetic Polymorphisms of Low Molecular Weight Protein Tyrosine Phosphatase (LMW-PTP): relationship with erythrocyte enzymatic phenotype in patients with Systemic Lupus Erythematosus** 177
Polimorfismos Genéticos da Proteína Tirosina Fosfatase de Baixo Peso Molecular (LMW-PTP): sua relação com o fenótipo enzimático eritrocitário em doentes com Lúpus Eritematoso Sistémico

Maria de Fátima Martins, Raquel Carvalho, Miguel Alves, Carlos Ferreira, Manuel Diamantino Bicho

Neste estudo procedeu-se à caracterização dos polimorfismos genéticos da LMW-PTP e quantificação das respectivas actividades enzimáticas no eritrócito num grupo de indivíduos com Lúpus e num grupo controlo tendo em vista o estabelecimento de uma relação genótipo/fenótipo no LES.

- RAISE study – Observational and Cross Sectional Study to Evaluate the Actual Reality of the Socio-Economic Impact of Ankylosing Spondylitis** 189
Estudo RAISE – Estudo observacional, transversal, para avaliação da Realidade Actual do Impacto Sócio-Económico da Espondilite Anquilosante

Luís Miranda, Filipa Negreiro, MJ Queiroz, C Silva

Foi avaliada a relação das medidas de actividade, funcionalidade e de qualidade de vida com os custos suportados pelos doentes com espondilite anquilosante em Portugal.

- Nailfold Capillaroscopy in the Evaluation of Raynaud's Phenomenon and Undifferentiated Connective Tissue Disease** 203
A Capilaroscopia do Leito Ungueal na Avaliação Prognóstica do Fenómeno de Raynaud e da Doença Indiferenciada do Tecido Conjuntivo

Sara Cortes, Paulo Clemente-Coelho

Os autores estudaram o papel da capilaroscopia em doentes com fenómeno de Raynaud ou com doença indiferenciada do tecido conjuntivo e a sua importância na avaliação prognóstica relacionada com a possibilidade de uma evolução no diagnóstico ou na necessidade de introdução de novos tratamentos.

PRÁTICA CLÍNICA / CLINICAL PRACTICE

- Protocol for Evaluation and Monitoring of Systemic Lupus Erythematosus (PAMLES)** 210
Protocolo de Avaliação e Monitorização do Lúpus Eritematoso Sistémico (PAMLES)

Cândida Silva, Helena Canhão, Anabela Barcelos, Luís Miranda, Patrícia Pinto, Maria José Santos

Pelo Grupo de Estudos de Doenças Reumáticas Sistémicas (GEDRESIS) da Sociedade Portuguesa de Reumatologia (SPR)

É apresentado o Protocolo de Avaliação e Monitorização do Lúpus Eritematoso Sistémico o qual visa contribuir para a padronização da observação clínica e melhoria dos cuidados prestados a estes doentes.

CASOS CLÍNICOS / CLINICAL CASES

- Goodpasture's Syndrome** 220
Síndrome de Goodpasture

Samuel Shinjo, Eduardo Hasegawa, Denise Costa Malheiros, Mauricio Levy-Neto

O presente trabalho ilustra um caso de Síndrome de Goodpasture, inicialmente interpretada como granulomatose de Wegener, com uma evolução satisfatória após pulsos de metilprednisolona associados a plasmaferese e ciclofosfamida.

SUMÁRIO / CONTENTS

Cyclophosphamide-Intolerant Wegener's Granulomatosis Successfully Treated with Mycophenolate Mofetil 224

Granulomatose de Wegener Intolerante a Ciclofosfamida tratada com sucesso com Micofenolato Mofetil

Alina Osuna, Jesus Garrido

A ciclofosfamida é o fármaco classicamente utilizado no tratamento das formas graves da granulomatose de Wegener, mas nem sempre tolerado, devido à sua elevada toxicidade. Os autores relatam o sucesso obtido com Micofenolato Mofetil no tratamento de um jovem de 35 anos com granulomatose de Wegener pANCA+.

Ankylosing Spondylitis and Spinal Cord Injury 231

Espondilite Anquilosante e Lesão Medular

Pedro Machado, Jan Gawronski, Angela Gall

Os autores descrevem o caso de um doente de 72 anos de idade, com espondilite anquilosante avançada, que sofreu uma fractura vertebral após um pequeno traumatismo. Chamam à atenção para os factores que aumentam o risco de fracturas vertebrais e de lesão medular nos doentes com espondilite anquilosante e discutem estratégias de prevenção.

Juvenile Dermatomyositis Presenting with Anasarca: a possible new variant 238

Dermatomiosite Juvenil Associada a Anasarca: uma possível nova variante

Carlos Eduardo Filho, Lorena Carvalho, Luciano Carvalho, Maria do Socorro Almeida, José Salomão Budaruiche

Neste artigo apresenta-se o caso de um doente com dermatomiosite juvenil e anasarca, aspecto que tem sido raramente descrito, mas que pode corresponder a um pior prognóstico.

IMAGENS EM REUMATOLOGIA / IMAGES IN RHEUMATOLOGY

Neuropathic Shoulder Arthropathy and Syringomyelia 243

Artropatia Neuropática dos Ombros e Siringomielia

J. Garcia, M. J. Saavedra, P. Monteiro, J. Silva, A. Malcata

AGENDA 245

NORMAS DE PUBLICAÇÃO / INSTRUCTIONS TO AUTHORS 247

TREINO DE REUMATOLOGISTAS NA EUROPA: NOVOS PARADIGMAS PROPOSTOS PELO EUROPEAN BOARD OF RHEUMATOLOGY

José António P. Silva,* Maria João Salvador,** Cátia Duarte***

O *European Board of Rheumatology*, Secção de Reumatologia da União Europeia de Médicos Especialistas, produziu recentemente dois documentos que esperamos poderem representar um contributo valioso para a harmonização do treino em Reumatologia e para a melhoria dos seus padrões de qualidade na Europa e fora dela.

A necessidade de harmonização dos programas de pós-graduação é imposta pelas regras de casa comum adoptadas pelos países da União Europeia. O reconhecimento mútuo de títulos e diplomas determina que seja aceite tacitamente em toda a Europa o título de reumatologista obtido em qualquer país membro. Este facto torna imperioso que o país receptor possa estar tranquilo quanto à garantia de que este profissional possui as competências que considera inerentes a esse título, quer em abrangência, quer em profundidade. Mas será assim?

Um trabalho recentemente realizado no âmbito do EURORITS (*European Rheumatologists in Training*, secção da EULAR) revelou, além de uma imprevista mas reveladora dificuldade em definir exactamente o plano de treino em Reumatologia nos diferentes países membros da EULAR, que a duração de treino especializado pode variar entre os 18 meses e os seis anos. As diferenças de enquadramento da especialidade nos diferentes países europeus resulta também em variações relevantes no conteúdo do plano de formação. Na maior parte dos países europeus a reumatologia não assume o tratamento de lesões neoplásicas ósseas, que é contudo considerado nuclear em alguns, como a França. A realização de exames laboratoriais imunológicos é considerada nuclear à especialidade na Alemanha mas é aparentemente estranha à sua prática no resto da Europa.

*Presidente do *European Board of Rheumatology*, Secção de Reumatologia da UEMS, 2006-2010.

**Delegado do Colégio de Reumatologia da Ordem dos Médicos no *European Board of Rheumatology*.

***Delegado do PWG (*Permanent Working Group of Junior Doctors of the European Union*) no *European Board of Rheumatology*.

O objectivo da harmonização consiste em estabelecer consensualmente um conjunto nuclear de competências que todos os reumatologistas europeus devem dominar no final dos seus períodos de treino. Este objectivo é perfeitamente compatível com a adopção de diferentes modalidades de ensino e aprendizagem em cada país e ainda com a obrigatoriedade a nível nacional de competências consideradas opcionais a nível europeu. Não se trata, pois, de impor um modelo único ou um conteúdo monolítico de treino especializado em todos os países europeus, mas sim de procurar um núcleo mínimo comum.

Foi este o espírito subjacente à elaboração do *European Rheumatology Curriculum Framework*,¹ elaborado e consensualmente adoptado pelos representantes dos 29 países membros do *European Board of Rheumatology* (Secção de Reumatologia da UEMS) e pelo representante da EULAR nesta organização. Este documento mereceu já a ratificação e apoio das Associações Médicas da Especialidade de Alemanha, Áustria, Croácia, Dinamarca, Finlândia, França, Holanda, Portugal, Eslováquia, Eslovénia, Espanha, Suécia e Reino Unido. Em Portugal, foi aprovado pela Sociedade Portuguesa de Reumatologia e pelo Colégio de Reumatologia da Ordem dos Médicos.

O texto de ratificação, comum a todas as organizações, afirma: «This endorsement means that we recognize the value of this document as valuable guidance, providing a framework towards the harmonization of training and professional competence of rheumatologists within Europe and its individual countries.

We shall use this document as inspiration in the design and delivery of National Curricula and programmes related to the training of rheumatologists.»

Esta proposta curricular tem várias características inovadoras.

Merece destaque o facto de que os objectivos são definidos não em termos de conhecimentos

mas sim de competências. Estas são entendidas como a capacidade de articular o uso de conhecimentos, mas também de aptidões técnicas e relacionais, num contexto de atitude profissional e ética, para a resolução adequada de problemas de natureza clínica e profissional no âmbito da especialidade e da prática Médica em geral.

Mais relevante contudo é, a nosso ver, a adopção de uma estruturação destas competências segundo os «sete papéis do Médico» previstos no modelo Canadano (CanMeds 2005):² *Medical Expert, Communicator, Collaborator, Manager, Schollar, Health Advocate, Professional*.

Esta estrutura foi adoptada por permitir autonomizar e destacar um conjunto de competências médicas que ultrapassam o âmbito estritamente técnico e científico, mas que não podem deixar de considerar-se absolutamente nucleares ao exercício moderno da medicina, especialmente no contexto europeu. Estas incluem, entre outras, a capacidade de comunicar eficaz e cordialmente com doentes e com pares e a competência na cooperação interprofissional na procura do melhor para o doente. O Médico não pode também eximir-se às responsabilidades de gestão que lhe cabem, pelo menos na apreciação rigorosa das relações de custo-benefício das diferentes intervenções e na contribuição que deve dar ao emprego judicioso e equitativo dos recursos disponíveis. Cabe ainda ao programa de formação a responsabilidade de habilitar os formandos com competências de pesquisa e apreciação crítica da evidência, de lhes inculcir hábitos sólidos de auto-avaliação e de desenvolvimento profissional contínuo e de os estimular ao envolvimento na promoção da saúde e na manutenção dos mais elevados graus de exigência na sua postura ética e profissional.

Não se trata, obviamente, de competências ou responsabilidades novas, mas antes de dimensões que sempre fizeram parte da prática da Medicina no seu melhor nível de excelência técnica, profissional e social. Consideramos, contudo, extremamente positiva a proposta de que as competências nestas áreas sejam explicitamente previstas nos programas de formação especializada e sejam objecto de intervenções específicas de aprendizagem, treino e avaliação.

Reconhece-se, nesta proposta, que as estratégias educacionais a adoptar para atingir aqueles objectivos podem ser muito variadas e carecem de adaptação a tradições e preferências nacionais. Por esse motivo o *European Board* decidiu não pres-

crever nem recomendar um modelo curricular específico para além das recomendações gerais que constam da sua, também recente, «Charter on the Training of Rheumatologists in Europe».³

Considerou-se, contudo, importante promover a adequação dos métodos de ensino e de avaliação à natureza diferenciada dos diferentes objectivos, seguindo as orientações modernas das ciências da educação na pedagogia de adultos. Para além de uma indicação sumária dos métodos considerados apropriados para cada conjunto de objectivos do *curriculum*, o *Board* elaborou um Guia Educacional⁴ em que procede a uma revisão mais detalhada dos princípios que devem orientar uma boa planificação curricular, incluindo a avaliação de necessidades e o treino educacional do treino de responsáveis de programa e de orientadores de formação. Produzido em colaboração com o Prof. Reginald Dennick, do Departamento de Educação Médica da Universidade de Nottingham, este Guia oferece ainda uma revisão sistematizada das diferentes modalidades de ensino e de avaliação adequados aos objectivos do plano de formação, apontando as suas vantagens e limitações na perspectiva da reumatologia, bem como uma valiosa bibliografia de suporte.

Acreditamos que a adopção desta estruturação curricular e destes parâmetros de qualidade educacional poderão dar uma contribuição decisiva para a melhoria da prática médica na nossa especialidade e para o prestígio e respeito social dos seus cultores no futuro.

Referências:

1. Da Silva JA, Faarvang KL and the European Board of Rheumatology. The European Rheumatology Training Framework. www.uems-rheumatology.net.
2. Frank, JR. (Ed). 2005. The CanMEDS 2005 physician competency framework. Better standards. Better physicians. Better care. Ottawa: The Royal College of Physicians and Surgeons of Canada. http://rcpsc.medical.org/canmeds/CanMEDS2005/CanMEDS2005_e.pdf
3. Da Silva JA, Faarvang KL, Bandilla K, Woolf AD; UEMS Section and Board of Rheumatology. UEMS charter on the training of rheumatologists in Europe. *Ann Rheum Dis* 2008 Apr;67:555-558
4. Dennick R, Da Silva JA, and the European Board of Rheumatology. The European Rheumatology Educational Guide. www.uems-rheumatology.net.

O SF-36 E O DESENVOLVIMENTO DE NOVAS MEDIDAS DE AVALIAÇÃO DE QUALIDADE DE VIDA

Alessandro Gonçalves Campolina,* Rozana Mesquita Ciconelli*

Resumo

A utilização de instrumentos de avaliação de qualidade de vida tem permitido a incorporação da opinião dos pacientes nas tomadas de decisão em saúde. O presente artigo apresenta as características e transformações sofridas por um dos questionários de qualidade de vida mais utilizados na atualidade: o *Short Form Health Survey 36-item* (SF-36). Também são discutidos os aspectos relacionados à construção, propriedades de medida e aplicações da ferramenta e de outras medidas, dela derivadas, como: o SF-12, o SF-8, o DYNHA e o SF-6D. Destaca-se a utilização do SF-36 para a avaliação da efetividade das intervenções em saúde; do SF-12 para o rastreio de agravamentos em saúde; do SF-8 para o monitoramento da saúde populacional; do Dynamic Health Assessment (DYNHA) para a avaliação individualizada na prática clínica e do SF-6D para a análise econômica em saúde. Informações sobre as versões validadas para o português e sobre a permissão de uso dos questionários são fornecidas.

Palavras-chave: Qualidade de vida; Avaliação; Efetividade; Economia da Saúde.

Abstract

The use of assessment tools for quality of life has allowed the incorporation of the views of patients in health decision-making. This article presents the characteristics and changes experienced by one of the most used questionnaires of quality of life, at present: the Short Form 36-item Health Survey (SF-36). We also discuss the issues related to the construction, properties and applications of this measuring tool and other derived measures as: the SF-12, the SF-8, the Dynamic Health Assessment

(DYNHA) and the SF-6D. We emphasize the use of the SF-36 for assessing the effectiveness of interventions in health, the SF-12 for the tracking of health disorders, the SF-8 for the monitoring of population health; the DYNHA for individualized evaluations in clinical practice and the SF-6D for economic analysis in health. Information on the versions validated for Portuguese language and the permission to use the questionnaires are provided.

Keywords: Quality of Life; Assessment; Effectiveness; Health Economics.

Introdução

Nas últimas décadas, a incorporação da opinião dos pacientes nas tomadas de decisão tem sido um dos pontos centrais para a melhoria de qualidade dos modelos de atenção à saúde.

A incapacidade dos parâmetros clínicos tradicionais de expressar o que as pessoas sentem e pensam, tem levado a um interesse crescente da comunidade científica pelo campo da Qualidade de Vida Relacionada com a Saúde.¹ Afim de captar a perspectiva do paciente durante as avaliações individuais e coletivas dos estados de saúde, um grande número de instrumentos de avaliação de qualidade de vida tem sido produzido e validado.²

Ao longo dos anos, determinados avanços alcançados nas avaliações da perspectiva do paciente sobre seu estado funcional e bem-estar têm-se tornado notórios: uma melhor compreensão dos domínios de saúde e da validade das escalas de medida dos mesmos; a demonstração da utilidade das avaliações de saúde padronizadas em ensaios clínicos; a utilização dos instrumentos na avaliação de políticas públicas, em estudos populacionais e na prática médica.³

O presente artigo pretende apresentar as características e as principais transformações sofridas por uma das ferramentas de avaliação de qualidade de vida mais utilizadas em todo o mundo: o

*Disciplina de Reumatologia, Departamento de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, Brasil

Short Form Health Survey 36-item (SF-36). Também são apresentadas novas ferramentas desenvolvidas a partir do SF-36 e suas principais aplicações.

O SF-36 e a avaliação da efetividade das intervenções em saúde

Construção

O SF-36 é um questionário genérico de avaliação de qualidade de vida que apresenta como principais vantagens: 1) versatilidade (podendo ser aplicado como índice discriminativo, avaliativo e preditivo), 2) ser curto (composto de 36 questões e oito escalas) com tempo de aplicação que varia de 5 a 10 minutos, 3) aplicável tanto por entrevista como auto-administração.³

Atualmente, o SF-36 é o instrumento genérico de qualidade de vida mais amplamente avaliado, com mais de 4.000 publicações e 2.060 citações desde 1988, sendo aplicado em mais de 200 doenças e traduzido em 40 países.⁴ O questionário está disponível em 2 apresentações desenvolvidas: uma padrão (para avaliações com período de resposta de 4 semanas) e uma para eventos agudos de saúde (para avaliações com período de resposta de 1 semana).³

A ferramenta, construída para satisfazer necessidades mínimas de comparação entre grupos, foi desenvolvida a partir de outros instrumentos desenvolvidos na década de 70 e 80. Os 8 domínios de saúde escolhidos representam aqueles mais frequentemente medidos em saúde e mais afectados pela doença e medidas terapêuticas. Estes domínios foram seleccionados a partir dos 40 domínios incluídos no *Medical Outcomes Study* (MOS), um estudo longitudinal que acompanhou beneficiários do *Medicare* nos Estados Unidos. Neste estudo foram seleccionados inicialmente 149 itens para compor um perfil de funcionalidade e bem-estar, chegando a um modelo final composto por 36 itens.⁵

A estrutura definitiva do SF-36 pode ser dividida em 3 componentes: itens (perguntas), escalas (correspondente a cada um dos domínios de qualidade de vida) e medidas sumárias (resumo da componente física e mental). Os 36 itens estão, portanto, dividido em 8 escalas ou domínios. Na versão traduzida e adaptada culturalmente para o Brasil, estes domínios são designados: Capacidade funcional, Aspectos Físicos, Dor, Estado Geral de Saúde, Vitalidade, Aspectos Sociais, Aspectos Emo-

cionais e Saúde Mental. Já na versão traduzida e adaptada culturalmente para Portugal, estes mesmos domínios são designados, respectivamente: Função Física, Desempenho Físico, Dor Total, Saúde Geral, Vitalidade, Função Social, Desempenho Emocional e Saúde Mental. Cada escala possui de 2 a 10 itens, sendo que o conjunto delas pode ser resumido através das duas medidas sumárias: Componente Física e Componente Mental. O resultado é expresso numa pontuação de 0-100 para cada uma das oito escalas ou através do escore normalizado (descrito adiante).⁵

As escalas que mais se correlacionam com a Componente Física, contribuindo de forma mais consistente para o cálculo deste escore são: Capacidade Funcional (ou Função Física), Aspectos Físicos (ou Desempenho Físico) e Dor (ou Dor Total). Já as que mais se correlacionam com a Componente Mental são: Saúde Mental, Aspectos Emocionais (ou Desempenho Emocional) e Aspectos Sociais (ou Função Social). Três das escalas, Vitalidade, Estado Geral de Saúde (ou Saúde Geral), Aspectos Sociais (ou Função Social) correlacionam-se igualmente bem com as duas componentes.³

Para a avaliação da efetividade de intervenções em saúde, o SF-36 continua a ser a ferramenta com propriedades psicométricas mais adequadas: validade e confiabilidade demonstrada em ensaios clínicos.⁵ O questionário já foi traduzido e adaptado para o Brasil, tendo suas propriedades psicométricas testadas.⁶

Entre as doenças e condições freqüentemente mais estudadas estão: artrite, lombalgia, câncer, doença cardiovascular, doença pulmonar obstrutiva crônica, depressão, diabetes, doença gastrointestinal, cefaléia, HIV/SIDA, doença renal, esclerose múltipla, doenças músculo-esqueléticas, osteoartrose, acidente vascular cerebral, trauma, doença vascular, procedimentos cirúrgicos e aspectos da saúde da mulher.³

Propriedades

O SF-36 apresenta propriedades discriminativas, avaliativas e preditivas, demonstradas em diversos estudos.

A propriedade discriminativa de um questionário refere-se à sua capacidade de diferenciar grupos com diferentes níveis de qualidade de vida. Neste sentido, o SF-36 tem sido utilizado, por exemplo, como uma escala de saúde mental para o rastreamento de transtornos psiquiátricos, conseguindo discriminar diferentes grupos.^{7,8}

A propriedade avaliativa de um questionário refere-se à sua capacidade de detectar mudanças ao longo do tempo, caso elas ocorram. Em ensaios clínicos, esta propriedade do SF-36 tem sido demonstrada, reforçando a utilidade da ferramenta para a avaliação de benefícios, por exemplo, com a artroplastia de joelho e quadril,^{9,10} e também com as cirurgias de troca valvar.¹¹

A propriedade preditiva de um questionário refere-se à sua capacidade de prever resultados futuros, a partir da análise de determinados perfis de comprometimento de qualidade de vida. Alguns estudos têm demonstrado a adequação do SF-36 para a predição da taxa de utilização de serviços de saúde,⁸ da evolução e curso clínico de depressão,^{3,12} da perda de emprego em 1 ano⁸ e da sobrevivência em 180 dias¹³ ou em 5 anos.⁷

SF-36 Versão 2

Em 1996 foi desenvolvida uma segunda versão do SF-36, com base em aprimoramentos obtidos a partir da aplicação do instrumento em diferentes contextos.

As alterações na versão 2 do SF-36 envolvem: (a) reformulação da disposição das perguntas e espaços de resposta no formato auto-administrável, tornando mais fácil a leitura e diminuindo os erros de preenchimento; (b) mudança do formato das instruções e das letras, que tornam a ferramenta mais familiar e mais clara; (c) melhoria da comparabilidade com versões traduzidas em outros países, em virtude da incorporação de modificações sugeridas; (d) modificação das escalas de aspectos físicos e aspectos emocionais, que passaram a apresentar cinco níveis de resposta (ao invés de dois) obtendo assim uma melhora em amplitude e precisão; (e) utilização de cinco níveis de resposta (ao invés de seis) nas escalas de saúde mental e vitalidade, levando a uma simplificação dos itens.⁵

Esta versão já se encontra disponível nos países em que a primeira versão foi validada e adaptada culturalmente, inclusive no Brasil.

A Utilização de Escores Normalizados

A transformação linear dos escores de 0-100, obtidos para os domínios do SF-36, em escores normalizados em relação à população americana (média de 50 e desvio padrão de 10), tem tornado muito mais fácil a interpretação dos resultados obtidos.⁸

Com o escore normalizado, cada escala passa a ser expressa através de uma mesma média de 50 e

um mesmo desvio padrão de 10. Fica claro, portanto, que toda vez que o escore da escala for menor que 50, o estado de saúde está abaixo da média e cada ponto é um décimo do desvio padrão. Por exemplo, uma Componente Física com um escore de 45 indica que o indivíduo avaliado está com a sua saúde física abaixo da média, mais especificamente, meio desvio padrão (5 pontos) abaixo da norma estabelecida com base na população americana.

Os resultados, utilizando o escore normalizado, também podem ser comparados com normas específicas para a idade, gênero, raça, nível educacional, religião e morbidades crônicas, produzidas em estudos com a população norte-americana.

Assim, clínicos e tomadores de decisão podem interpretar muito mais facilmente os resultados, uma vez que sabem que as variações obtidas, referem-se diretamente a uma população padrão, ou seja, os resultados apresentados passam a apresentar um significado em termos de normalidade e anormalidade.¹⁴

O SF-12 e o rastreamento de agravos à saúde

O *Short Form-12* (SF-12) é um questionário genérico de qualidade de vida que, apesar de ser mais curto que o SF-36, mantém-se como uma alternativa válida.

Esta ferramenta é uma boa opção para estudos de base populacional e também para o rastreamento de problemas de saúde. Rapidamente tem-se tornado o instrumento de escolha para os inquéritos populacionais.

O SF-12 apresenta uma estrutura baseada em 10 itens, extraídos dos domínios do SF-36, e 2 itens acrescentados para melhorar a estimativa das 2 componentes criadas a partir do SF-36. Os resultados são expressos, portanto, através das componentes (física e mental), de forma normalizada, através de desvios padrões da média da população americana (Z escore, com média = 50 e desvio padrão = 10).¹⁵

O grande objetivo do desenvolvimento do SF-12 foi proporcionar um questionário que pudesse ser reproduzido em uma única página, preenchido em 2 minutos e que fosse capaz de representar as medidas sumárias do SF-36 com uma acurácia de 90%. No momento, as evidências empíricas confirmam que este objetivo foi plenamente alcançado. Portanto, a correspondência entre as Compo-

nentes Física e Mental do SF-12 e do SF-36 faz com que os *guidelines* de interpretação do SF-36 possam ser aplicados ao SF-12.¹⁵

O instrumento já está traduzido e validado nos países em que já se realizou a tradução e adaptação cultural do SF-36, já que seus itens são extraídos desta ferramenta.

Em suma, o SF-12 é uma ferramenta de fácil administração, podendo ser completado em 2-3 minutos, em 2 modos de administração: auto-administrável ou por entrevista. Os resultados obtidos são comparáveis aos do SF-36, quando o instrumento é aplicado em grandes amostras.

O SF-8 e o monitoramento da saúde populacional

O *Short Form-8* (SF-8) representa um grande avanço das medidas de avaliação da qualidade de vida em saúde, caracterizando-se por combinação ideal de amplitude e brevidade. É uma ferramenta ainda mais curta que as anteriores, sendo uma boa opção para estudos com amostras muito grande (mais de 5.000 casos).

O desenvolvimento do SF-8 teve como objetivos: disponibilizar um questionário que pudesse ser administrado em 1 a 2 minutos e que reproduzisse de forma adequada as Componentes Física e Mental do SF-36, assim como os escores dos seus 8 domínios.¹⁶

Como o SF-8 foi desenvolvido na mesma métrica do SF-36, os resultados obtidos por estas duas ferramentas podem ser comparados e interpretados usando as mesmas *guidelines* de interpretação.

A ferramenta apresenta três diferentes versões: uma versão padrão com tempo de resposta de um mês, uma versão com tempo de resposta de uma semana e uma versão com tempo de resposta de 24 horas. Apresenta uma estrutura baseada em 8 itens, a maioria deles não são idênticos aos do SF-36, mas com muitas semelhanças, divididos em 8 escalas: Capacidade Funcional (ou Função Física), Aspectos Físicos (ou Desempenho Físico), Dor (ou Dor Total), Estado Geral de Saúde (ou Saúde Geral), Vitalidade, Aspectos Sociais (ou Função Social), Aspectos Emocionais (ou Desempenho Emocional) e Saúde Mental e 2 Componentes (Física e Mental), através dos quais os resultados são expressos.

O instrumento já está traduzido e validado nos países em que já se realizou a tradução e adaptação cultural do SF-36; sendo que esta ferramenta,

diferente das anteriores, foi validada e adaptada simultaneamente em diferentes contextos culturais, ao longo de seu desenvolvimento.

A facilidade e rapidez de administração são os aspectos mais atraentes desta ferramenta, que pode ser completada por entrevista ou ser auto-administrada. Os resultados obtidos são comparáveis aos do SF-36, quando a ferramenta é aplicada em grandes amostras, com diferenças em termos de precisão, já que o SF-8 é capaz de distinguir um menor número de níveis de saúde.¹⁶

O DYNHA e as avaliações individualizadas na prática clínica

A tecnologia de avaliação computadorizada tem permitido a utilização dos instrumentos de qualidade de vida para fins de monitoramento individual de saúde.

Baseada nas teorias psicométricas de resposta ao item, esta tecnologia tem possibilitado avaliações dinâmicas de qualidade de vida, em que são utilizadas diversas escalas calibradas e obtidas de diferentes questionários, que são selecionadas progressivamente conforme o nível de resposta obtido para os itens, no procedimento de aplicação. As avaliações dinâmicas utilizam dispositivos computadorizados e apresentam escores normalizados.¹⁷

O primeiro dispositivo deste tipo é conhecido como *Dynamic Health Assessment* (DYNHA) e já está sendo testado em diversos estudos, revelando precisão para aplicação a nível individual, em que os escores de um mesmo indivíduo poderão ser comparados entre si ao longo do tempo. Tem-se, portanto, uma ferramenta adequada para a aplicação na prática clínica, onde o monitoramento de saúde não se aplicará a grupos, mas a cada paciente individualmente.¹⁸

Cabe destacar que o desenvolvimento do SF-8 foi fundamental para a criação dos dispositivos DYNHA, pois esta ferramenta constitui o primeiro conjunto de itens aplicados na avaliação, a partir dos quais o *software* seleciona automaticamente outras escalas mais específicas, conforme o nível de resposta apresentado inicialmente.

O SF-6D e as análises econômicas em saúde

Recentemente, as medidas de capacidade funcio-

nal e de bem-estar têm se tornado importantes para a análise de políticas em saúde e para avaliação de custo e benefício dos programas e intervenções. As informações obtidas a partir dos instrumentos de avaliação de qualidade de vida tornam-se, assim, necessárias para a tomada de decisão quanto à melhor utilização dos recursos em saúde.

Neste sentido, as medidas de qualidade de vida mais utilizadas em análises econômicas são conhecidas como medidas de preferências por estados de saúde ou medidas de utilidades. Até o presente, cinco publicações, com sete algoritmos diferentes, têm detalhado métodos para derivar preferências do SF-36.¹⁹ Destes algoritmos, dois foram desenvolvidos por Brazier e colaboradores em 1998, re-estruturando o SF-36 num novo índice de saúde que passou a ser conhecido como *Short Form-6 Dimensions* (SF-6D).²⁰

O SF-6D é um questionário estruturado em 6 domínios: Capacidade Funcional (ou Função Física), Limitação Global, Aspectos Sociais (ou Função Social), Dor (ou Dor Total), Saúde Mental e Vitalidade com 11 itens extraídos do SF-36, capaz de descrever 18.000 estados de saúde diferentes, permitindo a obtenção de medidas de preferência em saúde. Este questionário foi desenvolvido a partir de duas técnicas para a mensuração direta de preferências: a escala visual analógica (EVA) e o «standard gamble» (SG). A partir da aplicação do SF-36, pode-se obter o escore único do SF-6D, que varia de +0,291 a 1 e representa a força da preferência de um indivíduo por um determinado estado de saúde.²¹

Outros autores também desenvolveram algoritmos de derivação de preferências a partir do SF-36. Fryback e colaboradores predizem escores do questionário *Quality of Well-Being* (QWB) a partir dos domínios do SF-36, através de técnicas de regressão linear múltipla. A equação final obtida contou com a participação de seis variáveis, obtidas de 5 domínios do SF-36, capazes de prever 57% da variação do QWB.²²

Shmueli utilizou um modelo de regressão linear múltipla, tratando os oito domínios do SF-36 como variáveis independentes e as preferências (medidas pela técnica de EVA) como variável resposta. A equação obtida foi capaz de prever 48,7% da variação das preferências medidas por EVA.²³

Lundberg e colaboradores utilizaram a análise de regressão linear e estimaram preferências medidas pelas técnicas de EVA e *Time Trade-Off* (TTO), a partir de questões do SF-12. A idade, o sexo e 11

itens do SF-12 foram incluídos no modelo de regressão múltipla para a estimativa dos valores de VAS e TTO. As equações obtidas foram capazes de prever 48,2% da variação das preferências medidas por EVA e 23,2% das medidas por TTO.²⁴

Nichol e colaboradores utilizaram um modelo de regressão linear, empregando escores do questionário *Health Utilities Index Mark 2* (HUI2) para estruturarem uma equação preditiva, contendo os oito domínios do SF-36. A equação final, contendo nove variáveis (8 domínios do SF-36 e idade), foi capaz de prever 50,5% da variação do HUI2.²⁵

Com a obtenção das medidas de preferência pode-se, por fim, construir o indicador *Quality-Adjusted Life Years* (QALYs), que pode ser usado como parâmetro de efetividade para as análises econômicas e para as análises de decisão em saúde. Este indicador permite a incorporação simultânea de qualidade de vida e sobrevida em uma mesma medida.

Estudos na população brasileira

No Brasil, o SF-36 foi traduzido e adaptado culturalmente em uma população portadora de artrite reumatóide, sendo suas propriedades de reprodutibilidade e validade demonstradas.⁶

O SF-12 também teve suas propriedades de medida avaliadas em nosso meio, tanto em sua versão auto-administrável, quanto na versão para aplicação por entrevista.²⁶

Também o SF-6D e outros algoritmos de derivação de preferências do SF-36 tiveram suas propriedades de medida testadas, já estando validada para a utilização em nosso meio.²⁷

No momento, encontra-se em curso a validação do SF-8 para a aplicação na população brasileira, a partir de um estudo com indivíduos portadores de osteoporose.

Uma revisão das dissertações de mestrado e doutorado, defendidas na Universidade Federal de São Paulo (Unifesp), no período de 1990 a 2004, revelou que, só no âmbito das doenças reumáticas, o SF-36 foi empregado em: 1 trabalho em artrite reumatóide, 1 com lombalgia crônica, 1 com osteoartrite de joelho, 2 com fibromialgia, 2 com lúpus eritematoso sistêmico, 1 com osteoartrite de quadril. As teses encontram-se disponíveis na biblioteca acadêmica da Unifesp.²⁸

Sabemos, entretanto, que o SF-36 tem sido aplicado em diversas condições de saúde em nosso

meio e uma revisão sobre estas aplicações está sendo preparada, a partir do banco de dados de teses e artigos científicos, que vem sendo produzido ao longo dos anos pelo grupo de pesquisa em qualidade de vida do Centro Paulista de Economia da Saúde, da Unifesp.

As versões em língua portuguesa dos questionários podem ser obtidas através do *web site* <http://www.sf-36.org> ou diretamente com os autores das traduções e adaptações culturais para o Brasil,^{6,26,27} através do *web site* <http://cpes.org.br>.

O Questionário SF-36 também se encontra validado em Portugal, sendo que suas propriedades psicométricas já foram avaliadas.²⁹⁻³¹

A utilização dos questionários para fins científicos é isenta de taxas. Já as utilizações para fins comerciais devem respeitar os direitos autorais, podendo as permissões de uso ser obtidas pelo *web site* <http://www.sf-36.org>.

Conclusão

O advento de uma grande diversidade de tecnologias de intervenção em saúde, somado ao envelhecimento populacional ocorrido no último século, com o aumento da prevalência das doenças crônicas, tem revelado a necessidade de novos modelos para avaliar o impacto destas doenças na qualidade de vida dos indivíduos.

Neste sentido, os instrumentos de avaliação de qualidade de vida têm contribuído enormemente não só pela multi-dimensionalidade das abordagens, mas principalmente por incorporar a opinião dos pacientes nos processos de decisão compartilhada em saúde.

O campo da Qualidade de Vida Relacionada com a Saúde conta, no presente, com desenvolvimentos marcantes, como a do instrumento genérico SF-36 e seus derivados, cuja versatilidade e praticidade pode contribuir com enormes avanços para a vigilância epidemiológica de doenças crônicas, para as tomadas de decisão e para a avaliação da qualidade da assistência à saúde.

Correspondência para:

Alessandro Gonçalves Campolina, MD
R. Pedro de Toledo, 650 – Vila Clementino
São Paulo – SP Brasil
Disciplina de Reumatologia – Unifesp
Phone: 55 11 34598483
Fax: 55 11 5579 6665
E-mail: alecampolina@yahoo.com.br

Referências:

1. Fitzpatrick R, Fletcher A, Gore S, Jones D, Spiegelhalter D, Cox D. Quality of Life Measures in Health Care. I: Applications and Issues in Assessment. *BMJ* 1992;305:1074-1077.
2. Guillemin F, Bombardier C, Beaton D. Cross-Cultural Adaptation of Health-Related Quality of Life Measures: Literature Review and Proposed Guidelines. *J Clin Epidemiol* 1993;46:1417-1432.
3. Ware JE, Snow KK, Kosinski M, Gandek B. SF-36 Health Survey Manual and Interpretation Guide. Boston (MA): The Health Institute, New England Medical Center; 1993.
4. Garrat AM, Schmidt L, Mackintosh A, Fitzpatrick R. Quality of life measurement: bibliographic study of patient assessed health outcome measures. *British Medical Journal* 2002;324:1417-1421.
5. Ware JE. SF-36 Health Survey Update. *Spine* 2000;25:3130-3139.
6. Ciconelli RM, Ferraz MB, Santos W, Meinão I, Quaresma MR. Tradução para a língua portuguesa e validação do questionário genérico de avaliação de qualidade de vida SF-36 (Brasil SF-36). *Revista Brasileira de Reumatologia* 1999;39:143-150.
7. Berwick DM, Murphy JM, Goldman PA et al. Performance of a five-item mental health screening test. *Medical Care* 1991;29:169-176.
8. Ware JE, Kosinski M, Kelle SK. SF-36 Physical and Mental Health Summary Scales: a user's manual. Boston (MA): The Health Institute, New England Medical Center; 1994.
9. Katz JN, Larson MG, Philips CB et al. Comparative measurement sensitivity of shorted longer health status instruments. *Medical Care* 1992;30:917-925.
10. Lansky D, Butler JBV, Waller FT. Using health status measures in the hospital setting: from acute care to "outcomes management". *Medical Care* 1992;30:57-73.
11. Phillips RC, Lansky DJ. Outcomes management in heart valve replacement surgery: early experience. *J Heart Valve Dis* 1992;1:42-50.
12. Beusterien KM, Steinwald B, Ware JE. Usefulness of the SF-36 Health Survey in measuring health outcomes in the depressed elderly. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 1996; 9:13-21.
13. Stewart AL, Hays RD, Ware JE. The MOS Short-Form General Health Survey: reliability and validity in a patient population. *Medical Care* 1988;26:724-735.
14. Okamoto LJ, Noonan M, DeBoisblanc BP et al. Fluticasone prorionate improves quality of life in patients with asthma requiring oral corticosteroids. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1996;76:455-461.
15. Ware JE, Kosinski M, Keller SD. The SF-12: how to score the SF-12 physical and mental health summary scales. Boston (MA): The Health Institute, New England Medical Center; 1995.
16. Ware JE, Kosinski M, Dewey JE, Gandk B. How to score and interpret single-item health status measures: a

- manual for users of the SF-8 Health Survey. Lincoln (RI): Quality Metric Inc; 2001.
17. Bjorner JB, Ware JE. Using modern psychometric methods to measure health outcomes. *Medical Outcomes Trust Monitor* 1998;3:11-16.
 18. Ware JE, Kosinski M, Bjorner JB et al. Applications of computerized adaptive testing (CAT) to the assessment of headache impact. *Quality of Life Research* 2003;12:935-952.
 19. Lee TA, Hollingworth W, Sullivan SD. Comparison of directly elicited preference to preferences derived from the SF-36 in adults with asthma. *Med Decis Making* 2003;23:323-334.
 20. Brazier J, Usherwood T, Harper R, Thomas K. Deriving a preference-based single index from the UK SF-36 Health Survey. *J Clin Epidemiol* 1998;51:1115-1128.
 21. Brazier J, Roberts J, Deverill M. The estimation of a preference-based measure of health from the SF-36. *Journal of Health Economics* 2002;21:271-292.
 22. Fryback DG, Lawrence WF, Martin PA, Klein R, Klein BE. Predicting Quality of Well-Being scores from the SF-36: results from the Beaver Dam Health Outcomes Study. *Med Decis Making* 1997;17:1-9.
 23. Shmueli A. Subjective health status and health values in the general population. *Med Decis Making* 2001;21:105-112.
 24. Lundberg L, Johannesson M, Isacson DG, Borgquist L. The relationship between health-state utilities and the SF-12 in a general population. *Med Decis Making* 1999;19: 128-140.
 25. Nichol MB, Sengupta N, Globe DR. Evaluating quality-adjusted life years: estimation of the health utility index (HUI2) from the SF-36. *Med Decis Making* 2001;21:105-112.
 26. d'Amorim BD. Avaliação das formas auto-administradas dos questionários MHAQ e SF-12 em pacientes com doenças reumatológicas. Tese (Mestrado). São Paulo, 2001.
 27. Campolina AG. Avaliação de preferências em artrite reumatóide: uma comparação de métodos derivados do SF-36 com medidas diretas de preferência. Tese (mestrado). São Paulo, 2007.
 28. Campolina AG, Torres TM, Martins EP, Ferraz MB, Cicconelli RM. Qualidade de vida em diferentes doenças reumáticas. *Revista Brasileira de Reumatologia* 2004;44:183.
 29. Ferreira PL. Development of the Portuguese version of MOS SF-36. Part I - Cultural and Linguistic Adaptation. *Acta Med Port* 2000;13:55-66.
 30. Ferreira PL. Development of the Portuguese version of MOS SF-36. Part II - Validation Tests. *Acta Med Port* 2000;13:119-127.
 31. Severo M, Santos AC, Lopes C, Barros H. Reliability and validity in measuring physical and mental health construct of the Portuguese version of MOS SF-36. *Acta Med Port* 2006;19:281-7. Epub 2007 Jan 23.

XV Congresso de la Liga Panamericana de Asociaciones de Reumatologia

PANLAR, Guatemala
13-16 de Agosto de 2008

B CELLS: FROM THE BENCH TO THE CLINICAL PRACTICE

Rita Moura,* Ana Água-Doce,** Pamela Weinmann,* Luís Graça,** João Eurico Fonseca***

Abstract

B cells develop in bone marrow and undergo antigen-induced activation and terminal differentiation in germinal centres of secondary lymphoid organs. Each B cell is a clone, which means that an individual B cell has a unique genetic code and produces only one type of antibody when stimulated by antigen, being able to multiply itself and originate several B cells with the same antigen specificity (clonal selection theory). However, their important role in adaptive immune responses is supported by the remarkable capacity of recognizing an unlimited array of antigens, due to mechanisms of antibody diversity, such as V(D)J recombination, class switching and somatic hypermutation. B cells can also function as antigen presenting cells that can activate T cells, improving the effectiveness of the immune response. Immune B cell tolerance surveillance through clonal deletion, anergy and receptor editing is also necessary to avoid pathological conditions, like autoimmune diseases. B cells can contribute to autoimmunity by autoantibody production, cytokine synthesis, antigen presentation, T cell activation and ectopic lymphogenesis.

Key-Words: B Cells; Bone Marrow; Antibody; Tolerance; Autoimmunity.

Resumo

As células B desenvolvem-se na medula óssea e diferenciam-se terminalmente nos centros germinais dos órgãos linfóides secundários. Cada célula B é um clone, o que significa que uma célula B individual tem um código genético único e produz

apenas um tipo de anticorpo quando estimulada por um antígeno, tendo a capacidade de se multiplicar e originar várias células B todas com a mesma especificidade antigénica (teoria da selecção clonal). Contudo, o seu importante papel nas respostas imunitárias adaptativas deve-se à capacidade surpreendente de reconhecer um conjunto ilimitado de antígenos, devido a mecanismos de diversidade de anticorpos, como a recombinação V(D)J, mudança de classe e hipermutação somática. As células B são também células apresentadoras de antígeno que activam as células T, aumentando a eficácia da resposta imune. A manutenção da tolerância imunitária através de deleção clonal, anergia e edição do receptor é necessária para evitar condições patológicas, como doenças autoimunes. As células B podem contribuir para a autoimunidade através da produção de autoanticorpos, síntese de citocinas, apresentação de antígenos, activação de células T e desenvolvimento de folículos.

Palavras-Chave: Células B; Medula óssea; Anticorpo; Tolerância; Autoimunidade.

Introduction

The human body contains approximately 2×10^{12} lymphocytes, of which 5-15% are B cells. B lymphocytes are small white blood cells (6-10 μm) with a dense nucleus and little cytoplasm that originate and mature in the bone marrow expressing a membrane-bound immunoglobulin. Discovered in the early 1960's, these cells are important mediators of our immune system, more precisely the humoral response, by the production and secretion of proteins collectively called immunoglobulins (Ig) or antibodies. The main function of an antibody is to recognize a foreign antigen exhibited by an invading pathogen or at the surface of an altered cell, like a tumour cell, and facilitate the clearance and elimination of that antigen. Antibodies can eliminate pathogens by several mechanisms including

*Unidade de Investigação em Reumatologia, Instituto de Medicina Molecular, Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa

**Unidade de Imunologia Celular, Instituto de Medicina Molecular, Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa

***Serviço de Reumatologia e de Doenças Ósseas Metabólicas do Hospital de Santa Maria

opsonization, complement activation and direct lysis of bacteria and neutralization of viruses and toxins to prevent their entry into host cells. B cells can also function as antigen presenting cells (APCs) and interleukin (IL) producing cells that can further activate T cells and contribute to the development of an effective immune response.

Origin and B cell development

Bone marrow

B cells develop in the bone marrow in mammals, but in birds, where they first were studied, these cells develop and mature in a special organ called «*Bursa of Fabricius*» (hence, the designation «B»), situated in the cloaca of the animals.^{1,2} In humans, B cells are primarily produced in the fetal liver before birth and in the bone marrow afterwards. B cell development can be detected in human bone marrow from 20 weeks of gestation and continues throughout life.³ B cells arise from a lymphoid stem cell in the bone marrow and proceed through several maturation stages, during which they express different cell surface markers (Figure 1).⁴⁻⁷ The earliest distinctive B-lineage cell is the progenitor B cell (pro-B cell).⁸⁻¹¹ Pro-B cells proliferate in the bone marrow, filling the extravascular spaces between large sinusoids in the shaft of a bone, and further differentiate into precursor B cells (pre-B cells).^{12,13} Human pre-B cells can be generally subdivided into large proliferating cells (designated pre-BI) and small postmitotic cells (designated pre-BII) on the basis of cell-cycle analysis.¹⁴⁻¹⁶ The bone marrow phase of B cell development culminates in the production of an immature B cell¹⁷ that is not fully functional. All B cell differentiation stages in the bone marrow do not require antigen, this corresponding to the antigen-independent phase of B cell development.

Periphery

Organization and structure of secondary lymphoid organs

LYMPH NODES

Lymph nodes (LNs) are specialized organs for trapping antigen from local tissues supplied by lymphatic vessels. LNs can be divided in three regions: the cortex, paracortex and medulla.^{18,19} During lymph node development, hematopoietic lymphoid progenitor cells interact with high endothelial venules (HEV) and mesenchymal cells. This interaction is mediated by adhesion molecules and leads to lo-

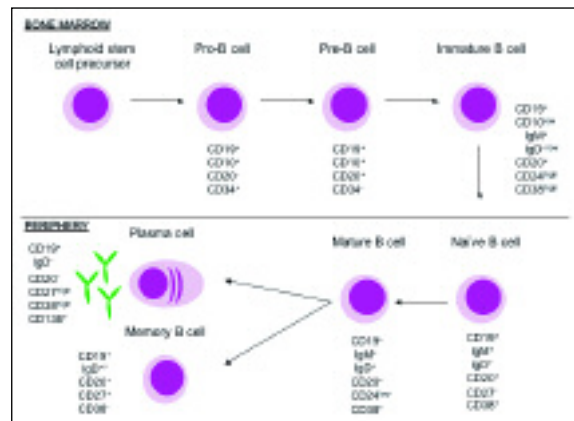


Figure 1. B cell developmental stages in bone marrow (BM) and periphery. During B cell development, B lymphocytes express different cell surface markers, specific for each stage. The BM phase culminates with the expression of IgM and IgD. B cells then leave BM and circulate through the blood and lymph towards secondary lymphoid organs (lymph nodes, spleen and Peyer's Patches), where they reside until they are activated by an antigen. B cells can then differentiate into antibody secreting plasma cells, or memory B cells.

cal release of chemoattractants, like CXCL13, that attract B cells into the nascent organ through HEV.²⁰⁻²² These naïve B cells are then organized into follicles, which are spheroid aggregates located in the cortex of lymph nodes, surrounded by an outer T cell zone.²³ In the presence of T cell help, B cells can proliferate and differentiate into GC B cells within follicles or short-lived plasma cells, generated outside follicles.

SPLEEN

The spleen is a large organ specialized in the destruction of old erythrocytes and trapping antigens in the circulating blood.²⁴ The spleen is divided into two zones: the red pulp, mainly populated by macrophages and red blood cells, where old and defective erythrocytes are removed from the circulation; and the white pulp, that comprises B cell follicles, T cell zones (also designated periarteriolar lymphoid sheaths, or PALS) and a marginal zone, in the interface of the white and red pulps, that contains macrophages and B cells.^{19,25} In humans, the spleen has an additional region, the perifollicular zone, situated outside the marginal zone, that contains capillaries and blood-filled spaces that belong to the open splenic circulation.²⁶ Lymphocytes are believed to enter the white pulp through

the perifollicular zone. Circulating naïve B cells migrate to the spleen, where they reside until they are activated by antigens and start a GC reaction.

PEYER'S PATCHES

Peyer's Patches (PPs) are organized lymphoid follicles similar to lymph nodes located in the mucosa and submucosa of the small intestine, especially the ileum. Since the lumen of the gastrointestinal tract constitutes a way of entry of potentially pathogenic microorganisms, PPs are fundamental for the establishment of the immune surveillance in the gut. Human PPs can be even centimetres big and have a large number of follicles.²⁷ PPs contain specialized cells called M («microfold») cells, located in the intestinal epithelium over lymphoid follicles.²⁸ The M cell basolateral membrane is deeply invaginated to form a large intraepithelial «pocket» containing B and T lymphocytes²⁹ and occasional dendritic cells. M cells can internalize antigens from the lumen and transfer them efficiently to the underlying APCs that can further activate T cells. Activated T cells produce cytokines, such as TGF- β 1, that induce B cells to differentiate into immunoglobulin A (IgA)-secreting plasma cells.^{30,31} IgA is the major antibody present in the intestinal secretions^{32,33} and it constitutes the first line of defence against pathogenic microorganisms in mucosal surfaces by interfering with adhesion and invasion properties of microbes. Signals through chemokine receptors expressed by B cells, namely CXCR4, CXCR5 and CXCR7, contribute to B cell homing towards PPs.²⁰ Moreover, CXCL13, expressed by HEVs in PPs, is required for B cell entry into these structures.^{21,22}

The Germinal Centre (GC) reaction

When full maturation is achieved, signalled by the co-expression of IgM and IgD on the membrane, B cells leave the bone marrow. These naïve B cells, which have never encountered an antigen, circulate in the blood and lymphatic systems where they are carried to secondary lymphoid organs, where they reside. In the follicles of the secondary lymphoid organ, after encountering an antigen, mature B cells transform into large B-blasts that may follow two different pathways. Some proliferate and differentiate into short-living, IgM producing plasma cells, responsible for the early production of antibodies and, thus, first-line defence against the antigen. A minority of the B-blasts differentiate to form the follicle centre or germinal centre

(GC).^{34,35} The non-antigen-triggered naïve B cells form the follicle mantle or mantle zone. The follicle, containing a GC and a mantle zone, is known as a secondary follicle. The inner part of the mantle zone of the B cell follicle is designated the lymphocytic corona and is mainly composed of mature, naïve B cells.³⁶ The outer part of the mantle zone, called the marginal zone, is populated by different types of cells: macrophages, some T cells, granulocytes, plasma cells and marginal zone B cells.³⁷ GC are the specialized sites for memory B cell generation, plasma cells differentiation and where affinity maturation of serum antibodies takes place.^{38,39} GC first appear at day 4-5 post-immunization, achieve their maximum cell number by day 10-11 and decline after about three weeks.³⁴ B cells that form the GC are divided into centroblasts (large noncleaved cells) and centrocytes (small or large cleaved cells). Centroblasts are large, proliferating cells that lack surface immunoglobulin expression and accumulate at one pole of the GC, forming the dark zone (Figure 2). These cells can differentiate themselves into non-proliferating centrocytes that re-express surface immunoglobulin and accumulate at the opposite pole of the GC, known as the light zone.⁴⁰ Activation of GC B cells is made by follicular dendritic cells (FDC), which have a pivotal role in promoting B cell proliferation and differentiation in GC.^{41,42} FDC not only are very efficient in trapping and retaining antigen-antibody complexes for long periods of time and present them to B cells, but also are involved

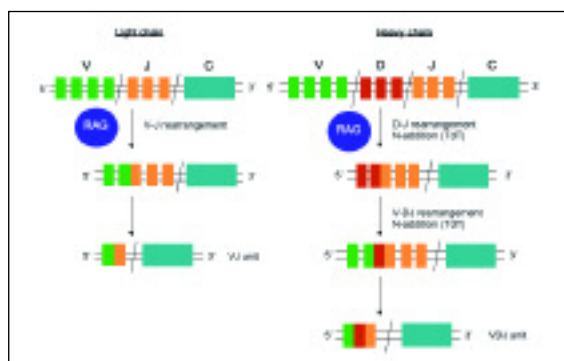


Figure 2. V(D)J recombination process in light and heavy chains. During VDJ recombination, the gene segment rearrangements that occur in both light and heavy chains are possible due to specific enzymes, such as RAG proteins, that initiate the process. Further diversity is increased by nucleotide additions by Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT).

in B cell recruitment to secondary lymphoid organs with consequent follicle formation and organization through the secretion of CXCL13, a B-lymphocyte chemoattractant.^{35,43,44} Positive selection of B cells in GC occurs through high-affinity binding to antigens trapped by FDC. These high-affinity B cells receive survival signals from both FDC⁴² and T cells⁴⁵ located in the light zone, whereas low-affinity B cells non-triggered by antigens die by apoptosis. More than 90% of the GC B cells die as a result of apoptosis⁴⁶ and are then phagocytosed and digested by the so-called tingible body macrophages.⁴⁷⁻⁴⁹ Only the GC B cells that are stimulated and able to synthesize high-affinity antibodies survive and may differentiate into long-lived plasma cells or memory B cells. Long-lived plasma cells are thought to reside mainly in the bone marrow and organs that are directly exposed to foreign antigens (gastrointestinal tract, lungs...),⁵⁰ whereas memory cells reside in the follicle mantle or recirculate freely to survey for secondary antigen exposure. Memory B cells are long-lived and are responsible for the ability of the immune system to learn. During a second encounter with an antigen, memory B cells are able to recognize the antigen to which the organism was previously exposed and induce a more rapid and effective immune response.⁵¹ Since B cell activation and differentiation in the periphery require antigen, this stage comprises the antigen-dependent phase of B cell development. In the absence of antigen-induced activation, naïve B cells in the periphery have a short life span, dying within a few weeks by apoptosis.

B-1 and B-2 cell lineages

B cells comprise two main subsets, B-1 and B-2, a concept based on the discovery that a small proportion of B cells in mice expressed the T-cell marker CD5.⁵²⁻⁵⁵ B-1 cells are the CD5⁺ subpopulation, whereas B-2 cells represent the conventional B cell subpopulation. B-1 cells arise before B-2 cells, are long-lived, emerge early in development, during fetal life, are self-renewing and predominate in the follicular mantle zone, being minor populations in secondary tissues such as lymph nodes and spleen and are virtually absent in human adult bone marrow.⁵⁶ B-1 cells can be subdivided in B-1a cells, which express CD5, and B-1b cells, that are CD5 negative. B-1a cells are largely responsible for the production of circulating immunoglobulin M (IgM) antibodies known as «natural antibodies».^{57,58} These low affinity antibodies are the first line of

defence against bacterial and viral infections.⁵⁹ The antibodies produced by B-1b cells are induced after antigenic exposure and are required for long-lasting protective immunity to pathogens.⁶⁰ B-2 cells constitute the major group of B cells in humans and mice. They are CD5, surface and mRNA, negative cells. B-2 cells derive from resident bone marrow progenitors throughout life and undergo maturation primarily in the spleen. Although the developmental origin of B-1 cells has remained an unresolved issue, it was demonstrated that bone marrow CD45R^{lo-neg}CD19⁺ cells include a B-1 cell-specified progenitor,⁶¹ which supports the idea of the existence of distinct developmental pathways for B-1 cells. CD5 expression was identified in malignant human B cells⁶² and later shown to mark a minority of B lymphocytes in the normal blood.⁵² In fact, in humans, 5-30% of the circulating B cells are B-1a in adults; 4-6% are B-1b and 65-89% are B-2 cells.⁶³ Nevertheless, a separate lineage for CD5⁺ B cells still awaits a demonstration in humans. Some lines of evidence suggest that in the human case CD5 might be an activation marker rather than a cell lineage feature, since there are a variety of stimuli capable of inducing the expression of CD5 on conventional B cells.^{64,65} It remains to be determined, nonetheless, the criteria that will define whether human B cell subsets are homologous to the mouse B-1a, B-1b and B-2 lineages.

Antibody production

Structure of an antibody

Antibodies, also called immunoglobulins, are the antigen-binding proteins present on the B cell membrane and secreted by plasma cells. An antibody molecule has a common structure of four peptide chains that consist of two identical light (L) chains and two identical heavy (H) chains, which are linked by disulfide bonds. The first 100-110 amino acids of the amino-terminal region of a light or heavy chain vary greatly among antibodies. These segments of highly variable sequence are called *variable* (V) regions: V_L in light chains and V_H in heavy chains. The carboxyl-terminal region of both light and heavy chains consists of relatively constant sequences, designated as *constant* (C) regions: C_L on the light chain and C_H on the heavy chain. Most of the differences among antibodies fall within areas of the V regions called Complementary-Determining Regions (CDRs) and these CDRs, on

both light and heavy chains, constitute the antigen binding site of the antibody molecule. There are two light chain types, kappa (κ) and lambda (λ). In humans, 60% of the light chains are kappa and 40% are lambda.⁶⁶ A single antibody molecule contains only one light chain type, either κ or λ , never both. The heavy chain of a given antibody molecule determines the class of that antibody, or isotype. There are five different heavy-chain constant region sequences: μ , δ , γ , ϵ and α ; hence, in humans, the five major classes of antibodies: IgM (μ), IgG (γ), IgA (α), IgD (δ) and IgE (ϵ), each with different structural and functional properties (Table I).

Mechanisms of antibody diversity

One of the most remarkable features of our immune system is its ability to respond to an apparently limitless array of foreign antigens. The major mechanisms that are responsible for the enormous diversity of antibodies ($>10^{10}$ possibilities) produced by our immune system are random rearrangements in genes that codify the variable region (antigen binding domain) of immunoglobulins. Antibody diversity is achieved by V(D)J recombination, somatic hypermutation and class switching.

V(D)J recombination

Immunoglobulin light and heavy chains are enco-

ded by three separate multigene families, situated on different chromosomes. In germ-line DNA, each of these multigene families contains several coding sequences, called gene segments, separated by noncoding regions. During B cell maturation, these gene segments are rearranged and brought together to form functional immunoglobulin genes.^{67,68} The κ and λ light-chain families contain V (for *variable*), J (for *joining*) and C (for *constant*) gene segments and the rearranged VJ segments encode the variable region of the light chains. The heavy-chain family contains V, D (for *diversity*), J and C gene segments and the rearranged VDJ gene segments encode the variable region of the heavy chain. In each gene family, C gene segments encode the constant region. V(D)J recombination is an ordered site-specific DNA rearrangement process⁶⁹ that occurs in developing lymphocytes in the bone marrow initiated by two lymphocyte-restricted specific proteins RAG-1 and RAG-2,⁷⁰⁻⁷³ which together form an endonuclease responsible for DNA double-stranded breaks at recombination signal sequences (RSS).^{74,75} RAG proteins are expressed at high levels during ontogeny, but their expression diminishes in immature B cells and is usually absent in recirculating mature naïve B cells.^{76,77} In certain pathologies, however, like autoimmune diseases, RAG expression may be

Table 1. Classes of immunoglobulins and their biological functions.

Class of Antibody	Serum levels	Structure	Biological functions
IgM	5%	Monomer Pentamer	Membrane-bound immunoglobulin on the surface of immature and mature B cells First antibody produced in a primary response to an antigen First antibody produced by the fetus Efficient in binding antigens with many repeating epitopes, such as viruses Classical complement activation
IgD	0.3%	Monomer	Membrane-bound immunoglobulin on the surface of mature B cells No biological effector function known
IgA	7-15%	Monomer Dimer	Predominant antibody class in secretions (saliva, tears, breast milk) and mucosa First line of defence against infection by microorganisms
IgG	85%	Monomer	Most abundant class with four isotypes - IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 Crosses the placenta Opsonization
IgE	0.02%	Monomer	Defence against parasite infections Associated with hypersensitivity reactions (allergies) Found mainly in tissues

up-regulated.^{78,79} The importance of RAG for V(D)J recombination is supported with the finding that mutations in RAG genes abolish recombination activity and block differentiation of both B and T cells, leading to different forms of immune deficiency.⁸⁰⁻⁸² RSS, recognized by RAG in the initial event of the recombination process, are comprised of a highly conserved heptamer and nonamer sequences, separated by a relatively nonconserved spacer region of either 12 or 23 base pairs (bp).^{75,83} A gene segment with 12-bp spacer can only join with a segment flanked by 23-bp spacer (12-23 bp rule).^{74,84} During variable-region gene rearrangements the heavy-chain genes rearrange first, followed by light-chain rearrangements. The generation of a functional immunoglobulin heavy-chain gene requires two separate rearrangement events within the variable region. The first step of recombination is a D to J association. The resulting D-J segment then moves next to and joins a V segment to generate a VDJ unit that encodes the entire variable region. Light-chain DNA rearrangements occur by the joining of a functional V segment to a functional J-C segment (Figure 3). The combinatorial diversity generated by V(D)J recombination is further augmented by another enzyme, terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT),⁸⁵⁻⁸⁷ that randomly adds up to 20 nucleotides, called N additions, to D-J and V-DJ junctions.

Somatic Hypermutation

Somatic Hypermutation (SHM) is a major mechanism for producing antibody diversity and increa-

sing antibody affinity, which occurs in GC of secondary lymphoid organs.⁸⁸⁻⁹⁰ SHM is a process that introduces point mutations, mainly nucleotide substitutions, but also occasional deletions and duplications, at a very high rate into the DNA of heavy and light-chain variable-region genes, which may alter the specificity of the encoded antibodies.⁹¹⁻⁹³ SHM introduces mutations at a rate of $\sim 10^{-3}$ mutations per base pair per cell division, which is 10^6 -fold higher than the spontaneous mutation rate in somatic cells. As a result, following exposure to antigen, these B cells with higher-affinity receptors will be preferentially selected for survival. This differential selection is due to an increase in antibody affinity for an antigen, a process called affinity maturation. Thus, only the B cells with the best fitting receptors are selected for rapid proliferation and further maturation. SHM appears early in the phylogeny of vertebrate immune system and operates in all studied vertebrates.⁹⁴ Although the mechanism of SHM remains unknown, excitement in this field was triggered by the discovery of a requirement for activation-induced cytidine deaminase (AID), which has homology with the RNA-editing cytidine deaminase APOBEC-1.^{95,96}

Class Switching

Class or isotype switching is a deletional DNA recombination process that occurs in mature B cells and consists in the replacement of an expressed heavy-chain constant-region gene (usually C_μ for IgM) with another one with a different biological function, allowing expression of IgG, IgA or IgE.⁹⁷ The deleted sequence is excised in a form of circular DNA.⁹⁸ In this way, the antigen binding specificity of the antibody remains unaltered, but its effector functions are changed. This process is mediated by a recombination event that deletes the DNA between repeated sequences («switch regions») located upstream of the constant-region genes involved. AID catalyzes the hydrolytic deamination of cytidine to uridine, either as a free nucleotide or in the context of RNA and participates in CSR.^{99,100} In fact, AID-deficient mice, generated by gene-targeted mutation, lack completely the ability to undergo CSR and only form antibodies belonging to IgM isotype.⁹⁵ Moreover, in a group of immunodeficient patients with hyper-IgM syndrome, who had impaired CSR, the human gene encoding AID was mutated,⁹⁶ so their B cells only produced IgM molecules. AID is expressed specifically in GC-centroblasts,⁹⁹ but its exact role is unknown.

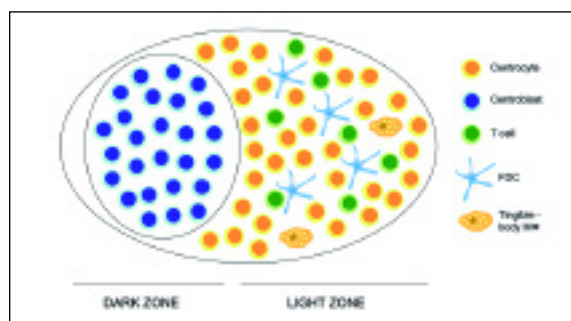


Figure 3. Structure of a germinal centre (GC). GCs are divided in a dark zone, where centroblasts predominate, and a light zone, mainly populated by centrocytes, follicular dendritic cells (FDC), T cells and tingible – body macrophages (FDC and tingible – body macrophages symbols were adapted from Rheugulation Database, a knowledge base on rheumatoid arthritis, <http://imm.fm.ul.pt/rheugulationdb/>).

Importantly, it was demonstrated that AID deficiency also affects SHM in mice and humans, which supports the idea that AID is involved in both mechanisms, CSR and SHM.^{95,101}

B cell activation

B cell receptor (BCR) and B cell co-receptor

Signals propagated through the BCR are vital for the development and survival of B lymphocytes in both the bone marrow and the periphery. The BCR of mature B cells is a multiprotein structure containing an antigen-binding membrane immunoglobulin, noncovalently associated with signal transducing elements Ig- α (CD79a) and Ig- β (CD79b), that form an heterodimer, localized mostly or wholly within the cell.^{102,103} The cytoplasmic tails of both Ig- α and Ig- β contain an 18-residue motif termed the immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM).¹⁰⁴ BCR signalling is initiated upon binding of antigen to membrane immunoglobulin, which induces a subsequent phosphorylation of ITAMs of Ig- α and Ig- β that, in turn, transduce the stimulus into an effective intracellular signal.¹⁰⁴⁻¹⁰⁶ The activating signals transmitted through the BCR during B cell stimulation can also be amplified by a B cell co-receptor. The B cell co-receptor is a complex of three proteins: CD19, CR2 (CD21) and CD81.¹⁰⁷⁻¹⁰⁹ CD19 is a member of the immunoglobulin superfamily; CR2 is a receptor for C3d, a breakdown product of the complement system, which is an important effector mechanism for destroying invaders; and CD81 is another transmembrane protein, also designated as a target for anti-proliferative antigen-1 (TAPA-1). Following antigen cross linking of the BCR and activation of B cell co-receptors, a cascade of phosphorylations is initiated by protein tyrosine kinases (PTKs)^{103,110-113} that culminate in the activation of transcription factors¹¹⁴ and the release of intracellular Ca^{2+} ^{113,115} that leads to B cell activation. In addition to the stimulatory co-receptor, there are also inhibitory receptors expressed on B cells. Each inhibitory receptor contains one or more immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs (ITIMs) within its cytoplasmic domain, essential for generation and transduction of inhibitory signals. The surface molecules CD22 and $\text{Fc}\gamma\text{RIIb}$ are examples of inhibitory B cell surface receptors. CD22 is a member of the immunoglobulin gene superfamily that is first expressed in the cytoplasm

of pro-B and pre-B cells and, later, is expressed on the surface of mature B cells. CD22 functions as a B cell inhibitor,^{116,117} although there are studies that indicate that it has a dual role in B cell activation,¹¹⁸ $\text{Fc}\gamma\text{RIIb}$ is also a member of the immunoglobulin superfamily and it is a low-affinity receptor for the Fc portion of IgG.¹¹⁹ $\text{Fc}\gamma\text{RIIb}$ is exclusively expressed on B cells and has the potential to terminate B cell signal transduction. Coligation of $\text{Fc}\gamma\text{RIIb}$ to the BCR leads to tyrosine phosphorylation of the ITIM by the tyrosine kinase Lyn, recruitment of phosphatase SHIP and inhibition of Ca^{2+} influx and proliferation.¹²⁰

B cell – T cell interactions

For an efficient activation of B cells by soluble protein antigens, an involvement of T cells is required. Binding of an antigen to the BCR does not, by itself, induce an effective competent signal without additional interactions between numerous receptor-ligand pairs on the two cell types. Antigen capture by membrane immunoglobulin on B cells initiates signalling through the BCR (signal 1) that leads to an up-regulation of the expression of class II Major Histocompatibility Complex (MHC) molecules^{121,122} and costimulatory B7 molecules.¹²³⁻¹²⁵ Antigen is internalized, processed and degraded to peptides that are then presented to the cell surface as MHC-peptide complexes.^{126,127} T cells can recognize these MHC-peptide complexes on B cell membrane. Both T and B cells interact to form a T-B conjugate that ultimately leads to T cell-dependent B cell activation.^{23,125,128} This interaction stimulates the expression of CD40-L (CD154) on the T cells, which is the ligand for CD40, expressed on B cells.^{129,130} CD40, expressed on B-lineage cells (pro-B through plasma cells), belongs to the tumour necrosis factor (TNF) family of cell-surface proteins and soluble cytokines that regulate cell proliferation. CD40L, expressed on T cells, belongs to the TNF receptor (TNFR) family. Interaction of CD40-L with CD40 on the B cell delivers a signal (signal 2)¹³¹⁻¹³³ to the B cell that, in concert with the signal generated by the BCR crosslinkage, induces the expression of costimulatory molecules of the B7 family.^{134,135} The B7 costimulatory family has two ligands, B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) that can activate or inhibit a T-cell response, depending on the membrane molecule on T cell with which they interact, CD28 or CTLA-4.^{136,137} CD28 is expressed by both resting and activated T cells and is the predominant receptor for B7 on resting T cells.

CTLA-4 is expressed only on activated T cells. Upon binding of a B7-costimulatory molecule with CD28, a positive costimulatory signal is generated and the T cell is activated, while signalling through CTLA-4 inhibits the response of the T cell.¹³⁸ So, for an efficient T-cell-dependent B cell activation a B7-CD28 interaction has to occur. The Inducible Costimulator Molecule (ICOS), a member of the CD28 family of costimulatory molecules expressed by T cells,¹³⁹ is also a key regulator of humoral immunity and B cell homeostasis and functions. ICOS binds to a B7-like molecule, B7RP-1,^{140,141} expressed constitutively on B cells.¹⁴² A major role for the ICOS/B7RP-1 pathway in the T cell-dependent B cell responses is supported by studies with both ICOS^{-/-} and B7RP-1^{-/-} mice that have decreased levels of serum antibodies and defective GC formation.¹⁴³⁻¹⁴⁶ Once activated, B cells begin to express membrane receptors for various cytokines produced by the interacting T cell. The signals produced by these cytokine-receptor interactions induce a number of intracellular signalling pathways that ultimately result in changes in gene expression that support B cell proliferation and can induce differentiation into plasma and memory cells, class switching and affinity maturation. Also, it has been demonstrated that activated B cells by sequential BCR and CD40 stimulation proliferate and secrete TNF- α , lymphotoxin and IL-6, cytokines that can act not only as autocrine growth and differentiation factors, but also serve to amplify the ongoing immune response.¹⁴⁷

B cells and Toll-like receptors

Toll-like receptors (TLRs) are pattern recognition receptors that sense molecular patterns specific of invading pathogens. Eleven TLRs have been identified so far, although in humans TLR11 is thought to be non-functional.¹⁴⁸ Recent evidence suggest that the generation of T-dependent B cell responses requires the activation of TLRs in B cells.^{149,150} The regulated expression of selected TLRs in B cells may play an important role in linking innate to adaptive immune responses. Human B lymphocytes express a distinct TLR expression profile in which TLR9 and TLR10 predominate.¹⁵¹ In naïve B cells most TLRs (TLR1-2 and TLR6-10) are expressed at low to undetectable levels, but the expression of TLR9 and TLR10 is rapidly induced following BCR triggering. In contrast, memory B cells express several TLRs at constitutively high levels.¹⁵² Unmethylated CG-dinucleotides with certain sequen-

ce contexts (CpG DNA), which function as TLR9 ligand, are recognized by our immune system as foreign DNA (bacterial or viral) and it has been demonstrated that CpG DNA motifs can trigger proliferation and activation of primary human B cells.¹⁵³ In fact, CpG DNA increases B cell expression of costimulatory molecules (CD80, CD86) and enhances the expression of both class I and class II MHC proteins.¹⁵⁴ Furthermore, memory B cells proliferate and differentiate to immunoglobulin secreting cells in response to CpG DNA, while naïve B cells only do so if simultaneously triggered through the BCR.^{152,155} So, in human B cells TLRs play distinct functions in primary responses and immunologic memory: on the one hand, the BCR induced expression of TLRs in naïve B cells prevents polyclonal activation in a primary response, because it restricts stimulation to antigen-specific B cells and, on the other hand, the constitutive expression of TLRs in memory B cells allows polyclonal activation of the entire memory pool, thus sustaining serologic memory.¹⁵² Importantly, B cell activation by TLRs occurs when the signal is delivered to B cells by a variety of microbial products (TLR agonists) acting directly on the TLRs expressed on B cells or indirectly through activation of dendritic cells that release cytokines, namely IL-6 and IL-12, that sustain B cell activation.¹⁵⁵ Besides the effect on B cell proliferation and plasma cell differentiation, it has been suggested that TLR stimulation is also required for induction of CSR, a fact supported by the up-regulation in the mRNA levels of AID on B cells stimulated by BCR, T cell help and CpG simultaneously.¹⁵⁵

B cells and antigens

T cell independent (TI) and T cell dependent (TD) antigens

After generation and migration of B cells from the bone marrow, activation, proliferation and differentiation occur in the periphery in a process that requires antigen. An antigen can be classified as T cell independent (TI) or T cell dependent (TD). TI antigens do not require T cell help to induce an immune response and do not produce immunologic memory. These antigens are generally polysaccharides and, as a result, cannot be presented to T cells via MHC molecules. They can be divided into two classes, TI-1 and TI-2.^{156,157} TI-1 antigens, such as bacterial lipopolysaccharide

(LPS),¹⁵⁸ are potent B cell mitogens that probably act through the activation of the Toll-like receptors¹⁵⁹ which leads to a non-specific polyclonal activation of B cells, that is, they are able to activate B cells regardless of their antigenic specificity.¹⁶⁰ In contrast, TI-2 antigens consist of large molecular weight, repetitive structures, such as capsular polysaccharides from bacteria and, unlike TI-1 antigens, they do not function as B cell mitogens. These antigens are resistant to degradation *in vivo* and are poorly internalized by B cells. TD antigens consist of proteins or peptides that require immune stimulation from helper T cells to elicit an immune response. Such antigens are presented to T cells in the context of MHC molecules expressed on B cells and other antigen presenting cells, following pathogen exposure.²³ The subsequent activation of T cells induces cytokine production that can further stimulate B cell responses. Importantly, TD antigens are more effective at inducing a lasting immune response, since they lead to the production of high affinity antibodies of multiple isotypes and memory B cells.

B cells as antigen presenting cells (APCs)

Binding of antigen to BCR leads to antigen internalization and presentation to T cells, a critical process in the initiation of the humoral immune response.^{161,162} B cells can internalize and present antigen that has been encountered in soluble form, as particles or when tethered to a non-internalizable surface.¹⁶³ The dependence of the efficiency of presentation differs for these three forms of antigen and it relies on antigen-BCR affinity.¹⁶⁴ After encountering antigen, an APC can internalize it by three means: phagocytosis, fluid-phase pinocytosis and receptor-mediated endocytosis. B cells have the ability to present antigen efficiently, since they can find T cells in secondary lymphoid organs shortly after antigen entrance and BCR-mediated endocytosis allows them to concentrate small amounts of specific antigen.¹⁶⁵⁻¹⁶⁷ In fact, BCR affinity is directly proportional to the capacity of B cells to present antigen to CD4⁺ T cells. It has been demonstrated that cells with a BCR of low affinity required ten times more antigen to induce CD4⁺ T cell proliferation than cells with a BCR of very high affinity, while presentation after uptake by fluid phase pinocytosis needed concentrations about 5000 times higher.¹⁶³ So, the high affinity of the BCR for its specific antigen allows its efficient internalization even in the presence of small amounts of an-

tigen.¹⁶⁶ Also, BCR signalling up-regulates MHC-II expression and, consequently, the generation of peptide-MHC II complexes,^{127,168} which enhances the efficiency of antigen presentation. Given the complexity of immune responses and the diversity of antigens relevant to human disease, B cells should participate as APC in many situations.

Immune B cell tolerance

Upon encountering an antigen, the immune system can either develop an immune response or enter a state of unresponsiveness called tolerance. The development of immunity or tolerance must be carefully regulated since an inappropriate response, whether it is immunity to self-antigens (autoimmunity) or tolerance to a potential pathogen, can have serious and possibly life-threatening consequences. Every time an antigen is introduced in the human body, important regulatory decisions determine the branch of the immune system (humoral or cell-mediated immunity) to be activated, the intensity of the response and its duration. The mechanisms that play a role in the induction of B cell tolerance are anergy, clonal deletion and receptor-editing.

Clonal Deletion and Anergy

During B cell development in the bone marrow, 50-75% of B cells produced are autoreactive and must be silenced.¹⁶⁹ Tolerance is achieved by the clonal deletion (apoptosis) of self-reactive lymphocytes expressing receptors with high avidity for self.^{170,171} Another mechanism that is responsible for silencing a significant proportion of autoreactive B cells that arise in the bone marrow or that circulate in the periphery is anergy.¹⁷²⁻¹⁷⁴ A cell is said to be anergic if it gives no activation response when exposed to an antigen that binds to its receptor. The decision of which silencing mechanisms are used depends upon receptor affinity and autoantigen avidity. Higher avidity favors clonal deletion and, hence, cell death. Low avidity interactions invoke anergy.

Receptor Editing

In the bone marrow, newly formed B cells expressing autoreactive receptors can either be deleted by apoptosis, or escape cell death by modifying their antigen receptors by receptor editing.¹⁷⁵ Receptor editing is a process that alters antigen receptors by

allowing secondary V(D)J rearrangements (usually on light chains), that change the receptor specificity.^{176,177} So, signalling through an autoreactive antigen receptor promotes further receptor-gene rearrangements, which can destroy the receptor gene that confers autoreactivity, thereby eliminating the autoreactivity of the cell without eliminating the cell itself.^{178,179} This process is the dominant tolerance mechanism for developing B cells and it occurs at the immature B cell stage, in the bone marrow.¹⁷⁷ If a B cell with a forbidden receptor fails to edit to a less self-reactive receptor, cell death occurs within 1-2 days, either in the bone marrow or shortly after arriving in the spleen.¹⁸⁰ Importantly, about 25% of the light chains found on the surface of developing B cells *in vivo* are produced by receptor editing,¹⁸¹ a fact that can emphasize the important contribution of this process to the normal antibody repertoire.

B cells and Autoimmunity

Autoimmune diseases result from disorders in the immune system that erroneously recognizes self antigens. Autoreactive B cells can arise in the bone marrow or in the periphery and, if not properly inhibited or eliminated, autoimmune diseases may develop. In fact, the pathogenic roles of B cells in autoimmunity can be due to several mechanisms that include autoantibody production and immune complex formation, cytokine synthesis, chemokine-mediated functions, antigen presentation, T cell activation and ectopic lymphogenesis. These effects are part of the process of antibody formation and their exact roles in human autoimmunity are in fact unclear. Nevertheless, there is a strong correlation between autoimmune diseases and autoantibody production: in Rheumatoid Arthritis (RA), rheumatoid factors (RF) against the Fc portion of Ig are produced and form immune complexes that are deposited in the joints;^{182,183} Systemic Lupus Erythematosus (SLE) is a systemic autoimmune disease with autoantibodies directed against a vast array of tissue antigens;^{184,185} Myasthenia gravis is an autoimmune disease that ultimately leads to a progressive weakening of the skeletal muscles due to autoantibodies that bind the acetylcholine receptors;¹⁸⁶ or Idiopathic Thrombocytopenia Purpura (ITP), that results from the production of autoantibodies against platelets.^{187,188} Evidence indicating an important role

for B cells in directing T cell function in autoimmunity is provided by experiments involving CD40/CD40L blockade. In fact, it has been demonstrated that the use of anti-CD40L monoclonal antibodies is beneficial in several mouse models of SLE, inflammatory arthritis and colitis.^{189,190} Importantly, it is necessary to realize that a careful extrapolation to the human case has always to be considered, since the aetiology of experimental autoreactivity in animal models is not likely to be the same which applies in spontaneous autoimmunity in humans. B cells also secrete cytokines and chemokines, including IL-16, MIP1 α and MIP1 β , that can modulate DC migration and function.^{191,192} Lymphoid-like follicles have also been described in several autoimmune diseases, like the synovium in RA patients,^{193,194} inflamed salivary glands in Sjögren's Syndrome,^{43,195} the ventricular-meningeal compartments in Multiple Sclerosis (MS),^{196,197} thyroid lobes in autoimmune thyroiditis^{198,199} and kidneys in lupus nephritis patients.²⁰⁰ Within these structures, B cells are fundamental for the generation of inflammatory signals and for activating T cells and DC, contributing to inflammatory disease. For instance, lymphotoxin α/β , which is expressed by B cells, is essential for the differentiation of FDC in secondary lymphoid organs and the development of effective lymphoid architecture.²⁰¹ Defects in B cell signalling can also be responsible for autoimmune conditions. For example, deficiency in CD22 is sufficient to predispose to development of high-affinity autoantibodies.²⁰² Moreover, over-expression of CD19 correlates with autoimmunity by the induction of hyperresponsive B cells.^{203,204} Furthermore, alterations in the expression of genes that regulate B cell survival can lead to the development of autoimmunity. MRL mice homozygous for mutations in the Fas gene, a death-inducing receptor required for normal regulation of B cell lifespan, develop a spectrum of autoreactivity resembling that found in human SLE and other autoimmune diseases.^{205,206} BAFF, also known as BlyS, TALL-1, THANK or zTNF4, is a member of the TNF family of cytokines produced by DC, monocytes and macrophages that has a fundamental role in B cell growth, differentiation and survival. Mice transgenic for BAFF have SLE-like disease, with anti-DNA antibodies, elevated serum IgM, vasculitis and glomerulonephritis.^{207,208} Importantly, several of the autoimmune diseases might result from the deficient B cell tolerance associated, in part, with the over-production of BAFF that might lead to inap-

appropriate survival of autoreactive B cells. In fact, elevated BAFF levels can be found in the sera of patients with autoimmune diseases, particularly those with SLE, RA, Sjögren's syndrome, myasthenia gravis and ITP.^{195,209-211} Having in mind the role of B cells in autoimmunity, the development of B cell depletion therapies is of great importance in order to stop or attenuate the disease. The introduction of B cell depletion therapy in RA patients using Rituximab (RTX), a monoclonal antibody directed to CD20, has confirmed and reinforced the importance of these cells in established RA. In fact, following B cell depletion in patients with RA, there is clinical and serological improvement which parallels a decrease in RF levels.²¹² Moreover, RTX therapy was also beneficial in the treatment of ITP²¹³ and SLE.^{214,215} Furthermore, the efficacy of B cell depletion therapy was also observed in animal models: B cell deprived MRL/*lpr* mice not only lack the immune deposit manifestations of nephritis, but also have no cellular infiltrates in the kidney or vasculitis, which implies an essential role for B cells in this animal model of lupus.²¹⁶ However, in spite of the benefits that B cell depletion therapies may have in patients suffering with an autoimmune condition, clinical relapses are observed.¹⁸³ This might indicate that new and more effective methods for treating autoimmune diseases are needed and further research in this area is fundamental and necessary.

Conclusions

The life of a B cell is a complex process that has to be tightly regulated. During B cell development in the bone marrow and later in the periphery in secondary lymphoid organs, immune B cell tolerance mechanisms are fundamental in order to avoid pathologies like autoimmune diseases that, if not properly diagnosed and treated, can have life-threatening consequences. In fact, B cell signalling and activation, B-T cell interactions and processes to generate antibody diversity can be responsible for the development of abnormal immune conditions when not efficiently regulated and monitored. So, research areas that concern B cell targeted therapies are of great importance to stop or, at least, to attenuate the effects of diseases with a B cell origin, such as autoimmune diseases, or B cell lymphomas. Nevertheless, B cells do play an essential role in our immune system, most notably for

the astonishing capacity to produce antibodies to an apparently limitless array of antigens and by interacting with T cells, thus enabling a more effective immune response.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from Sociedade Portuguesa de Reumatologia/Schering-Plough 2005 and by the project research fellowship SFRH/BD/30247/2006 by Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT).

Correspondence to:

João Eurico Fonseca
Unidade de Investigação em Reumatologia
Instituto de Medicina Molecular
Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa
Edifício Egas Moniz
Av. Professor Egas Moniz
1649-028 Lisboa, Portugal
E-mail: jefonseca@netcabo.pt

References:

1. Glick, B., The bursa of Fabricius and immunoglobulin synthesis. *Int Rev Cytol*, 1977. 48: p. 345-402.
2. Cooper, M.D., et al., The functions of the thymus system and the bursa system in the chicken. *J Exp Med*, 1966. 123(1): p. 75-102.
3. Nunez, C., et al., B cells are generated throughout life in humans. *J Immunol*, 1996. 156(2): p. 866-872.
4. Loken, M.R., et al., Flow cytometric analysis of human bone marrow. II. Normal B lymphocyte development. *Blood*, 1987. 70(5): p. 1316-1324.
5. LeBien, T.W., et al., Multiparameter flow cytometric analysis of human fetal bone marrow B cells. *Leukemia*, 1990. 4(5): p. 354-358.
6. Rossi, M.I., et al., B lymphopoiesis is active throughout human life, but there are developmental age-related changes. *Blood*, 2003. 101(2): p. 576-584.
7. Hystad, M.E., et al., Characterization of early stages of human B cell development by gene expression profiling. *J Immunol*, 2007. 179(6): p. 3662-3671.
8. Li, Y.S., et al., Identification of the earliest B lineage stage in mouse bone marrow. *Immunity*, 1996. 5(6): p. 527-535.
9. Tudor, K.S., et al., Functional assessment of precursors from murine bone marrow suggests a sequence of early B lineage differentiation events. *Immunity*, 2000. 12(3): p. 335-345.
10. Johnson, S.E., et al., Murine and human IL-7 activate STAT5 and induce proliferation of normal human pro-B cells. *J Immunol*, 2005. 175(11): p. 7325-7331.
11. Taguchi, T., et al., Interleukin-7 contributes to human pro-B-cell development in a mouse stromal cell-dependent culture system. *Exp Hematol*, 2007. 35(9): p. 1398-1407.
12. Kline, G.H., et al., Pre-B cell receptor-mediated selection of pre-B cells synthesizing functional mu he-

- avy chains. *J Immunol*, 1998. 161(4): p. 1608-1618.
13. Hardy, R.R., et al., Resolution and characterization of pro-B and pre-pro-B cell stages in normal mouse bone marrow. *J Exp Med*, 1991. 173(5): p. 1213-1225.
14. Rolink, A., et al., IL-2 receptor alpha chain (CD25, TAC) expression defines a crucial stage in pre-B cell development. *Int Immunol*, 1994. 6(8): p. 1257-1264.
15. Ghia, P., et al., Ordering of human bone marrow B lymphocyte precursors by single-cell polymerase chain reaction analyses of the rearrangement status of the immunoglobulin H and L chain gene loci. *J Exp Med*, 1996. 184(6): p. 2217-2229.
16. Karasuyama, H., et al., The expression of Vpre-B/lambda 5 surrogate light chain in early bone marrow precursor B cells of normal and B cell-deficient mutant mice. *Cell*, 1994. 77(1): p. 133-143.
17. Ghia, P., et al., Immature B cells from human and mouse bone marrow can change their surface light chain expression. *Eur J Immunol*, 1995. 25(11): p. 3108-3114.
18. Moe, R.E., Electron Microscopic Appearance of the Parenchyma of Lymph Nodes. *Am J Anat*, 1964. 114: p. 341-369.
19. Crivellato, E., A. Vacca, and D. Ribatti, Setting the stage: an anatomist's view of the immune system. *Trends Immunol*, 2004. 25(4): p. 210-217.
20. Okada, T., et al., Chemokine requirements for B cell entry to lymph nodes and Peyer's patches. *J Exp Med*, 2002. 196(1): p. 65-75.
21. Ebisuno, Y., et al., Cutting edge: the B cell chemokine CXC chemokine ligand 13/B lymphocyte chemoattractant is expressed in the high endothelial venules of lymph nodes and Peyer's patches and affects B cell trafficking across high endothelial venules. *J Immunol*, 2003. 171(4): p. 1642-1646.
22. Kanemitsu, N., et al., CXCL13 is an arrest chemokine for B cells in high endothelial venules. *Blood*, 2005. 106(8): p. 2613-2618.
23. Garside, P., et al., Visualization of specific B and T lymphocyte interactions in the lymph node. *Science*, 1998. 281(5373): p. 96-99.
24. Weiss, L., The structure of fine splenic arterial vessels in relation to hemoconcentration and red cell destruction. *Am J Anat*, 1962. 111: p. 131-179.
25. Weiss, L., A scanning electron microscopic study of the spleen. *Blood*, 1974. 43(5): p. 665-691.
26. Steiniger, B., P. Barth, and A. Hellinger, The perifollicular and marginal zones of the human splenic white pulp : do fibroblasts guide lymphocyte immigration? *Am J Pathol*, 2001. 159(2): p. 501-512.
27. Cornes, J.S., Peyer's patches in the human gut. *Proc R Soc Med*, 1965. 58(9): p. 716.
28. Owen, R.L. and A.L. Jones, Epithelial cell specialization within human Peyer's patches: an ultrastructural study of intestinal lymphoid follicles. *Gastroenterology*, 1974. 66(2): p. 189-203.
29. Farstad, I.N., et al., Heterogeneity of M-cell-associated B and T cells in human Peyer's patches. *Immunology*, 1994. 83(3): p. 457-464.
30. Islam, K.B., et al., TGF-beta 1 induces germ-line transcripts of both IgA subclasses in human B lymphocytes. *Int Immunol*, 1991. 3(11): p. 1099-1106.
31. Nilsson, L., et al., Structure of TGF-beta 1-induced human immunoglobulin C alpha 1 and C alpha 2 germ-line transcripts. *Int Immunol*, 1991. 3(11): p. 1107-1115.
32. Crabbe, P.A. and J.E. Heremans, The distribution of immunoglobulin-containing cells along the human gastrointestinal tract. *Gastroenterology*, 1968. 54(4): p. 822, 825.
33. Crago, S.S., et al., Distribution of IgA1-, IgA2-, and J chain-containing cells in human tissues. *J Immunol*, 1984. 132(1): p. 16-18.
34. MacLennan, I.C., Germinal centers. *Annu Rev Immunol*, 1994. 12: p. 117-139.
35. Allen, C.D., et al., Germinal center dark and light zone organization is mediated by CXCR4 and CXCR5. *Nat Immunol*, 2004. 5(9): p. 943-952.
36. van den Oord, J.J., C. de Wolf-Peeters, and V.J. Desmet, The composite nodule. A structural and functional unit of the reactive human lymph node. *Am J Pathol*, 1986. 122(1): p. 83-91.
37. Tierens, A., et al., Marginal-zone B cells in the human lymph node and spleen show somatic hypermutations and display clonal expansion. *Blood*, 1999. 93(1): p. 226-234.
38. Berek, C., A. Berger, and M. Apel, Maturation of the immune response in germinal centers. *Cell*, 1991. 67(6): p. 1121-1129.
39. Han, S., et al., Distinctive characteristics of germinal center B cells. *Semin Immunol*, 1997. 9(4): p. 255-260.
40. Camacho, S.A., M.H. Kosco-Vilbois, and C. Berek, The dynamic structure of the germinal center. *Immunol Today*, 1998. 19(11): p. 511-514.
41. Husson, H., et al., Functional effects of TNF and lymphotoxin alpha1beta2 on FDC-like cells. *Cell Immunol*, 2000. 203(2): p. 134-143.
42. Lindhout, E., et al., Direct evidence that human follicular dendritic cells (FDC) rescue germinal centre B cells from death by apoptosis. *Clin Exp Immunol*, 1993. 91(2): p. 330-336.
43. Barone, F., et al., Association of CXCL13 and CCL21 expression with the progressive organization of lymphoid-like structures in Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum*, 2005. 52(6): p. 1773-1784.
44. Gunn, M.D., et al., A B-cell-homing chemokine made in lymphoid follicles activates Burkitt's lymphoma receptor-1. *Nature*, 1998. 391(6669): p. 799-803.
45. Breitfeld, D., et al., Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production. *J Exp Med*, 2000. 192(11): p. 1545-1552.
46. Han, S., et al., In situ studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl. IV. Affinity-dependent, antigen-driven B cell apoptosis in germinal centers as a mechanism for maintaining self-tolerance. *J Exp Med*, 1995. 182(6): p. 1635-1644.

47. Surh, C.D. and J. Sprent, T-cell apoptosis detected in situ during positive and negative selection in the thymus. *Nature*, 1994. 372(6501): p. 100-103.
48. Baumann, I., et al., Impaired uptake of apoptotic cells into tingible body macrophages in germinal centers of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, 2002. 46(1): p. 191-201.
49. Gaip, U.S., et al., Impaired clearance of dying cells in systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev*, 2005. 4(4): p. 189-194.
50. Arce, S., et al., CD38 low IgG-secreting cells are precursors of various CD38 high-expressing plasma cell populations. *J Leukoc Biol*, 2004. 75(6): p. 1022-1028.
51. Vora, K.A., K. Tumas-Brundage, and T. Manser, Contrasting the in situ behavior of a memory B cell clone during primary and secondary immune responses. *J Immunol*, 1999. 163(8): p. 4315-4327.
52. Caligaris-Cappio, F., et al., Infrequent normal B lymphocytes express features of B-chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med*, 1982. 155(2): p. 623-628.
53. Hayakawa, K., et al., Ly-1 B cells: functionally distinct lymphocytes that secrete IgM autoantibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1984. 81(8): p. 2494-2498.
54. Hayakawa, K., et al., Progenitors for Ly-1 B cells are distinct from progenitors for other B cells. *J Exp Med*, 1985. 161(6): p. 1554-1568.
55. Hardy, R.R. and K. Hayakawa, Development and physiology of Ly-1 B and its human homolog, Leu-1 B. *Immunol Rev*, 1986. 93: p. 53-79.
56. Rothstein, T.L., Cutting edge commentary: two B-1 or not to be one. *J Immunol*, 2002. 168(9): p. 4257-4261.
57. Bos, N.A., et al., The influence of exogenous antigenic stimulation on the specificity repertoire of background immunoglobulin-secreting cells of different isotypes. *Cell Immunol*, 1988. 112(2): p. 371-380.
58. Mackenzie, L.E., et al., Auto- and polyreactivity of IgM from CD5+ and CD5- cord blood B cells. *Scand J Immunol*, 1991. 33(3): p. 329-335.
59. Haas, K.M., et al., B-1a and B-1b cells exhibit distinct developmental requirements and have unique functional roles in innate and adaptive immunity to *S. pneumoniae*. *Immunity*, 2005. 23(1): p. 7-18.
60. Alugupalli, K.R., et al., B1b lymphocytes confer T cell-independent long-lasting immunity. *Immunity*, 2004. 21(3): p. 379-390.
61. Montecino-Rodriguez, E., H. Leathers, and K. Dorshkind, Identification of a B-1 B cell-specified progenitor. *Nat Immunol*, 2006. 7(3): p. 293-301.
62. Boumsell, L., et al., Some chronic lymphocytic leukemia cells bearing surface immunoglobulins share determinants with T cells. *Eur J Immunol*, 1978. 8(12): p. 900-904.
63. Kasaian, M.T., H. Ikematsu, and P. Casali, Identification and analysis of a novel human surface CD5- B lymphocyte subset producing natural antibodies. *J Immunol*, 1992. 148(9): p. 2690-2702.
64. Morikawa, K., F. Oseko, and S. Morikawa, Induction of CD5 antigen on human CD5- B cells by stimulation with *Staphylococcus aureus* Cowan strain I. *Int Immunol*, 1993. 5(8): p. 809-816.
65. Wortis, H.H., et al., B-cell activation by crosslinking of surface IgM or ligation of CD40 involves alternative signal pathways and results in different B-cell phenotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. 92(8): p. 3348-3352.
66. Hieter, P.A., et al., Human immunoglobulin kappa light-chain genes are deleted or rearranged in lambda-producing B cells. *Nature*, 1981. 290(5805): p. 368-372.
67. Hozumi, N. and S. Tonegawa, Evidence for somatic rearrangement of immunoglobulin genes coding for variable and constant regions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1976. 73(10): p. 3628-3632.
68. Tonegawa, S., Somatic generation of antibody diversity. *Nature*, 1983. 302(5909): p. 575-581.
69. Papavasiliou, F., et al., V(D)J recombination in mature B cells: a mechanism for altering antibody responses. *Science*, 1997. 278(5336): p. 298-301.
70. Oettinger, M.A., et al., RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science*, 1990. 248(4962): p. 1517-1523.
71. McBlane, J.F., et al., Cleavage at a V(D)J recombination signal requires only RAG1 and RAG2 proteins and occurs in two steps. *Cell*, 1995. 83(3): p. 387-395.
72. Grawunder, U., et al., Down-regulation of RAG1 and RAG2 gene expression in preB cells after functional immunoglobulin heavy chain rearrangement. *Immunity*, 1995. 3(5): p. 601-608.
73. Difilippantonio, M.J., et al., RAG1 mediates signal sequence recognition and recruitment of RAG2 in V(D)J recombination. *Cell*, 1996. 87(2): p. 253-262.
74. Sawchuk, D.J., et al., V(D)J recombination: modulation of RAG1 and RAG2 cleavage activity on 12/23 substrates by whole cell extract and DNA-bending proteins. *J Exp Med*, 1997. 185(11): p. 2025-2032.
75. Hiom, K. and M. Gellert, A stable RAG1-RAG2-DNA complex that is active in V(D)J cleavage. *Cell*, 1997. 88(1): p. 65-72.
76. Constantinescu, A. and M.S. Schlissel, Changes in locus-specific V(D)J recombinase activity induced by immunoglobulin gene products during B cell development. *J Exp Med*, 1997. 185(4): p. 609-620.
77. Girschick, H.J., et al., RAG1 and RAG2 expression by B cell subsets from human tonsil and peripheral blood. *J Immunol*, 2001. 166(1): p. 377-386.
78. Zhang, Z., et al., Expression of recombination-activating genes and terminal deoxynucleotidyl transferase and secondary rearrangement of immunoglobulin kappa light chains in rheumatoid arthritis synovial tissue. *Arthritis Rheum*, 2001. 44(10): p. 2275-2284.
79. Girschick, H.J., et al., Expression of recombination activating genes 1 and 2 in peripheral B cells of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, 2002. 46(5): p. 1255-1263.
80. Mombaerts, P., et al., RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell*, 1992. 68(5): p. 869-877.

81. Shinkai, Y., et al., RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell*, 1992. 68(5): p. 855-867.
82. Notarangelo, L.D., A. Villa, and K. Schwarz, RAG and RAG defects. *Curr Opin Immunol*, 1999. 11(4): p. 435-442.
83. Early, P., et al., An immunoglobulin heavy chain variable region gene is generated from three segments of DNA: VH, D and JH. *Cell*, 1980. 19(4): p. 981-992.
84. Eastman, Q.M., T.M. Leu, and D.G. Schatz, Initiation of V(D)J recombination in vitro obeying the 12/23 rule. *Nature*, 1996. 380(6569): p. 85-88.
85. Desiderio, S.V., et al., Insertion of N regions into heavy-chain genes is correlated with expression of terminal deoxynucleotidyl transferase in B cells. *Nature*, 1984. 311(5988): p. 752-755.
86. Gilfillan, S., et al., Mice lacking TdT: mature animals with an immature lymphocyte repertoire. *Science*, 1993. 261(5125): p. 1175-1178.
87. Benedict, C.L., S. Gilfillan, and J.F. Kearney, The long isoform of terminal deoxynucleotidyl transferase enters the nucleus and, rather than catalyzing non-templated nucleotide addition, modulates the catalytic activity of the short isoform. *J Exp Med*, 2001. 193(1): p. 89-99.
88. Papavasiliou, F.N. and D.G. Schatz, Cell-cycle-regulated DNA double-stranded breaks in somatic hypermutation of immunoglobulin genes. *Nature*, 2000. 408(6809): p. 216-221.
89. Bross, L., et al., DNA double-strand breaks in immunoglobulin genes undergoing somatic hypermutation. *Immunity*, 2000. 13(5): p. 589-597.
90. Bemark, M., et al., Somatic hypermutation in the absence of DNA-dependent protein kinase catalytic subunit (DNA-PK(cs)) or recombination-activating gene (RAG)1 activity. *J Exp Med*, 2000. 192(10): p. 1509-1514.
91. Goossens, T., U. Klein, and R. Kuppers, Frequent occurrence of deletions and duplications during somatic hypermutation: implications for oncogene translocations and heavy chain disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. 95(5): p. 2463-2468.
92. Wilson, P.C., et al., Somatic hypermutation introduces insertions and deletions into immunoglobulin V genes. *J Exp Med*, 1998. 187(1): p. 59-70.
93. Sale, J.E. and M.S. Neuberger, TdT-accessible breaks are scattered over the immunoglobulin V domain in a constitutively hypermutating B cell line. *Immunity*, 1998. 9(6): p. 859-869.
94. Du Pasquier, L., The phylogenetic origin of antigen-specific receptors. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2000. 248: p. 160-185.
95. Muramatsu, M., et al., Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell*, 2000. 102(5): p. 553-563.
96. Revy, P., et al., Activation-induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the Hyper-IgM syndrome (HIGM2). *Cell*, 2000. 102(5): p. 565-575.
97. Okazaki, I.M., et al., The AID enzyme induces class switch recombination in fibroblasts. *Nature*, 2002. 416(6878): p. 340-345.
98. Iwasato, T., et al., Circular DNA is excised by immunoglobulin class switch recombination. *Cell*, 1990. 62(1): p. 143-149.
99. Muramatsu, M., et al., Specific expression of activation-induced cytidine deaminase (AID), a novel member of the RNA-editing deaminase family in germinal center B cells. *J Biol Chem*, 1999. 274(26): p. 18470-18476.
100. Chaudhuri, J., et al., Transcription-targeted DNA deamination by the AID antibody diversification enzyme. *Nature*, 2003. 422(6933): p. 726-730.
101. Ta, V.T., et al., AID mutant analyses indicate requirement for class-switch-specific cofactors. *Nat Immunol*, 2003. 4(9): p. 843-848.
102. Hombach, J., et al., Molecular components of the B-cell antigen receptor complex of the IgM class. *Nature*, 1990. 343(6260): p. 760-762.
103. Kurosaki, T., et al., Role of the Syk autophosphorylation site and SH2 domains in B cell antigen receptor signaling. *J Exp Med*, 1995. 182(6): p. 1815-1823.
104. Pao, L.L., S.J. Famiglietti, and J.C. Cambier, Asymmetrical phosphorylation and function of immunoreceptor tyrosine-based activation motif tyrosines in B cell antigen receptor signal transduction. *J Immunol*, 1998. 160(7): p. 3305-3314.
105. Flaswinkel, H. and M. Reth, Dual role of the tyrosine activation motif of the Ig-alpha protein during signal transduction via the B cell antigen receptor. *Embo J*, 1994. 13(1): p. 83-89.
106. Li, C., et al., Cooperative interaction of Ig(alpha) and Ig(beta) of the BCR regulates the kinetics and specificity of antigen targeting. *Int Immunol*, 2002. 14(10): p. 1179-1191.
107. Sato, S., et al., Regulation of B lymphocyte development and activation by the CD19/CD21/CD81/Leu 13 complex requires the cytoplasmic domain of CD19. *J Immunol*, 1997. 159(7): p. 3278-3287.
108. Mongini, P.K., et al., Role of complement-binding CD21/CD19/CD81 in enhancing human B cell protection from Fas-mediated apoptosis. *J Immunol*, 2003. 171(10): p. 5244-5254.
109. Cherukuri, A., et al., The tetraspanin CD81 is necessary for partitioning of coligated CD19/CD21-B cell antigen receptor complexes into signaling-active lipid rafts. *J Immunol*, 2004. 172(1): p. 370-380.
110. Kurosaki, T., et al., Syk activation by the Src-family tyrosine kinase in the B cell receptor signaling. *J Exp Med*, 1994. 179(5): p. 1725-1729.
111. Saito, K., A.M. Scharenberg, and J.P. Kinet, Interaction between the Btk PH domain and phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate directly regulates Btk. *J Biol Chem*, 2001. 276(19): p. 16201-16206.
112. Fu, C., et al., BLNK: a central linker protein in B cell activation. *Immunity*, 1998. 9(1): p. 93-103.
113. Takata, M., et al., Tyrosine kinases Lyn and Syk regu-

- late B cell receptor-coupled Ca^{2+} mobilization through distinct pathways. *Embo J*, 1994. 13(6): p. 1341-1349.
114. Saijo, K., et al., Protein kinase C beta controls nuclear factor kappaB activation in B cells through selective regulation of the IkappaB kinase alpha. *J Exp Med*, 2002. 195(12): p. 1647-1652.
 115. Dolmetsch, R.E., et al., Differential activation of transcription factors induced by Ca^{2+} response amplitude and duration. *Nature*, 1997. 386(6627): p. 855-858.
 116. Smith, K.G., et al., Inhibition of the B cell by CD22: a requirement for Lyn. *J Exp Med*, 1998. 187(5): p. 807-811.
 117. Bobbitt, K.R. and L.B. Justement, Regulation of MHC class II signal transduction by the B cell coreceptors CD19 and CD22. *J Immunol*, 2000. 165(10): p. 5588-5596.
 118. Otipoby, K.L., K.E. Draves, and E.A. Clark, CD22 regulates B cell receptor-mediated signals via two domains that independently recruit Grb2 and SHP-1. *J Biol Chem*, 2001. 276(47): p. 44315-44322.
 119. Latour, S., W.H. Fridman, and M. Daeron, Identification, molecular cloning, biologic properties, and tissue distribution of a novel isoform of murine low-affinity IgG receptor homologous to human Fc gamma RIIb1. *J Immunol*, 1996. 157(1): p. 189-197.
 120. Bolland, S. and J.V. Ravetch, Spontaneous autoimmune disease in Fc(gamma)RIIB-deficient mice results from strain-specific epistasis. *Immunity*, 2000. 13(2): p. 277-285.
 121. Lang, P., et al., TCR-induced transmembrane signaling by peptide/MHC class II via associated Ig-alpha/beta dimers. *Science*, 2001. 291(5508): p. 1537-1540.
 122. Poudrier, J. and T. Owens, CD54/intercellular adhesion molecule 1 and major histocompatibility complex II signaling induces B cells to express interleukin 2 receptors and complements help provided through CD40 ligation. *J Exp Med*, 1994. 179(5): p. 1417-1427.
 123. Nabavi, N., et al., Signalling through the MHC class II cytoplasmic domain is required for antigen presentation and induces B7 expression. *Nature*, 1992. 360(6401): p. 266-28.
 124. Freeman, G.J., et al., Cloning of B7-2: a CTLA-4 counter-receptor that costimulates human T cell proliferation. *Science*, 1993. 262(5135): p. 909-911.
 125. Watts, T.H., et al., Induction of costimulatory molecule B7 in M12 B lymphomas by cAMP or MHC-restricted T cell interaction. *J Immunol*, 1993. 150(6): p. 2192-2202.
 126. Aluvihare, V.R., et al., Acceleration of intracellular targeting of antigen by the B-cell antigen receptor: importance depends on the nature of the antigen-antibody interaction. *Embo J*, 1997. 16(12): p. 3553-3562.
 127. Cheng, P.C., et al., MHC class II antigen processing in B cells: accelerated intracellular targeting of antigens. *J Immunol*, 1999. 162(12): p. 7171-7180.
 128. Okada, T., et al., Antigen-engaged B cells undergo chemotaxis toward the T zone and form motile conjugates with helper T cells. *PLoS Biol*, 2005. 3(6): p. e150.
 129. Evans, D.E., et al., Resting B lymphocytes as APC for naive T lymphocytes: dependence on CD40 ligand/CD40. *J Immunol*, 2000. 164(2): p. 688-697.
 130. Wu, Y., et al., Rapid induction of a novel costimulatory activity on B cells by CD40 ligand. *Curr Biol*, 1995. 5(11): p. 1303-1311.
 131. Nishioka, Y. and P.E. Lipsky, The role of CD40-CD40 ligand interaction in human T cell-B cell collaboration. *J Immunol*, 1994. 153(3): p. 1027-1036.
 132. Grewal, I.S., J. Xu, and R.A. Flavell, Impairment of antigen-specific T-cell priming in mice lacking CD40 ligand. *Nature*, 1995. 378(6557): p. 617-620.
 133. van Essen, D., H. Kikutani, and D. Gray, CD40 ligand-transduced co-stimulation of T cells in the development of helper function. *Nature*, 1995. 378(6557): p. 620-623.
 134. Ranheim, E.A. and T.J. Kipps, Activated T cells induce expression of B7/BB1 on normal or leukemic B cells through a CD40-dependent signal. *J Exp Med*, 1993. 177(4): p. 925-935.
 135. Roy, M., et al., Studies on the interdependence of gp39 and B7 expression and function during antigen-specific immune responses. *Eur J Immunol*, 1995. 25(2): p. 596-603.
 136. de Boer, M., et al., Ligation of B7 with CD28/CTLA-4 on T cells results in CD40 ligand expression, interleukin-4 secretion and efficient help for antibody production by B cells. *Eur J Immunol*, 1993. 23(12): p. 3120-3125.
 137. Linsley, P.S., et al., Human B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) bind with similar avidities but distinct kinetics to CD28 and CTLA-4 receptors. *Immunity*, 1994. 1(9): p. 793-801.
 138. Damle, N.K., et al., Costimulation of T lymphocytes with integrin ligands intercellular adhesion molecule-1 or vascular cell adhesion molecule-1 induces functional expression of CTLA-4, a second receptor for B7. *J Immunol*, 1994. 152(6): p. 2686-2697.
 139. Hutloff, A., et al., ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature*, 1999. 397(6716): p. 263-266.
 140. Yoshinaga, S.K., et al., T-cell co-stimulation through B7RP-1 and ICOS. *Nature*, 1999. 402(6763): p. 827-832.
 141. Mages, H.W., et al., Molecular cloning and characterization of murine ICOS and identification of B7h as ICOS ligand. *Eur J Immunol*, 2000. 30(4): p. 1040-1047.
 142. Liang, L., E.M. Porter, and W.C. Sha, Constitutive expression of the B7h ligand for inducible costimulator on naive B cells is extinguished after activation by distinct B cell receptor and interleukin 4 receptor-mediated pathways and can be rescued by CD40 signaling. *J Exp Med*, 2002. 196(1): p. 197-108.
 143. Dong, C., et al., ICOS co-stimulatory receptor is es-

- sential for T-cell activation and function. *Nature*, 2001. 409(6816): p. 97-101.
144. McAdam, A.J., et al., ICOS is critical for CD40-mediated antibody class switching. *Nature*, 2001. 409(6816): p. 102-105.
 145. Tafuri, A., et al., ICOS is essential for effective T-helper-cell responses. *Nature*, 2001. 409(6816): p. 105-109.
 146. Mak, T.W., et al., Costimulation through the inducible costimulator ligand is essential for both T helper and B cell functions in T cell-dependent B cell responses. *Nat Immunol*, 2003. 4(8): p. 765-772.
 147. Duddy, M.E., A. Alter, and A. Bar-Or, Distinct profiles of human B cell effector cytokines: a role in immune regulation? *J Immunol*, 2004. 172(6): p. 3422-3427.
 148. Kawai, T. and S. Akira, Pathogen recognition with Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol*, 2005. 17(4): p. 338-344.
 149. Pasare, C. and R. Medzhitov, Control of B-cell responses by Toll-like receptors. *Nature*, 2005. 438(7066): p. 364-368.
 150. Fillatreau, S. and R.A. Manz, Tolls for B cells. *Eur J Immunol*, 2006. 36(4): p. 798-801.
 151. Bourke, E., et al., The toll-like receptor repertoire of human B lymphocytes: inducible and selective expression of TLR9 and TLR10 in normal and transformed cells. *Blood*, 2003. 102(3): p. 956-963.
 152. Bernasconi, N.L., N. Onai, and A. Lanzavecchia, A role for Toll-like receptors in acquired immunity: up-regulation of TLR9 by BCR triggering in naive B cells and constitutive expression in memory B cells. *Blood*, 2003. 101(11): p. 4500-4504.
 153. Hartmann, G. and A.M. Krieg, Mechanism and function of a newly identified CpG DNA motif in human primary B cells. *J Immunol*, 2000. 164(2): p. 944-953.
 154. Jahrsdorfer, B., et al., CpG DNA increases primary malignant B cell expression of costimulatory molecules and target antigens. *J Leukoc Biol*, 2001. 69(1): p. 81-88.
 155. Ruprecht, C.R. and A. Lanzavecchia, Toll-like receptor stimulation as a third signal required for activation of human naive B cells. *Eur J Immunol*, 2006. 36(4): p. 810-816.
 156. Mosier, D.E., J.J. Mond, and E.A. Goldings, The ontogeny of thymic independent antibody responses in vitro in normal mice and mice with an X-linked B cell defect. *J Immunol*, 1977. 119(6): p. 1874-1878.
 157. Mosier, D.E., et al., Formation of antibody in the newborn mouse: study of T-cell-independent antibody response. *J Infect Dis*, 1977. 136 Suppl: p. S14-19.
 158. Kearney, J.F. and A.R. Lawton, B lymphocyte differentiation induced by lipopolysaccharide. I. Generation of cells synthesizing four major immunoglobulin classes. *J Immunol*, 1975. 115(3): p. 671-676.
 159. Miyake, K., et al., Innate recognition of lipopolysaccharide by Toll-like receptor 4/MD-2 and RP105/MD-1. *J Endotoxin Res*, 2000. 6(5): p. 389-391.
 160. Gronowicz, E. and A. Coutinho, Selective triggering of B cell subpopulations by mitogens. *Eur J Immunol*, 1974. 4(11): p. 771-776.
 161. Constant, S., et al., B lymphocytes can be competent antigen-presenting cells for priming CD4+ T cells to protein antigens in vivo. *J Immunol*, 1995. 155(8): p. 3734-3741.
 162. Rodriguez-Pinto, D. and J. Moreno, B cells can prime naive CD4+ T cells in vivo in the absence of other professional antigen-presenting cells in a CD154-CD40-dependent manner. *Eur J Immunol*, 2005. 35(4): p. 1097-1105.
 163. Batista, F.D. and M.S. Neuberger, B cells extract and present immobilized antigen: implications for affinity discrimination. *Embo J*, 2000. 19(4): p. 513-520.
 164. Guernonprez, P., et al., The rate of dissociation between antibody and antigen determines the efficiency of antibody-mediated antigen presentation to T cells. *J Immunol*, 1998. 161(9): p. 4542-4548.
 165. Lanzavecchia, A., Antigen-specific interaction between T and B cells. *Nature*, 1985. 314(6011): p. 537-539.
 166. Batista, F.D. and M.S. Neuberger, Affinity dependence of the B cell response to antigen: a threshold, a ceiling, and the importance of off-rate. *Immunity*, 1998. 8(6): p. 751-759.
 167. Rivera, A., et al., Role of B cells as antigen-presenting cells in vivo revisited: antigen-specific B cells are essential for T cell expansion in lymph nodes and for systemic T cell responses to low antigen concentrations. *Int Immunol*, 2001. 13(12): p. 1583-1593.
 168. Nashar, T.O. and J.R. Drake, The pathway of antigen uptake and processing dictates MHC class II-mediated B cell survival and activation. *J Immunol*, 2005. 174(3): p. 1306-1316.
 169. Wardemann, H., et al., Predominant autoantibody production by early human B cell precursors. *Science*, 2003. 301(5638): p. 1374-1377.
 170. Nemazee, D.A. and K. Burki, Clonal deletion of B lymphocytes in a transgenic mouse bearing anti-MHC class I antibody genes. *Nature*, 1989. 337(6207): p. 562-566.
 171. Cyster, J.G., S.B. Hartley, and C.C. Goodnow, Competition for follicular niches excludes self-reactive cells from the recirculating B-cell repertoire. *Nature*, 1994. 371(6496): p. 389-395.
 172. Nossal, G.J. and B.L. Pike, Clonal anergy: persistence in tolerant mice of antigen-binding B lymphocytes incapable of responding to antigen or mitogen. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1980. 77(3): p. 1602-1606.
 173. Cyster, J.G. and C.C. Goodnow, Antigen-induced exclusion from follicles and anergy are separate and complementary processes that influence peripheral B cell fate. *Immunity*, 1995. 3(6): p. 691-701.
 174. Rojas, M., C. Hulbert, and J.W. Thomas, Anergy and not clonal ignorance determines the fate of B cells that recognize a physiological autoantigen. *J Immunol*, 2001. 166(5): p. 3194-3200.
 175. Halverson, R., R.M. Torres, and R. Pelanda, Receptor editing is the main mechanism of B cell tolerance

- toward membrane antigens. *Nat Immunol*, 2004. 5(6): p. 645-650.
176. Gay, D., et al., Receptor editing: an approach by autoreactive B cells to escape tolerance. *J Exp Med*, 1993. 177(4): p. 999-1008.
 177. Tiegs, S.L., D.M. Russell, and D. Nemazee, Receptor editing in self-reactive bone marrow B cells. *J Exp Med*, 1993. 177(4): p. 1009-1020.
 178. Radic, M.Z., et al., B lymphocytes may escape tolerance by revising their antigen receptors. *J Exp Med*, 1993. 177(4): p. 1165-1173.
 179. Chen, C., et al., Immunoglobulin heavy chain gene replacement: a mechanism of receptor editing. *Immunity*, 1995. 3(6): p. 747-755.
 180. Hartley, S.B., et al., Elimination of self-reactive B lymphocytes proceeds in two stages: arrested development and cell death. *Cell*, 1993. 72(3): p. 325-335.
 181. Casellas, R., et al., Contribution of receptor editing to the antibody repertoire. *Science*, 2001. 291(5508): p. 1541-1544.
 182. Nikolaisen, C., O.P. Rekvig, and H.C. Nossent, Rheumatoid factor by laser nephelometry and Waaler-Rose assay: prognostic value in patients with recent-onset rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol*, 2005. 34(4): p. 269-276.
 183. Cambridge, G., et al., Circulating levels of B lymphocyte stimulator in patients with rheumatoid arthritis following rituximab treatment: relationships with B cell depletion, circulating antibodies, and clinical relapse. *Arthritis Rheum*, 2006. 54(3): p. 723-732.
 184. Simon, J.A., et al., Anti-nucleosome antibodies in patients with systemic lupus erythematosus of recent onset. Potential utility as a diagnostic tool and disease activity marker. *Rheumatology (Oxford)*, 2004. 43(2): p. 220-224.
 185. Braun, A., et al., Anti-chromatin and anti-C1q antibodies in systemic lupus erythematosus compared to other systemic autoimmune diseases. *Scand J Rheumatol*, 2007. 36(4): p. 291-298.
 186. Sims, G.P., et al., Somatic hypermutation and selection of B cells in thymic germinal centers responding to acetylcholine receptor in myasthenia gravis. *J Immunol*, 2001. 167(4): p. 1935-1944.
 187. Hamidpour, M., et al., The isolation and characterization of antiplatelet antibodies. *Eur J Haematol*, 2006. 76(4): p. 331-338.
 188. Sikorska, A., L. Konopka, and K. Maslanka, The effect of platelet autoantibodies on the course of the disease and clinical response of patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Int J Lab Hematol*, 2008. 30(1): p. 58-64.
 189. Kalled, S.L., et al., Anti-CD40 ligand antibody treatment of SNF1 mice with established nephritis: preservation of kidney function. *J Immunol*, 1998. 160(5): p. 2158-2165.
 190. De Jong, Y.P., et al., Chronic murine colitis is dependent on the CD154/CD40 pathway and can be attenuated by anti-CD154 administration.
 191. Krzysiek, R., et al., Antigen receptor engagement selectively induces macrophage inflammatory protein-1 alpha (MIP-1 alpha) and MIP-1 beta chemokine production in human B cells. *J Immunol*, 1999. 162(8): p. 4455-4463.
 192. Kaser, A., et al., B lymphocyte-derived IL-16 attracts dendritic cells and Th cells. *J Immunol*, 2000. 165(5): p. 2474-2480.
 193. Takemura, S., et al., Lymphoid neogenesis in rheumatoid synovitis. *J Immunol*, 2001. 167(2): p. 1072-1080.
 194. Shi, K., et al., Lymphoid chemokine B cell-attracting chemokine-1 (CXCL13) is expressed in germinal center of ectopic lymphoid follicles within the synovium of chronic arthritis patients. *J Immunol*, 2001. 166(1): p. 650-655.
 195. Groom, J., et al., Association of BAFF/BLyS overexpression and altered B cell differentiation with Sjogren's syndrome. *J Clin Invest*, 2002. 109(1): p. 59-68.
 196. Corcione, A., et al., Recapitulation of B cell differentiation in the central nervous system of patients with multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(30): p. 11064-11069.
 197. Serafini, B., et al., Detection of ectopic B-cell follicles with germinal centers in the meninges of patients with secondary progressive multiple sclerosis. *Brain Pathol*, 2004. 14(2): p. 164-174.
 198. Armengol, M.P., et al., Chemokines determine local lymphopoiesis and a reduction of circulating CXCR4+ T and CCR7 B and T lymphocytes in thyroid autoimmune diseases. *J Immunol*, 2003. 170(12): p. 6320-6328.
 199. Aust, G., et al., The role of CXCR5 and its ligand CXCL13 in the compartmentalization of lymphocytes in thyroids affected by autoimmune thyroid diseases. *Eur J Endocrinol*, 2004. 150(2): p. 225-234.
 200. Peterson, K.S., et al., Characterization of heterogeneity in the molecular pathogenesis of lupus nephritis from transcriptional profiles of laser-captured glomeruli. *J Clin Invest*, 2004. 113(12): p. 1722-1733.
 201. Gonzalez, M., et al., The sequential role of lymphotoxin and B cells in the development of splenic follicles. *J Exp Med*, 1998. 187(7): p. 997-1007.
 202. O'Keefe, T.L., et al., Deficiency in CD22, a B cell-specific inhibitory receptor, is sufficient to predispose to development of high affinity autoantibodies. *J Exp Med*, 1999. 189(8): p. 1307-1313.
 203. Inaoki, M., et al., CD19-regulated signaling thresholds control peripheral tolerance and autoantibody production in B lymphocytes. *J Exp Med*, 1997. 186(11): p. 1923-1931.
 204. Sato, S., et al., Quantitative genetic variation in CD19 expression correlates with autoimmunity. *J Immunol*, 2000. 165(11): p. 6635-6643.
 205. Weintraub, J.P., et al., Immunological and pathological consequences of mutations in both Fas and Fas ligand. *Cell Immunol*, 1998. 186(1): p. 8-17.
 206. Zhang, Y., et al., A pivotal role of cell-bound but not soluble CD4 molecules in full development of lupus-

- like manifestations in MRL-Fas(lprcg)/Fas (lprcg) mice. *Clin Exp Immunol*, 2000. 122(1):p.124-132.
207. Mackay, F and C.R. Mackay, The role of BAFF in B-cell maturation, T-cell activation and autoimmunity. *Trends Immunol*, 2002. 23(3): p. 113-115.
208. Groom, J.R., et al., BAFF and MyD88 signals promote a lupuslike disease independent of T cells. *J Exp Med*, 2007. 204(8): p. 1959-1971.
209. Cheema, G.S., et al., Elevated serum B lymphocyte stimulator levels in patients with systemic immune-based rheumatic diseases. *Arthritis Rheum*, 2001. 44(6): p. 1313-1319.
210. Zhang, J., et al., Cutting edge: a role for B lymphocyte stimulator in systemic lupus erythematosus. *J Immunol*, 2001. 166(1): p. 6-10.
211. Emmerich, F., et al., High-level serum B-cell activating factor and promoter polymorphisms in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol*, 2007. 136(2): p. 309-314.
212. Cambridge, G., et al., Serologic changes following B lymphocyte depletion therapy for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 2003. 48(8): p. 2146-2154.
213. Stasi, R., et al., Variable patterns of response to rituximab treatment in adults with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood*, 2002. 99(10): p. 3872-3873.
214. Leandro, M.J., et al., An open study of B lymphocyte depletion in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, 2002. 46(10): p. 2673-2677.
215. Leandro, M.J., et al., B-cell depletion in the treatment of patients with systemic lupus erythematosus: a longitudinal analysis of 24 patients. *Rheumatology (Oxford)*, 2005. 44(12): p. 1542-1545.
216. Shlomchik, M.J., et al., The role of B cells in lpr/lpr-induced autoimmunity. *J Exp Med*, 1994. 180(4): p. 1295-1306.

12th World Congress on Pain

Escócia, Glasgow
17-22 de Agosto de 2008

6th International Congress on Autoimmunity

Portugal, Porto
10-14 de Setembro 2008

NOVEL THERAPIES IN LUPUS –
FOCUS ON NEPHRITIS

Ana Cristina Cordeiro,* David A Isenberg**

Abstract

Lupus nephritis (LN) is one of the major complications of Systemic Lupus Erythematosus (SLE) and its treatment remains a challenge. Although the classical and widely used immunosuppressive agents have accounted for a significant improvement in the survival and decreased the progression to end-stage renal failure, they lack selectivity for the underlying immune dysregulation. In addition, the toxicity related to their use and the relapses after treatment are of major concern not least because of the adverse effect on the prognosis of the patients with SLE who have kidney involvement. The development of more specific pharmacological agents for patients with SLE is still a major research goal. Ideally these agents should provide a better long-term prognosis for SLE patients and be less toxic.

In this review we summarise the mechanism of action and the results obtained with a variety of drugs that have recently been utilized in the treatment of patients with lupus, especially those with nephritis. We discuss the clinical usefulness of B-cell depletion, principally anti-CD20 antibodies, blockage of co-stimulatory pathways (anti-CD40 ligand antibody, CTLA4Ig), the induction of immune tolerance (LJP 394, peptide specific vaccination) and therapy targeting cytokines (anti-IL10 antibody, BLyS blockage) and the complement system (anti-C5 antibody). Immunoablative doses of Cyclophosphamide (CyC) with or without Haematopoietic Stem Cell Transplantation (HSCT) and the possibilities of gene therapy are also reviewed.

The use of intravenous immunoglobulin (IVIg) and plasmapheresis are not discussed because these treatments have been used in clinical practice for several years.

Keywords: Systemic Lupus Erythematosus; Lupus Nephritis; Treatment.

Resumo

A nefrite lúpica é uma complicação *major* do Lúpus Eritematoso Sistémico (LES) e é ainda considerada um desafio em termos de terapêutica. Os fármacos imunossuppressores disponíveis e largamente utilizados na prática clínica, em contexto de doença renal, permitiram uma melhoria da sobrevida dos doentes e melhoraram o prognóstico do envolvimento renal, diminuindo a taxa de progressão para insuficiência renal crónica terminal. Contudo estes fármacos não são selectivos para o mecanismo subjacente de desregulação imunitária e têm efeitos adversos importantes. Para além disto nem sempre é possível evitar a progressão e/ou a recidiva da nefrite, factos que acrescem para o mau prognóstico da lesão renal. O objectivo da investigação científica actual na área do LES é o desenvolvimento de fármacos mais específicos no que respeita ao mecanismo patogénico da doença, que idealmente sejam menos tóxicos e que permitam melhorar ainda mais a qualidade de vida e o prognóstico a longo prazo destes doentes.

Nesta revisão são resumidos os mecanismos de acção e os resultados clínicos obtidos com uma variedade de fármacos de uso clínico recente ou promissores, mas ainda em fase de ensaio clínico, para o tratamento de doentes com LES, em particular com envolvimento renal. São abordadas várias terapêuticas, entre elas a depleção de células B, nomeadamente o anticorpo anti-CD20, o bloqueio de vias de co-estimulação (anticorpo anti-CD40 ligando, CTLA4Ig), a indução de tolerância (LJP 394, vacinação com péptidos específicos), terapêuticas anti-citocinas (anticorpo anti-IL10, anticorpo anti-BLyS) e a interferência na via do complemento (anticorpo anti-C5). São ainda referidas as terapêuticas de dose imunoneoblata de ciclofosfamida com ou sem transplante de células hematopoéticas e a terapia génica.

A plasmaferese e a administração de imunoglobulina humana endovenosa não são abordadas pelo facto de serem terapêuticas já usadas há vários anos na prática clínica.

*Serviço de Reumatologia do Hospital Garcia de Orta, Almada

**Centre for Rheumatology Research. University College of London

Palavras-Chave: Lúpus Eritematoso Sistémico; Nefrite; Tratamento.

Introduction

Systemic Lupus Erythematosus (SLE) is an autoimmune rheumatic disease of unknown aetiology with multi-organ involvement. Renal involvement is considered a major problem concerning SLE patients interfering in their long term prognosis and survival. Despite the availability of a variety of immunosuppressive agents for over thirty years the continuing increased morbidity and mortality observed in patients with lupus remains a challenge.

Cyclophosphamide has been classically considered standard therapy for more aggressive lupus nephritis but recently mycophenolate is assuming a leading role as first line therapy for kidney involvement. Nevertheless, we are still in need of specific drugs that act in the several steps of the immune dysregulation leading to the physiopathology of this disease.

The major immunological features of lupus comprise a loss of self tolerance to autoantigens, the presence of autoreactive B and T cells, with polyclonal activation of B-cells and the consequent production of autoantibodies by plasma cells and release of cytokines.¹ Anti-double stranded DNA antibodies (anti-dsDNA) are probably the most pathogenic type of antibody (Ab) produced. Other antibodies which bind to nucleosomes, laminin and collagen type IV are also participants in the induction organ lesion, including nephritis.¹⁻³ The formation of immune complexes, the activation of the complement pathway and the defective clearance of immune complexes are also likely to play an important part in disease pathogenicity.

Although much is known about the consequences of the immune dysregulation, the full range of disease triggers remains to be discovered. It seems likely that infection and ultra-violet radiation are two such triggers. This review will focus on the recent developments in the treatment of lupus nephritis, with brief descriptions of the basic immunology to help understand the underlying mechanisms of action of these therapeutic agents.

A. B cell interaction Drugs

B Cell Depletion

CD20 is a specific surface marker for B lympho-

Resume of Potential Therapeutical Targets in SLE

Potential Target	Potential Therapeutical drugs
B lymphocytes	Anti- CD20: rituximab Anti-CD22: epratuzumab
Anti-dsDNA	LJP 394: abetimus sodium
Co-stimulation CD40-CD154	Anti-CD40 ligand
B7 pathway	CTLA4-Ig
B lymphocyte stimulator	Anti-BLyS: belimumab
IL 10	Anti-IL10
Complement pathway	Anti-C5
TNF α	Anti-TNF α : infliximab
Immune Complexes	Anti-human DNase
Cytokines	Interferon Anti-IL-6 Anti-IL1
MCP-I	Bindarit
Platelet Activating factor	Flaxseed oil

BLyS: B Lymphocyte Stimulator; IL-Interleukin; TNF α : Tumor Necrosis Factor α ; MCP-I: Monocyte Chemoattractant Protein I

cytes⁴⁻⁶ without a known natural ligand,⁵ which is expressed on B cells from pre-lymphocyte stage to mature stage, but not on haematopoietic stem cells surface and which is lost during B-cell differentiation into plasma cells.⁶⁻⁸ The aim in depleting B cells is to diminish their differentiation into plasma cells and therefore decrease the production of autoantibodies.⁶

Selective B-lymphocyte depletion can be accomplished by Rituximab, a genetically engineered chimeric mouse/human monoclonal antibody (mAb) to CD20 (Anti-CD20),^{4,5,8,9} that comprises the variable regions of a murine anti-human CD20 B cell hybridoma fused to human IgG and k constant regions⁵ and in which about 25% is murine in origin. Rituximab is approved for the treatment of non-Hodgkin's B cell lymphoma as it depletes malignant B cells.^{4,5} The drug is now already approved for patients with rheumatoid arthritis refractory to anti-TNF drugs,¹⁰ and has also been used as «off-label» in patients with autoimmune haemolytic anaemia, autoimmune neuropathies, systemic vasculitis and inflammatory myopathies.

Clearance of B cells is mediated through complement activity, Ab dependent cellular cytotoxicity⁵ and apoptosis.⁹ The treatment with this anti-CD20 mAb does not affect existing plasma cells or

haematopoietic stem cells. B lymphocytes become undetectable in peripheral blood,⁶ whereas its effectiveness in depleting B cells in lymph nodes is not fully established.⁵ The sequential combined treatment of rituximab with cyclophosphamide (CyC) is thought to increase the effectiveness of rituximab and is thought to make B cells more susceptible to lysis, thus achieving a higher level of depletion.⁶

In an open study, 6 patients with SLE, previously refractory to standard immunotherapy, were treated with B cell depletion. Three of them had renal involvement (WHO Class IV).⁶ The treatment schedule consisted of sequential intravenous (iv) infusions of 500mg (600-700mg/m²) of rituximab and 750mg of CyC the day after, in combination with high dose steroids. This combination was given twice, two weeks apart.⁶ All patients stopped further immunosuppression thereafter but were allowed to continue on hydroxychloroquine and oral prednisolone (around 10mg/day). Another report from the same centre¹¹ documented the treatment of 6 SLE patients with nephritis (5 patients with WHO Class IV and 1 with WHO Class V) using this therapy. The given dose of rituximab was higher (1000mg) but the protocol was otherwise the same. All patients improved, with a major improvement in four. These initial reports were very optimistic regarding renal improvement, allowing a decrease in steroid doses, with B cell depletion ranging from 3 to 6 months, but with a clear more extended clinical benefit.

Later reports from this centre¹² included 24 refractory SLE patients. These patients were retreated with new cycles of anti-CD20 after a clinical relapse. There was a significant improvement in mean BILAG (British Isles Lupus Assessment Group) activity with an increased mean duration of response (13 months). Consistent data in these publications is that the clinical benefit of the drug extends beyond the period of B lymphocyte depletion.^{5,6,12}

In terms of serological markers, complement levels tend to increase, but anti-dsDNA titres vary among patients treated with anti-CD20, but tending towards a decrease.⁶ These results are reinforced by direct analysis of data concerning auto-antibody levels after B cell depletion therapy.¹² There is a statistical significant decrease in autoantibody levels in patients who respond to this therapy, and especially in those patients who obtain a more sustained response,¹² although it does not occur im-

mediately after B cell depletion. Serum Ig levels usually remain within the normal range with but they change frequently; in generally antimicrobial antibodies remain within the normal range.^{6,12,13}

Beside the importance of clinical and serological evidence for the use of anti-CD20 in lupus nephritis there are also renal biopsy data that further supports its efficacy, despite the small number of patients included.^{14,15}

The number of case reports of patients with SLE treated with rituximab is continuously increasing, although most have refractory disease, not all patients have renal involvement. Two more recent publications enrolling SLE patients with active nephritis, one with patients refractory to conventional treatment regimens and the other including patients naïve to previous immunosuppressive drugs also confirmed the potential therapeutic effect of rituximab in treating such difficult SLE patients.¹⁶⁻¹⁷

A case report of a patient with membranous nephritis treated with 2 infusions of 375mg/m² of rituximab, one week apart, resulted in decreased proteinuria and anti-dsDNA titres, with gradual normalisation of serum albumin and complement levels.⁹

The use of rituximab in renal disease has also been studied in seven patients with idiopathic membranous glomerulonephritis.¹⁸ The authors report that the use of 4 weekly infusions of 375mg/m² of rituximab (with a 20 week follow-up), resulted in decreased proteinuria and serum cholesterol levels with an increase in serum albumin levels.

The persistence of detectable serum autoantibodies titres is likely to be due to the presence of long-lived auto-reactive plasma cells, which are not targeted by this therapy, or due to the persistence of low levels of auto-reactive memory B cells.¹⁹ The lack of effect on plasma cells might also explain the fact that immunoglobulin (Ig) levels are little changed.⁵ An increase in anti-dsDNA titres in SLE patients preceded a clinical relapse. The observation of maintenance of total Ig levels and anti-bacterial antibody levels in a cohort of patients with rheumatoid arthritis treated with B cell depletion⁸ may help explain the low incidence for opportunistic infections seen in patients treated with this CD20mAb.^{5,6}

Rituximab is well tolerated by patients.^{5,6,11,12,18} Reported side effects were either self-limited or responded well to conventional therapy.⁶ Most pa-

tients relapse eventually and need to be retreated, probably because the regimens are not potent enough. The optimal dose, frequency of administration and adjuvant immunosuppressive therapy remain uncertain.^{6,11} Also remains to be clearly defined when to re-treat SLE patients treated with anti-CD20 and for how long. Large randomised controlled studies are awaited to address these unanswered questions. Until then, most centres tend to use the «twice fortnight» regimen of 1000mg rituximab iv plus 100mg of methylprednisolone followed, or not, in the next day by iv CyC.

The occurrence of human anti-chimeric antibodies (HACA) is generally low but may be increased in patients with lupus.^{5,6} Nevertheless HACA may account for serious adverse reactions and lack of effectiveness.^{5,6} To overcome this more fully humanised forms of anti-CD20 mAb are now under current development. One has already been used in a patient with very severe lupus who developed a HACA response to Rituximab.²⁰

The use of anti-CD20 in SLE is still considered off label, usually reserved for patients with severe manifestations, unresponsive to standard therapy, situation certainly restricted to a minority of SLE patients.

Anti-CD22 Monoclonal Antibody

CD22 is another surface marker in B cells consisting is a type I transmembrane glycoprotein which is expressed from pre-lymphocyte stage to mature stage, but absent in plasma cells.^{11,12} CD22 function is not yet fully understood but interferes in signalling transduction delivering intracellular signals that modulate B cell response,¹³ interaction with T cells^{22,23} and acts as a homing receptor for re-circulating B cells.²¹ CD22 dysregulation might increase B cell activation and autoantibody production²¹ as it acts as a negative signal for B lymphocyte stimulation.

Epratuzumab is an almost fully humanized IgG1 monoclonal antibody against CD22.²² Its mode of action seems to be through modulation of the B cell receptor (BCR) and also by depletion of circulating B cells, the latest although, at a minor scale compared to Rituximab.²¹ Epratuzumab was initially developed for the treatment of non Hodgkin's lymphoma and is actually been studied in Primary Sjögren Syndrome²¹ and SLE.²²

In a SLE phase II clinical trial, Epratuzumab was administrated to 14 patients through 4 infusions of 360mg/m² every other week.²² Patients were assessed

using the BILAG score. Their clinical manifestations were very broad moderately active, but none had renal involvement. Clinical response equal or above 50% was observed in 77% of the patients.

Serological changes in biological markers with this anti-CD22 are not remarkable and the fall in circulating B cells is usually modest.²³ These results were also confirmed in this SLE trial with no change in biological markers and achieving a 35% fall in B cells persisting for 6 months.²¹

The combination of Epratuzumab with Rituximab would seem appraising in the setting of SLE due to their complementary mode of action. This association was assessed in a trial with patients with relapsed or refractory non-Hodgkin's lymphoma, but it failed to demonstrate an increase in overall clinical response compared to Rituximab alone, but might lead to a higher number of complete or persistent responders.²⁴

Described side effects with Epratuzumab are mild to moderate and mostly related to the infusion.²¹ The HACA response is uncommonly described^{22,23} probably due to the fact that this chimeric antibody has a very small murine component.

There is still much to be answered regarding the efficacy of this agent in more serious SLE manifestations and so there are now ongoing multicenter randomized phase III trials with Epratuzumab in SLE.

B Cell Toleragen LJP-394

LJP-394 or abetimus sodium, is a synthetic biological agent which consists of a four double stranded oligonucleotides attached to a non immunogenic polyethylene glycol platform.^{1,3,4} It lacks T cell epitopes and its mechanism of action is believed to be through cross-linking anti-dsDNA molecules on the surface of B-lymphocytes.³ This interaction with the B cell receptors inhibits the signal transduction to T cells and terminates B cell response, leading to anergy or apoptosis.^{1,3,25-27} It is thus regarded as a B cell toleragen. Consequently there is a reduction in the antibody production.^{3,18} LJP-394 is said to induce tolerance on B cells by immune modulation^{1,4,26,27} and the complex of LJP-394 and anti-DNA antibody forms small soluble complexes, thought to be rapidly cleared,^{26,27} without activation of the complement pathway.³

When tested in an animal model of the lupus (the BXSB mouse), LJP-394 decreased antibody production, improved renal histology and renal

function with increased survival^{26,27} in a dose-dependent way.

The initial reports of LJP-394 in humans demonstrated a rapid and sustained reduction in anti-dsDNA titres but did not prevent renal flares.^{4,27} Complement levels were not significantly altered after treatment and the measurements of immune complexes remained constant.²⁶ Following studies with multi-dosage schedules reported that 50mg, given intravenously every week, was the most effective dose for decreasing anti-DNA antibody titres, but changes in C₃ values were variable.²⁷

In a recent multicenter phase II/III, double blind and placebo controlled clinical trial, 230 patients with SLE and lupus nephritis (WHO class III, IV and V) were treated with LJP-394.³ The primary end point was the time to a documented renal flare and secondary outcome measures included the number of renal flares and time to institution of high dose corticosteroid and/or immunosuppressive therapy.³ The schedule treatment consisted of 16 weekly intravenous doses of 100mg of LJP-394 or placebo, followed by alternating an 8 week drug holiday with a subsequent 12 week treatment but with 50mg of LJP-394 or placebo with an expected follow-up of 76 weeks.²⁷ Unfortunately the study was prematurely discontinued after an interim analysis suggested that there was unlikely to be a statistical difference between the two groups in terms of time to renal flare.³ In fact, the time to renal flare and the number of renal flares were not significantly different between the placebo and the active drug study arms. Nevertheless LJP-394 did improve the time and need to institute high-dose corticosteroid and/or immunosuppressive agents.^{3,26} In the LJP-394 treated group anti-dsDNA antibody titres decreased compared to baseline values with an inverse tendency for C₃ levels. Among the patients with the worse values of renal function (creatinine=1.5mg/dL), those in the LJP-394 group had 50% fewer renal flares compared to patients receiving placebo.³

A sub-group analysis depending on LJP-394 affinity antibodies showed very interesting results. Patients with high affinity of their serum IgG fraction of the DNA epitope of LJP-394 had a significant reduction in the number of renal flares, with prolonged time to renal flare, and this group needed fewer treatments with immunosuppressive therapy or high dose steroids comparatively to placebo.³

The 100mg weekly schedule seemed to be more

effective than the 50 mg dose and the latest trials with this agent are now pushing the dose up to 900 mg per week.³

LJP-394 was well tolerated without apparent cumulative dose-dependent side effects.²⁷ Some of adverse events were related to SLE or could not be attributed to the studied drug. In fact most side effects were mild to moderate and with a frequency comparable to placebo.^{3,27} Actually abetimus sodium (LJP-394) may be considered in the treatment of lupus nephritis, but with no particular placement in the standard therapeutic sequence used in this clinical manifestation.¹⁹

BLyS Blockage

The B-lymphocyte Stimulator (BLyS) also known as BAFF, THANK, TALL-1 or zTNF4, is a member of TNF super-family, which stimulates immunoglobulin (Ig) production by binding to specific receptors. BLyS is important for B cell development, maturation and survival.³⁰⁻³² It is expressed in macrophages, dendritic cells and activated T cells⁴ and BLyS levels were found to be elevated in serum of patients with lupus.^{4,30,31,33} BLyS receptors are named BAFF-R, TACI (transmembrane activator and calcium modulator ligand interactor) and BMCA (B cell maturation Ag).³⁴ BLyS antagonism can be accomplished by administration of a soluble form of any of the three mentioned receptors, and both BAFF-R and TACI-Ig have been reported to delay the onset of SLE in murine models.³⁴

LymphoStat B (belimumab) is a fully human monoclonal antibody which inhibits soluble BLyS.^{4,35} A placebo controlled phase I trial in SLE patients was designed to assess safety and pharmacokinetics of multiple escalating doses of LymphoStat, given intravenously (iv).³⁵ There were no changes in SLE activity but anti-dsDNA antibody levels decreased. The drug was well tolerated at all doses given (maximum 20mg/Kg). Side effects reported were similar to those in the placebo group with no increased incidence of infections.³⁵

Another approach in this setting is Atacicept, a TACI-Ig fusion protein that inhibits B cell stimulation by binding to B lymphocyte stimulator and a proliferation-inducing ligand. The published phase Ib, double-blind, placebo-controlled, dose-escalating trial used subcutaneous Atacicept versus placebo.³⁶ Dose dependent reductions in immunoglobulin levels and in mature and total B cell numbers could be demonstrated.³⁶ There were no changes in the numbers of T cells, natural killer

cells, or monocytes. Mild injection-site reactions occurred more frequently among the Atacicept group than the placebo group.³⁶

Although not in current use the BLyS blockage pathway is still expected to be a promising therapeutic target in SLE.

B. Drugs interfering in Co-Stimulation Pathways between B and T cells

Anti-CD40 Ligand Antibody

Activation and differentiation of B cells to antibody producing cells (plasma cells) triggered by antigen usually requires T helper cells (T_H 2 class).⁷ B cells express on their surface the complex antigen-MHC II (Major Histocompatibility Complex Class II) that will be recognised by «armed» T_H cells.⁷ This «first signal» is, however, not enough to activate B-cells, needing a «co-stimulatory second signal». This second signal is provided by soluble effectors and membrane-bound molecules, the latter being the interaction between CD40 on B cells and CD40 ligand (CD40L or CD154 or gp39) on T cells, which will activate B cells to differentiate and begin clonal proliferation.^{1,7,37-39}

CD40L is overexpressed in T_H cells of patients with active SLE^{1,37,38} and therefore interference with this signal pathway may inhibit autoantibody production and immune complexes formation and deposition.¹ Following encouraging results in murine models with nephritis, two different humanised anti-CD40L mAb were developed – IDEC-131 and GB9588 (hu5c8).

There were 3 trials with anti-CD40L mAb IDEC-131, enrolling in global 110 lupus patients, although not all had with nephritis^{1,37,38} and one with GB9588 which included 28 patients with active proliferative lupus nephritis.⁴⁰ In summary the results failed to demonstrate significant drug benefit compared to placebo in terms of time to renal flare, SLE activity index (SLEDAI) and serologic markers (complement and anti-DNA Ab).³⁹

The study with BG9588 was prematurely terminated due to the increased occurrence of thromboembolic events despite concurrent prophylactic anticoagulation.⁴⁰ Thromboembolic events were also reported in other studies with the same antibody and in animals using a non-humanised version of the antibody.⁴¹ IDEC-131 did not have definitive thromboembolic complications reported.³⁹

Studies regarding these monoclonal antibodies are not ongoing as far as we know.

CTLA4-Ig

As described above, the ligation of the complex peptide-MHC II can activate T_H cells already armed to proliferate, but not naïve T cells.⁷ Clonal expansion of naïve T cells also needs a co-stimulatory signal (also named second signal) that has to be provided by the Antigen Presenting Cell (APC) expressing the antigen.⁷ This signal is accomplished by the B7 molecules (B7.1 and B7.2) on APC surface that bind to CD28 on T cell surface.⁷ Expression of B7 molecules is stimulated by CD40-CD40L interaction.¹ The ligation CD28-B7 stimulates T cell growth and cytokine production.¹

In naïve T cell, CD28 is the only receptor for the B7 molecules but, once they become activated, they will express an additional receptor designated CTLA4 (CD152). CTLA4 is similar (homologue) to CD28 and binds B7 molecules with much higher avidity, developing an inhibitory signal to the activated T cells, rendering them less sensitive to stimulation by APC, an essential function to limit proliferative responses of activated T cells.^{1,7}

Murine CTLA4-Ig is a fusion protein encoding regions of the extracellular domain of CTLA4 and the Fc portion of an IgG molecule¹ that functions as a soluble receptor for B7 molecules.⁴² It is expected to block the co-stimulatory signal between CD28 and B7 molecules and inhibit T cell activation and thus T cell dependent antibody production.^{1,43} In mice, CTLA4-Ig decreased antibody production, proteinuria and mortality.^{1,42,43} When combined with cyclophosphamide had an enhanced beneficial effect in murine nephritis.^{42,43} In the same way its combination with anti-CD40L mAb increased mice survival by 70% compared to either agent alone.⁴²

This agent was assessed in clinical trials enrolling patients with rheumatoid arthritis for which is now approved.⁴⁴ Studies with patients with SLE are currently being planned.

C. Drugs targeting Cytokines

Anti-IL 10 Monoclonal Antibody

Interleukin 10 (IL-10) inhibits T_H 1 cells^{45,46} and macrophage activation^{2,7} but activates B lymphocytes, their differentiation and IgG production.^{2,7,47} In patients with SLE IL-10 is overproduced^{45,47} with se-

rum levels correlating with disease activity.^{2,4,42,46} Studies performed in SLE mice models using an anti-IL10 mAb demonstrated delay in the onset of nephritis, with decreased production of anti-DNA antibodies.^{2,4,45,47}

In a pilot study, 6 steroid dependent patients with lupus, were treated with a murine anti-IL10 mAb, given intravenously (20mg/day for 21 consecutive days).⁴⁶ All patients continued immunosuppressive therapy. The treatment achieved stable plasma concentrations of the monoclonal antibody capable of inhibiting endogenous IL-10 production. It was safe and well tolerated, with chills during infusion being the only adverse effect reported. Only one patient had renal involvement documented as membranous glomerulonephritis. In this patient the authors reported a decrease in proteinuria and maintenance of stable normal creatinine levels during a 6 month follow-up. There were no significant changes in complement or lymphocyte count and anti-DNA antibody titres decreased in only one patient. The fact that the monoclonal antibody used is murine and that repeated administrations might be required, causes concerns about the formation of human anti-mouse antibodies (HAMA).⁴⁶

TNF α blockage

Tumor Necrosis Factor α (TNF α) is a cytokine produced by T cells with two transmembrane receptors, p55 and p75. TNF α is involved in acute-phase response to infection and immunological stimuli, interfering with growth, differentiation and death of several cell types.^{7,32} It has thus a pro-inflammatory activity as well as a protective function regarding the development of autoimmunity.³² Blockage of this cytokine, with subsequent decrease in TNF expression, might increase susceptibility to autoimmune diseases and has been implicated in the induction of anti-DNA antibody production and lupus-like syndromes.^{2,7,32} However, its role is not yet fully understood as there are increased levels of TNF α levels in the serum of patients with SLE with systemic manifestations but even more interesting is that this cytokine is also increased in kidney biopsies with glomerulonephritis.^{48,49}

As inferred from animal models, it seems that TNF α is required in the early stages of disease to suppress systemic autoimmunity, whereas its later presence may help the development of renal pathology by mediating tissue destruction.³² In TNF α

deficient mice, glomerular deposits are present but without the development of glomerulonephritis and this may be explained by the absence of the pro-inflammatory activity of TNF α and can be related to different functions of the two receptor. Studies in mice deficient for the p55 receptor with full function of the p75 receptor showed suppressed inflammatory activity without development of autoimmunity.³²

Evidence for a beneficial role for anti-TNF α therapy in SLE patients is still limited. There are some clinical case reports and small open label trials.^{50,51} In an open safety study, six patients with SLE (4 with nephritis) were treated with infliximab (a chimeric monoclonal antibody to TNF α) in addition to other immunosuppressives and steroids.⁴⁸ There was a significant and sustained reduction in proteinuria with stable creatinine levels at six months. The improvement in articular manifestations was more transient with relapses after discontinuation of treatment. There was no change reported in complement levels whereas antibody titres to DNA increased but without a documented clinical flare. Another report about TNF α blockage in SLE included 9 patients with polyarthritis.⁵² In a third of them the articular symptoms improved but with no significant improvement of the disease in overall. Two thirds of patients experienced frequent, and some cases severe infusion reactions.

Beside these open label studies and case reports there is still much to learn about TNF α blockage in SLE to safely use it in clinical daily practice.

Modulation of the interferon system cytokines

Interferon (IFN) α and β are cytokines that have regulatory effects in the immune response⁵³ and contribute to host defences against viral infections, by increasing MHC class I expression.⁷ They are thought to participate in SLE pathogenesis by activation and prolongation of autoantibody producing B cells survival.⁵³ In fact, patients with SLE have higher IFN α production and serum levels, which correlate with both disease activity and severity.⁵⁴ Animal studies in IFN $\alpha\beta$ -depleted mice revealed a significant reduction in the production of autoantibodies, anti-DNA antibodies, with a reduced prevalence of haemolytic anaemia, kidney involvement and mortality.⁵³

IFN γ is produced by activated NK cell and by effector T cells after the induction of the adaptative immune responses.⁷ It also promotes the production of complement-fixing antibodies and enhan-

ces pathogenic activities of macrophages and promotes inflammation in target tissues.² In patients with SLE the levels of IFN γ are increased and the administration of this cytokine in animal models exacerbates or precipitates the disease.^{2,25} In contrast, the administration of a monoclonal antibody to IFN γ or its neutralization through an engineered soluble receptor (IFN γ R/IgG-Fc) in mice models of lupus, was shown to ameliorate the disease with no direct toxicity or adverse events.^{2,25}

Other potential target cytokines

Continuing the research for new molecular targets, other cytokines are being investigated. High serum levels of IL-6 are found in SLE patients and the administration of a recombinant IL-6 to BWF1 mice was shown to accelerate glomerulonephritis and increase the expression of glomerular intercellular adhesion molecules. The treatment with an IL-6 mAb reduced proteinuria and prolonged mice survival.² In patients with SLE there is also an increased production of IL-1. Recombinant IL-1 administered in mice models increased nephritis and when the mice were given a recombinant receptor (IL-1R) type I there was a decrease in the production of autoantibody and delayed onset of nephritis.²

D. Other targeted therapies

Anti - C5 Monoclonal Antibody

The complement system is activated in patients with SLE following immune complex deposition and it amplifies the immune and inflammatory responses, contributing to the renal disease pathogenicity and tissue damage.^{4,25,42,55,56} Both complement pathways are activated converging at C₅.^{7,42} A monoclonal antibody to the C₅ component of the complement system (anti-C₅ mAb) inhibits the cleavage of C₅ to C_{5a} and C_{5b} and blocks the following formation of the late membrane attack complex (MAC), designated C_{5b-9}. These are all potent pro-inflammatory factors.^{7,45,55} It does not interfere with the formation of C_{3b}, which is responsible for the opsonization of pathogens and immune complexes clearance.^{7,45,55}

In studies of lupus mice models the chimeric anti-C₅ mAb (BB5.1), given intraperitoneally, has been shown to delay the onset of proteinuria, improve renal histology and survival when compared to control mice.^{4,42,45,55} There was no change in the

pattern of anti-DNA antibody production.⁵⁵ In one study combining anti-C₅ mAb and anti-IL 10 mAb therapy suggested a synergistic beneficial effect in renal disease.⁴⁵

Development of humanized mAb (5G1.1) has also been shown to be effective in interfering with the complement pathway.⁵⁶ Phase I human trials have demonstrated that anti-C₅ mAbs safe and well tolerated in doses up to 8mg/Kg.⁴²

Human DNase

DNase is an enzyme normally produced by the pancreas and salivary glands that catalysis the hydrolysis of excessive extracellular DNA.⁵⁷ In a randomised, double blind, placebo-controlled trial, 16 patients with lupus nephritis (Class III, IV and V) were given treatment with a recombinant human DNase (rhDNase) for 40 days. The underlying hypothesis was that it might prevent glomerular deposition of immune complexes containing DNA and promote their clearance from the affected tissues.^{25,57} This hypothesis was supported by previous evidence in mouse models in which a murine DNase had shown a reduction in proteinuria and serum creatinine with an improvement in renal histology.⁵⁷ No clinical efficacy was demonstrated but the treatment was safe, well tolerated and without production of antibodies to rhDNase. New trials with higher doses and other treatment schedules might achieve better results.⁵⁷

Peptide specific vaccination

Immunization with artificial peptides, based on stimulatory sequences of Ig molecules, is aimed to induce immune tolerance through reduction in autoantibody production,²⁵ immune complex formation and their deposition on target organs.^{4,43}

Construction of an artificial peptide, based on amino acid sequences from the V_H (variable region of the heavy chain) region of murine anti-DNA (IgG) antibody was administered to lupus-prone mice in a placebo controlled study. This consensus peptide prolonged mice survival and delayed the onset of nephritis.⁵⁸ Total serum levels of Ig and IgG antibodies to DNA and nucleosomes were reduced but the immune response to exogenous antigens was not impaired. Subcutaneous administration of nucleosomal histone peptides (H₄₁₆₋₃₉, H₄₂₂₋₄₂) to lupus-prone mice prolong lifespan by generating CD4+25+ and CD8+ regulatory T cells and resulted in decreased proteinuria and antibody formation as well as increased survival.⁵⁹

Gene Therapy

Gene therapy for patients with SLE is still in very early stages of development. The goal of this new therapeutic approach is to overcome some difficulties encountered with cytokine therapy, particularly the need for repeated administration, the use of high doses for adequate tissue concentration, and the potential occurrence of neutralizing immune responses with the anti-cytokines antibodies administrated to the recipient.²

The system for gene delivery is still a major concern, but attempts include the use of viral vectors and naked DNA encoding cytokines.^{2,42} It is unclear exactly how cytokines interfere and mediate the immunologic pathways and in which concentration they have stimulatory or inhibitory effects. The literature sometimes describes contradictory results, depending also on the delivery system used. Even with a long path to go until these forms of treatment has shown interesting results in mice SLE models.

TGF β and IFN γ R/IgG gene therapies through plasmid DNA vectors have been reported to decrease total Ig antibody titres, reduce kidney disease and increase survival in murine lupus.² Anti-monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) gene therapy in mice reduced monocyte infiltration in the glomeruli and protected the kidney from crescent formation and vasculitis.⁶⁰

Aiming to block BLyS activity using a dimeric form of its receptor TACI or BR3 an adenovirus expressing a fully murine TACI-Ig or BR3-Ig fusion proteins was constructed. Its administration to mice delayed proteinuria onset and development of high titres of IgG and anti-DNA antibodies, with increased survival.³⁰ The administration of a CTLA₄-Ig through a recombinant adenovirus vector containing the CTLA₄-Ig gene resulted in significant suppression of lupus-prone mice nephritis.² Combined treatment of either receptor (TACI-Ig ou BR3-Ig) with CTLA₄-Ig also delayed the onset of lupus disease in mice but did not prevent it.³¹

Enhancing *fas* ligand expression through genetic modification of macrophages has produced encouraging results in a murine model of SLE, by increased apoptosis of auto-reactive T cells.⁴² However, abnormalities in the *fas* system are not a feature of 'classical' human lupus.

Vaccination of mice with a plasmid vector containing an epitope of cytotoxic T lymphocyte conjugated with CpG-ODN (synthetic oligodeoxynucleotides containing unmethylated cytidine-

phosphate-guanosine dinucleotides) inhibited anti-DNA production and retarded the onset of nephritis.⁶¹

Bindarit

The Monocyte Chemoattractant protein-1 (MCP-1) activates macrophages and promotes T_H2 immunity.⁷ In SLE patients with nephritis it contributes to the recruitment of monocytes into the glomeruli⁶⁰ and its urinary levels are increased in these patients compared to normal individuals.¹ Bindarit is an indazolic derivate without immunosuppressive effects that is able to inhibit MCP-1 expression and inhibit human mesangial cell expression after exposure to certain cytokines.¹ It was shown to delay the onset and progression of proteinuria, reduce glomerular and interstitial inflammation and prolong survival in animal models. It reduced proteinuria in seven patients with SLE and proliferative glomerulonephritis.¹

Flaxseed Oil

Flaxseed oil is rich in lignans, a potent Platelet Activating Factor (PAF) receptor antagonist. PAF reduces renal flow and glomerular filtration and promotes proteinuria.¹ Nine patients with SLE and proliferative lupus nephritis treated with flaxseed oil demonstrated improvement in creatinine clearance and a reduction of proteinuria.¹

E. Stem cell transplant and immunoablation therapy

Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation

The reason for hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in association with high dose immunosuppression in autoimmune diseases is to try to reset the immune system and achieve self tolerance by eliminating auto-reactive clones.^{1,2,62} It has been tried in cases of serious and refractory cases of autoimmune diseases, including about 40 patients with SLE.^{1,62,63}

The failure and toxicity of HSCT reported in several is related to the severity of the underlying disease^{63,64} and to the inclusion of patients with end stage organ failure, who are much less likely to improve. Mortality rate is still about 11 to 13% and therefore patient selection is very important.^{62,63} In general, patients should have a refractory, progressive and active disease. They should have failed

conventional immunosuppression for at least 3 months,⁶⁴ some authors suggesting 3 iv CyC cycles over the previous 6 months,⁶² and requiring high doses of corticosteroids (0.5mg/Kg or iv methylprednisolone) and/or high doses of other immunosuppressives to maintain disease control.^{62,64}

Mobilizing regimens with 2g/m² of CyC and granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) and conditioning regimens with 200mg/Kg of CyC, 90mg/Kg of anti-thymocyte globulin (ATG) and G-CSF are generally described,^{63,65} but failure and success have been reported with all regimens.⁶³ Most patients improve and clinical remission can be obtained for as long as 3 years.^{63,65} Nevertheless, relapses do occur but, in general, with restored responsiveness to low immunosuppression and/or to agents that patients were previously refractory.

A recent study described the results of HSCT in 15 patients with refractory SLE, followed up for a median of 36 months (range from 2 to 66 months).⁶⁵ All patients had failed previous therapy with CyC and were steroid dependent. All of them improved gradually, with no reported deaths. Eight patients had kidney involvement (5 with active WHO class III, 1 patient with active class II and 2 patients with remitting class III). Creatinine clearance improved in 4 patients, stabilised in 2 and deteriorated in 1. Almost all patients with renal involvement had post transplant complications, more serious than patients without kidney disease did. The mean time to achieve neutrophil count over 0.5×10^9 was 8 days and to platelet independence was 10 days.⁶⁵ SLEDAI scores decreased, anti-dsDNA titres normalized, complement normalized in all patients and remained within normal values in 13.⁶⁵ A rise in antibody titres preceded a clinical relapse.^{63,65} Twelve patients had a follow-up above one year and ten of them discontinued previous immunosuppression. The other two patients relapsed at 30 and 40 months after transplantation.

In the published literature using HSCT, the complications included fungal infections, septicemia, bleeding, febrile neutropenia, fluid retention needing hemodialysis, dermatomal zoster, pulmonary oedema and infiltrates requiring transient mechanical ventilation, *Pneumocystis carinii* pneumonia and *Clostridium difficile* diarrhea.^{63,65}

HSCT is available and a feasible option for treating refractory lupus patients. Certainly is not a cure but allows patients to achieve disease remission and/or long periods without corticosteroid therapy.^{65,66} There are still concerns about potential

late oncogenicity and the only centres with extensive experience of this procedure are advised to consider this therapeutic option.

Immunoablation with High dose Cyclophosphamide

High-dose cyclophosphamide (CyC) without stem cell transplantation has recently been tried as an alternative to conventional HSCT to avoid re-infusion of auto-reactive cells.⁶⁷ Cyclophosphamide is not myeloablative because stem cells express high levels of aldehyde dehydrogenase, thought to be responsible for cellular resistance to CyC. This enzyme is expressed at low levels in lymphocytes and natural killer cells, making them sensitive to CyC action.^{64,67}

Fourteen patients with SLE refractory to more than one immunosuppressive (not all had previously been treated with CyC) were treated with high dose CyC of 50mg/Kg for 4 consecutive days (total 200mg/Kg) followed by 5µg/Kg of G-CSF until the neutrophil count was 1×10^9 for 2 consecutive days.⁶⁷ The median time, after the last CyC dose, to achieve a neutrophil count of 0.5×10^9 were 14 days with median of 16 days to the last needed platelet transfusion. Five patients had complete remission of their disease, six had a partial response allowing disease control with lower immunosuppression and 3 patients did not respond. Nine of the 14 patients had renal disease (glomerulonephritis WHO class IV and V) obtaining 4 complete responses, 3 partial responses and two patients were unchanged. There were no deaths, fungal infections or premature ovarian failures reported and the treatment was well tolerated.

This approach seems therefore an alternative for refractory SLE cases but long-term follow up is awaited.

Conclusion

The treatment of lupus nephritis is one of the most challenging in the management of patients with SLE. There are now several new agents under current development that might contribute to a better outcome for patients with aggressive disease. Despite an in-depth knowledge of their underlying mechanism of action and encouraging results in mouse models, some of these drugs have yet to be tested in humans, and most need further clinical trials. Nevertheless it is encouraging that after a hiatus of over twenty years options to treat patients with refractory lupus nephritis are now available.

Correspondence to:

Ana Cordeiro
 Serviço de Reumatologia
 Hospital Garcia de Orta
 Av. Prof. Torrado da Silva
 2801-951 Almada, Portugal
 E-mail: cordeiro.ana@gmail.com

References:

- Zimmerman R, Radhakrishnan J, Valeri A, Appel G. Advances in the Treatment of Lupus Nephritis. *Ann Rev Med* 2001;52:63-68
- Mageed RA, Prud'homme GJ. Immunopathology and the gene therapy of lupus. *Gene Therapy* 2003;10:861-874
- Alarcón-Segovia D, Tumlin J, Furie R et al. LJP394 for the Prevention of Renal Flare in Patients With Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheum* 2003;48:442-454
- Gescuk BD, Davis JC. Novel therapeutic agents for systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol* 2002;14:515-521
- Silverman G, Weisman S. Rituximab Therapy and Autoimmune Disorders. *Arthritis Rheum* 2003;48:1484-1492
- Leandro MJ, Edwards JC, Cambridge G, Ehrenstein MR, Isenberg DA. An Open Study of B Lymphocyte Depletion in Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheum* 2002;46:2673-2677
- Janeway CA, Travers P, Walport M, Capra J. In: Immunobiology - The Immune System in Health and Disease. 4th Edition Churchill Livingstone 1999
- Cambridge G, Leandro MJ, Edwards JCW et al. Serologic Changes Following B Lymphocytes Depletion Therapy for Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum* 2003;48:2146-2154
- Saito K, Nawata M, Nakayamada S, Tokunaga M, Tsukada J, Tanaka Y. Successful treatment with anti-CD20 monoclonal antibody (rituximab) of life-threatening refractory systemic lupus erythematosus with renal and central nervous system involvement [Letter]. *Lupus* 2003;12:798-800
- Cohen SB, Emery P, Greenwald MW et al. REFLEX Trial Group. Rituximab for rheumatoid arthritis refractory to anti-tumor necrosis factor therapy: Results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial evaluating primary efficacy and safety at twenty-four weeks. *Arthritis Rheum* 2006;54:2793-806.
- Leandro MJ, Ehrenstein M, Edwards JCW, Manson J, Cambridge G, Isenberg DA. Treatment of Refractory Lupus Nephritis With B Lymphocyte Depletion. *Arthritis Rheum* 2003;48 suppl:S378
- Ng KP, Leandro MJ, Edwards JC, Ehrenstein MR, Cambridge G, Isenberg DA. Repeated B cell depletion in treatment of refractory systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2006;65:942-945
- Cambridge G, Leandro MJ, Teodorescu M, Manson J, Rahman A, Isenberg DA, Edwards JC. B cell depletion therapy in systemic lupus erythematosus: effect on autoantibody and antimicrobial antibody profiles. *Arthritis Rheum* 2006;54:2612-22
- van Vollenhoven RF, Gunnarsson I, Weli-Henriksson E et al. Biopsy-verified response os severe nephritis to treatment with rituximab (anti-CD20 monoclonal antibody) plus cyclophosphamide after biopsy documented failure to respond to cyclophosphamide alone. *Scand J Rheumatol* 2004;33:423-427
- Gunnarsson I, Sundelin B, Jónsdóttir T, Jacobson SH, Weli-Henriksson E, van Vollenhoven RF. Histopathologic and Clinical Outcome of Rituximab Treatment in Patients with Cyclophosphamide-Resistant Proliferative Lupus Nephritis. *Arthritis Rheum* 2007;56:1263-1272
- Vigna-Perez M, Hernandez-Castro B, Paredes-Saharopulos O et al. Clinical and immunological effects of rituximab in patients with lupus nephritis refractory to conventional therapy: a pilot study. *Arth Res Ther* 2006;8:83-91
- Sfikakis PP, Boletis JN, Lionaki S et al. Remission of Proliferative Lupus Nephritis Following B Cell Therapy IS Preceded by Down-Regulation of the T Cell Costimulatory Molecule CD40 Ligand. *Arthritis Rheum* 2005;52:501-513
- Remuzzi G, Chiurciu C, Abbate M, Brusengan V, Bontempelli M, Ruggenti P. Rituximab for idiopathic membranous nephropathy. *Lancet* 2002;360:923-24
- Anolik J, Barnard J, Cappione A et al. Effects of Rituximab on B Cells in Human SLE. *Arthritis Rheum* 2003;48 suppl:S262
- Tahir H, Rohrer J, Bhatia A, Wegener WA, Isenberg DA. Humanized anti-CD20 monoclonal antibody in the treatment of severe resistant systemic lupus erythematosus in a patient with antibodies against rituximab. *Rheumatology* 2005;44:561-562
- Steinfeld SD, Tant L, Burmester GR et al. Epratuzumab (humanised anti-CD22 antibody) in Primary Sjögren Syndrome: an open label phase I/II study. *Arthritis Res Ther* 2006;8:129-139
- Dörner T, Kaufmann J, Wegener WA, Teoh N, Goldenberg DM, Burmester GR. Initial clinical trial of epratuzumab (humanized anti-CD22 antibody) for immunotherapy of systemic luous erythematosus. *Arthritis Res Ther* 2006;8:47-84
- Eisenberg R. Targeting B cells in systemic lupus erythematosus: not just déjà vu all over again. *Arthritis Res Ther* 2006;8:108-109
- Leonard JP, Coleman M, Ketas J et al. Combination antibody therapy with epratuzumab and rituximab in relapsed or refractory non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 2005;23:5044-5051
- Smolen JS. Therapy of systemic lupus erythematosus: a look into the future. *Arthritis Res* 2002;4:25-30
- Weisman MH, Bluestein HG, Berner CM, Haan HA. Re-

- duction in Circulating dsDNA Antibody Titer After Administration of LJP 394. *J Rheumatol* 1997;24:314-318
27. Furie R, Cash J, Cronin M et al. Treatment of Systemic Lupus Erythematosus with LJP394. *J Rheumatol* 2001;28:257-265
 28. Waldman M, Appel GB. Update on the treatment of lupus nephritis. *Kidney International* 2006;70:1403-1412
 29. [No authors listed]. Abetimus: Abetimus sodium, LJP394. *BioDrugs* 2003;17:212-215
 30. Ramanujam M, Wang X, Huang W, Akkerman A, Davidson A. Short-term Combination CTLA4-Ig/TACI-Ig Prevents Onset of SLE nephritis in the NZB/W F1 Murine SLE Model. *Arthritis Rheum* 2002;46:226
 31. Ramanujam M, Wang X, Huang W, Davidson A. Polyclonal B Cell Activation in NZB/W F1 Mice is dependent on B Cell Stimulation Through TACI/BCMA but not BR-3. *Arthritis Rheum* 2003;48:262
 32. Kollias G, Kontoyiannis D. Role of TNF/TNFR in autoimmunity: specific TNF receptor blockage may be advantageous to anti-TNF treatments. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2002;13:315-321
 33. Stohl W, Metyas S, Tan S et al. B lymphocyte overexpression in patients with systemic lupus erythematosus: longitudinal observations. *Arthritis Rheum* 2003;48:3475-3486
 34. Ramanujam M, Wang X, Huang W et al. Mechanism of action of transmembrane activator and calcium modulator ligand interactor-Ig in murine systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 2004;173:3524-3534
 35. Furie R, Stohl W, Ginzler E et al. Safety, Pharmacokinetic and Pharmacodynamics Results of a Phase I Single and Double-Escalation Study of LymphoStat-B (Human Monoclonal Antibody to BlyS) in SLE patients. *Arthritis Rheum* 2003;48:377
 36. Dall'Era M, Chakravarty E, Wallace D et al. Reduced B lymphocyte and immunoglobulin levels after ataccept treatment in patients with systemic lupus erythematosus: results of a multicenter, phase Ib, double-blind, placebo-controlled, dose-escalating trial. *Arthritis Rheum* 2007;56:4142-4150
 37. Huang W, Sinha J, Newman J et al. The effect of Anti-CD40 Ligand Antibody on B Cells in Human Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheum* 2002;46:1554-1562
 38. Davis Jr JC, Totoritis MC, Rosenberg J, Sklenar TA, Wofsy D. Phase I Clinical Trial of a Monoclonal Antibody Against CD40-Ligand (IDEC-131) in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *J Rheumatol* 2001;28:91-101
 39. Kalunian KC, Davis Jr JC, Merrill JT, Totoritis MC, Wofsy D, for the IDEC-131 Lupus Study Group. Treatment of Systemic Lupus Erythematosus by Inhibition of T Cell Costimulation With Anti-CD154. *Arthritis Rheum* 2002;46:3251-3258
 40. Boumpas DT, Furie R, Manzi S et al. A Short Course of BG9588 (Anti-CD40 Ligand Antibody) Improves Serologic Activity and Decreases Hematuria in Patients With Proliferative Lupus Glomerulonephritis. *Arthritis Rheum* 2003;48:719-727
 41. Kawai T, Andrews D, Colvin R, Sachs D, Cosimi A. Thromboembolic complications after treatment with monoclonal antibody against CD40 ligand. *Nat Med* 2000;6:214
 42. Strand V. Monoclonal antibodies and other biologic therapies. *Lupus* 2001;10:216-221
 43. Zandman-Goddard G, Shoenfeld Y. Novel approaches to therapy for systemic lupus erythematosus. *Eur J Int Med* 2000;11:130-134
 44. Genovese MC, Becker JC, Schiff M et al. Abatacept for Rheumatoid Arthritis Refractory to Tumour Necrosis Factor _ Inhibitor. *NEJM* 2005; 353:1114-1123
 45. Emilie D. Interleukin 10 in disseminated lupus erythematosus. *J Soc Biol* 2002;196:19-21
 46. Llorente L, Richaud-Patin Y, Garcia-Padilla C et al. Clinical and Biologic Effects of Anti-IL10 Monoclonal Antibody Administration in Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheum* 2000;43:1790-1800
 47. Ravirajan C, Wang Y, Matis L et al. Effect of neutralizing antibodies to IL-10 and C5 on renal damage caused by a pathogenic human anti-dsDNA antibody. *Rheumatology* 2004;43:442-447
 48. Aringer M, Zimmermann C, Graninger W, Petera P, Steiner G, Smolen J. Anti-TNF Therapy of SLE is feasible and Apparently Effective. *Arthritis Rheum* 2003;48:378
 49. Aringer M, Smolen JS. Cytokine expression in lupus kidneys. *Lupus* 2005;14:13-18
 50. Hayat S, Uppal S, Nampoori MR, Johnny K, Gupta R, Al-Oun M. Safety and efficacy of infliximab in a patient with active WHO class IV lupus nephritis. *Clin Rheumatol* 2006; Mar 25[Epub ahead of print]
 51. Aringer M, Graninger WB, Steiner G, Smolen JS. Safety and efficacy of TNF _ blockage in systemic lupus erythematosus - an open label study. *Arthritis Rheum* 2004;50:3161-3169
 52. Katz S, Holt-Daly N, MacDonald P. Frequent Infusion Reactions Associated with Infliximab Treatment in Patients with polyarthritis Related to Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheum* 2003;48:379
 53. Kono D, Baccala R, Theofilopoulos A. Inhibition of lupus by genetic alteration of the interferon-alpha/beta receptor. *Autoimmunity* 2003;36:503-510
 54. Ronnblom L, Alm G. Systemic lupus erythematosus and the type I interferon system. *Arthritis Res Ther* 2003;5:68-75
 55. Wang Y, Hu Q, Madri J, Rollins S, Chodera A, Matis L. Amelioration of lupus-like autoimmune disease in NZB/W F1 mice after treatment with a blocking monoclonal antibody specific for complement component C5. *Proc Natl Acad Sci* 1996;93:8563-8568
 56. Thomas T, Rollins S, Rother R et al. Inhibition of complement activity by humanized anti-C5 antibody and single-chain Fv. *Mol Immunol* 1996;33:1389-1401
 57. Davis Jr J, Manzi S, Yarboro C et al. Recombinant human DNase (rhDNase) in patients with lupus nephri-

- tis. *Lupus* 1999;8:68-76
58. Hahn B, Singh R, Wong W, Tsao B, Bulpitt K, Ebling M. Treatment With a Consensus Peptide Based on Amino Acid Sequences in Autoantibodies Prevents T Cell Activation by Autoantigens and Delays Disease onset in Murine Lupus. *Arthritis Rheum* 2001;44:432-441
 59. Kang H, Michaels M, Datta S. Low-Dose Tolerance Therapy of Lupus with Nucleosomal Histone Peptides. *Arthritis Rheum* 2002;46:225
 60. Shimizu S, Nakashima H, Inoue Y et al. Anti-monocyte Chemoattractant protein-1 Gene Therapy Improves Glomerulonephritis in the MRL-lpr Mice. *Arthritis Rheum* 2002;46:293
 61. Singh R, Yang J, Fan G. Vaccination with MHC Class I-binding VH Epitopes Delivered via plasmid DNA Vectors or as CpG-peptide Conjugates Inhibits Lupus: Potential Mechanisms. *Arthritis Rheum* 2002;46:225
 62. Furst DE. Stem cell transplantation for autoimmune disease: progress and problems. *Curr Opin Rheumatol* 2002;14:220-224
 63. Van Laar J, Tyndall A. Intensive immunosuppression and stem-cell transplantation for patients with severe rheumatic autoimmune disease: a review. *Cancer Control* 2003;10:57-65
 64. Tyndall A. Immunoablation and haematopoietic stem cell transplantation for severe autoimmune disease with special reference to systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2001;10:214-215
 65. Traynor A, Barr W, Rosa R et al. Haematopoietic Stem Cell Transplantation for Severe and Refractory Lupus. *Arthritis Rheum* 2002;46:2917-2923
 66. Marmont AM. Lupus: tinkering with haematopoietic stem cells. *Lupus* 2001;10:769-774
 67. Petri M, Jones R, Brodsky R. High-Dose Cyclophosphamide Without Stem Cell Transplantation in Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheum* 2003;48:166-173

ASBMR 30th Annual Meeting

Canadá, Montreal
12-16 de Setembro de 2008

15th PRES

Reino Unido, Londres
14-17 de Setembro de 2008

ANTI RO, ANTI LA, ANTI RNP ANTIBODIES AND ELETROCARDIOGRAM'S PR INTERVAL IN ADULT PATIENTS WITH SYSTEMIC LUPUS ERITHEMATOSUS

Militino Costa,* Marília Barreto Gameiro Silva,* José Antonio Silva,** Thelma L Skare*

Resumo

Justificativa: Crianças nascidas de mães com auto-anticorpos anti-Ro, La e anti-RNP podem desenvolver lúpus neonatal. Uma das manifestações desta síndrome é o bloqueio átrio-ventricular congênito.

Objetivo: Estudar a influência dos anticorpos anti-Ro, La e RNP no intervalo PR do eletrocardiograma de pacientes adultos com lúpus eritematoso sistêmico (LES).

Metodologia: Foram estudados os intervalos PR dos eletrocardiogramas de 61 pacientes com LES e de 61 controles, correlacionando-os com presença dos auto-anticorpos referidos.

Resultados: Na população com lúpus, 36,6% eram anti-Ro positivos; 20% eram anti-La positivos e 22,9% eram anti-RNP positivos. Todos os intervalos estudados eram iguais ou abaixo de 0,2 seg. Não se encontrou associação entre a duração do intervalo PR e a presença de anti-Ro ($p=0,54$), anti-La ($p=0,45$) ou anti-RNP ($p=0,36$).

Conclusão: A presença dos auto-anticorpos anti-Ro, La e RNP não se associou com alterações do intervalo PR de adultos com LES.

Palavras-chave: Complexo Antígeno-Anticorpo; Bloqueio Cardíaco; Lúpus Eritematoso Sistêmico.

Abstract

Background: Children born from mothers with anti-Ro, La or RNP autoantibodies may develop neonatal lupus. One of the manifestations of neonatal lupus is congenital atrio ventricular block.

Objective: To study EKG PR interval in adult systemic lupus erythematosus (SLE) patients with anti-

-Ro, anti-La and anti-RNP autoantibodies.

Methods: PR intervals and the presence of anti-Ro, La and RNP antibodies were studied in 61 SLE patients and compared with 61 controls.

Results: 36.6% of SLE patients were anti-Ro positive, 20% were anti-La and 22.9% were anti-RNP positive. All studied PR intervals were within normal limits (upper limit of 0.2 sec). We did not find any association between PR interval length and the presence of anti-Ro ($p=0.54$), anti-La ($p=0.45$) or anti-RNP autoantibodies ($p=0.36$).

Conclusion: The presence of anti-Ro, La and RNP autoantibodies does not influence PR interval in adult SLE patients.

Keywords: Antigen Antibody Complex; Heart Block; Systemic Lupus Erythematosus.

Introduction

Neonatal lupus is caused by placental transfer to fetus of maternal anti-Ro, anti-La and, in a lesser degree, anti-RNP autoantibodies. Mothers of babies with neonatal lupus may have systemic lupus erythematosus (SLE), Sjögren's syndrome or may be asymptomatic carriers of these autoantibodies.¹

In the clinical spectrum of neonatal lupus, complete congenital cardiac atrio-ventricular (A-V) block can be found.¹ Other cardiac findings are transient first degree A-V block, prolongation of QTc interval, sinus bradycardia, cardiomyopathy and endocardial fibroelastosis.²

Ro and La antigens are present in cardiac conduction tissues in human fetus.³ One possible explanation for the occurrence of neonatal A-V block is the cytotoxic action of maternal anti-Ro and anti-La antibodies and the influx of inflammatory cells, which injure myocardial and conduction tissue nearby.³ It is very unlikely that such antibodies can penetrate an intact cell. However, Ro and La antigens can be expressed in the cellular membrane of

*Serviço de Reumatologia do Hospital Universitário Evangélico de Curitiba-PR- Brasil.

**Serviço de Cardiologia do Instituto de Neurologia e Cardiologia de Curitiba-PR-Brasil.

apoptotic blebs and apoptosis is very important and active in fetal tissues.⁴

In adults, anti-Ro antibodies and, less commonly, anti-La antibodies have been associated with subacute cutaneous lupus, antinuclear antibody negative lupus and lupus-like syndrome in patients with homozygotic deficiency of C2 and C4 complement fractions.⁵ Data on the effect of such autoantibodies in adult cardiac tissue are controversial. Logar *et al*⁵ found that anti-Ro antibodies were associated with myocarditis and conduction defects in adults with SLE. In patients with polymyositis, Behan *et al*⁶ reported an association of the presence of anti-Ro with cardiac damage. Furthermore, Lazzerini *et al*⁷ found a high prevalence of increased QTc interval in patients with connective tissue diseases that were anti-Ro positive. On the other hand, Gordon *et al*³, studying 19 mothers of neonatal lupus children and 111 SLE patients, could not establish a relationship between the presence of anti-Ro and heart conduction defects.

In this study we looked for possible associations between the presence of anti-Ro, anti-La and anti-RNP antibodies and alterations of the PR interval in adult SLE patients.

Methods

This study was approved by the local Ethics Committee and all the enrolled patients gave written consent. Lupus patients attending our clinic between March and June 2007 were invited to participate. The patients had to have at least 4 of the ACR classification criteria for SLE. We excluded patients using class I and II anti-arrhythmic drugs, anti-histaminics, quinolones, macrolides, pheno-

thiazines, cisapride, and those with ischemic heart disease, previous cardiomyopathies, lupus carditis or history of cardiac conduction disorders.⁸ Individuals with renal failure, diabetes or with any other possibility of hydroelectrolytic disturbance were also excluded.⁸

All the enrolled patients performed a standard resting 12 lead electrocardiogram that was read by one examiner. Adopted normal values for PR interval were 0.12 to 0.20 seconds.⁹ Charts were reviewed for demographic data, presence of anti-Ro, anti-La and anti-RNP antibodies.

Routine pre-anesthetic electrocardiograms from patients submitted to minor surgeries such as ablation of varicose veins or cataract extraction, without systemic diseases and not on any medication were used as a control.

Obtained values were studied by frequency tables using Student's t test for numerical data and Fisher and chi-square tests for nominal data with the help of the software Graph Pad Prism version 4.0. The significance level adopted was 5%.

Results

We studied 61 patients with SLE and 61 controls. The characteristics of the studied population are shown on Table I.

In the SLE group, anti-Ro and anti-La tests were performed in 60 patients, 22 (36.6%) being anti-Ro positive and 38 (63.3%) anti-Ro negative; 12 (20%) anti-La positive and 48 (80%) anti-La negative. Anti-RNP was determined in 48 patients 11 (22.9%) being positive and 37 (77.1%) negative.

PR intervals according to the presence of auto-antibodies are displayed on Table II.

Table I. Characteristics of the studied population

Variable	SLE	Controls	P
Mean age (years)	36.57±11.48	37.66 ± 18.18	0,68 (*)
Gender- men:women	3:58	6:55	0,49 (**)
PR interval (msec ^{***}) lower limit	100	100	0,09 (*)
upper limit	200	180	
mean	141.9±19.6	135±20.4	

SLE= Systemic lupus erythematosus

(*) Student's t test

(**) Fisher's exact test

(***) milliseconds

Table II. Mean PR interval (in milliseconds) in SLE patients according to the autoantibody profile

	Positive	Negative	p
Anti-Ro (n=60)	139.1±20.94	143.4±17.43	0.54 (#)
Anti-La (n=60)	137.9±17.77	142.8±20.19	0.45 (#)
Anti-RNP (n=48)	144.1±11.14	140.2±20.06	0.36 (#)

SLE – Systemic lupus erythematosus

(#) – Mann Whitney

Discussion

Anti-Ro and anti-La are autoantibodies directed against nuclear and cytoplasmatic small ribonucleoproteins, which can cross the placenta causing neonatal lupus. These antibodies may be responsible for congenital heart blocks, skin rashes, cytopenias and hepatic dysfunction in the newborn.¹ Cardiac A-V block is the most important cause of morbidity and mortality in these children and it is most often detected between weeks 16 and 24 of pregnancy.¹ More than 60% of the affected children require a lifelong pacemaker.¹

In fatal cases, anti-Ro has been extracted from tissue obtained from the newborn heart as opposed to other fetal organs.³ In addition, injections of anti-Ro into pregnant mice generated animals with conduction defects.¹⁰ Such observations place these autoantibodies in a central position for the origin of cardiac conduction disturbances.

An interesting observation is that when a mother gives birth to a child with congenital cardiac conduction defect, there is very little chance that the disease recurs in a subsequent pregnancy, even when she remains positive for the autoantibodies.¹ So, it is not enough that the mothers have anti-Ro. The child seems to participate in an active way, probably with a predisposing genetic component.²

Why is fetal tissue so sensible to the action of these autoantibodies? One possible explanation is that fetal cardiac tissue has a high index of apoptosis, leading to exposition of intracellular antigens that makes it vulnerable to the action of circulating autoantibodies.⁴ When apoptosis takes place, Ro and La antigen of nuclear origin are detected in big apoptotic blebs. Ro antigen of cytoplasmatic origin has been found in small apoptotic blebs.¹¹

Increased activity of anti-Ro antibodies caused by apoptotic cells is also found in adults. This ac-

tivity is clearly demonstrated in cases where ultra violet light increases skin lesions in SLE patients with this autoantibody.¹² Nevertheless, myocardial tissue apoptosis is a very rare event in adults.¹¹

In this study we examined whether anti-Ro (and also anti-La and anti-RNP) antibodies were associated with PR prolongation in adult SLE patients. None of these autoantibodies could be linked to cardiac conduction defects in adults, which is in conformity with the findings by Gordon et al.³ This shows that mature cardiac tissue is resistant to injury caused by these autoantibodies.

In our sample no patient had primary cardiac lesions, so the possibility that in cases of myocardial necrosis caused by vasculitis (with subsequent exposition of Ro and La antigens) such autoantibodies may amplify the final results still remains.

Some authors observed associations between anti-Ro and anti-La and prolongation of QTc interval.² In the present study we chose not to analyze this parameter because it is possible for lupus patients to have increased QTc, despite the autoantibody profile. Cardoso et al.¹³ have attributed this to a subclinical cardiovascular disease. In addition, most of our patients were using antimalarial drugs, which are known to increase QTc interval.¹⁴

The authors conclude that anti-Ro, anti-La and anti-RNP antibodies did not interfere with PR interval in adult SLE patients. More studies are still needed to verify the role of these autoantibodies as lesion amplifiers in SLE patients with myocardial lesions.

Correspondence to:

Thelma L Skare
Rua João Alencar Guimarães, 796
80310420 Curitiba PR - Brazil
E-mail: tskare@onda.com.br

References:

1. Neiman AR, Lee LA, Weston WL, Buyon JP. Cutaneous

- manifestations of neonatal lupus without heart block: characteristics of mothers and children enrolled in a national registry. *J Pediatrics* 2000;137:674-80.
2. Costedoat-Chalumeau N, Amoura Z, Villain E, Cohen L. Anti SS-A/Ro antibodies and the heart: more than complete congenital heart block? A review of electrocardiographic and myocardial abnormalities and the treatment options. *Arthritis Res Ther* 2005;7:69-73.
 3. Gordon PA, Rosenthal E, Khasmata MA, Juges GRV. Absence of conduction defects in the electrocardiograms of mothers with children with congenital complete heart block. *J Rheumatol* 2001;28:366-369.
 4. Miranda EM, Tseng CE, Rashbaum W et al. Accessibility of SSA-Ro and SSB-La antigens in maternal auto-antibodies in apoptotic human fetal cardiac myocytes. *J Immunol* 1998;161:5062-5069.
 5. Logar D, Kveder T, Rosman B, Dobovisek J. Possible association between anti Ro antibodies and myocarditis or cardiac conduction defects in adults with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 1990;49:627-629.
 6. Behan WMH, Behan PO, Gairns J. Cardiac damage in polymyositis associated with antibodies to tissue ribonucleoproteins. *Br Heart J* 1987;57:176-180.
 7. Lazzerini PE, Acampa M, Guideri F et al. Prolongation of corrected QT interval in adult patients with anti Ro/SS-A positive connective tissue diseases. *Arthritis Rheum* 2004;50:1248-1252.
 8. Arnsdorf MF. Myocardial action potential and action of antiarrhythmic drugs. In Rose B. *Uptodate.com* - versão 15.2. Captured in *www.uptodate.com*, 2007 Aug.
 9. Arnsdorf MF. First degree atrioventricular block. In Rose B. *Uptodate.com* versão 15.2. Captured in *www.uptodate.com*, 2007 Aug.
 10. Miranda CME, Boutjdir M, Tseng CE, Didonato E, Chan EKL, Buyon JP. Induction of antibodies reactive with SSA/Ro-SSB/La and development of congenital heart block in a murine model. *J Immunol* 1998;161:5886-2892.
 11. Buyon JP. Neonatal lupus syndromes. In Lahita R. (ed) *Systemic Lupus Erythematosus*, 4th Ed., 2004, Elsevier, Oxford, 455-484.
 12. Furukawa F. Photosensitivity in cutaneous lupus erythematosus: lessons from mice and men. *J Dermatol Sci* 2003;33:81-89.
 13. Cardoso CRL, Sales MAO, Papi JAS, Salles GE. QT-interval parameters are increased in systemic lupus erythematosus patients. *Lupus* 2005;14:846-852.
 14. Silva JA, Silva MB, Skare TL. Chloroquine and QTc interval. *Clin Exp Rheumatol* 2007;25:795.

2008 World Congress on Osteoarthritis

Itália, Roma
18-21 de Setembro de 2008

10º Curso EULAR Pós-Graduado

Krefeld, Alemanha
29 de Setembro a 3 de Outubro de 2008

POLIMORFISMOS GENÉTICOS DA PROTEÍNA TIROSINA FOSFATASE DE BAIXO PESO MOLECULAR [LMW-PTP]: SUA RELAÇÃO COM O FENÓTIPO ENZIMÁTICO ERITROCITÁRIO EM DOENTES COM LÚPUS ERYTEMATOSO SISTÊMICO

Maria de Fátima Araújo Esteves Martins,^{*} Raquel Carvalho,^{**} Miguel Alves,^{***}
Carlos Alberto Monteiro da Silva Ferreira,^{****} Manuel Diamantino Pires Bicho^{*****}

Resumo

O Lúpus Eritematoso Sistémico (LES) é uma doença auto-imune multi-sistémica cuja imunopatogénese se caracteriza pela perda de tolerância ao próprio, revelando mecanismos deficientes de regulação imune.

A ACP1/LMW-PTP (fosfatase ácida do glóbulo vermelho ou proteína tirosina fosfatase de baixo peso molecular) é altamente polimórfica apresentando o seu gene três alelos (A,B,C) que codificam proporções de isoenzimas *fast* e *slow* com localizações celulares e funções distintas. Vários estudos mostram que a LMW-PTP está envolvida na regulação da sinalização celular iniciada pelos receptores de factores de crescimento (PDGF, GM-CSF), interleucinas (IL-4) e insulina. Os efeitos fenotípicos mais relevantes da sua sobre expressão são uma forte redução da taxa de crescimento celular por estimulação do PDGF e uma regulação positiva da adesão celular e quimiotaxia.

Neste estudo procedeu-se à caracterização dos polimorfismos genéticos da LMW-PTP e quantificação das respectivas actividades enzimáticas no eritrócito num grupo de indivíduos com Lúpus e num grupo controlo tendo em vista o estabelecimento de uma relação genótipo/fenótipo no LES. Os resultados obtidos revelaram uma predominância

dos genótipos AA (n=8) e AB (n=21), responsáveis pelas formas enzimáticas de actividade menos elevada, no grupo de doentes, enquanto que no grupo controlo predominaram os genótipos com maior actividade, AB (n=52) e BB (n=36) ($p=0,04$ - teste χ^2). A média das actividades enzimáticas da LMW-PTP para o grupo de doentes foi menor ($260,53 \pm 96,18$ mmol p-nitrofenolato/gHb/h) do que a encontrada para o grupo controlo ($339,84 \pm 113,78$ mmol p-nitrofenolato/gHb/h) ($p<0.001$). Estes resultados sugerem um papel importante da LMW-PTP no contexto do LES nomeadamente ao nível da proliferação celular e do stresse oxidante.

Palavras-chave: LES; ACP1; LMW-PTP; Transdução de Sinal.

Abstract

Systemic Lupus Erythematosus (SLE) is a multisystemic autoimmune disease characterized by the loss of self-tolerance, revealing defective immune regulatory mechanisms.

ACP1 is a highly polymorphic erythrocyte LMW-PTP isozyme, encoded by a gene presenting three alleles (A, B, C). These alleles determine different fast/slow isozyme proportions having distinct cellular localization and biological functions.

Several studies demonstrated the involvement of LMW-PTP in the PDGFr, IL4 and insulin dependent cellular signalling regulation. The most relevant phenotypic effects of LMW-PTP over expression are the strong reduction of cell growth rate in response to PDGF stimulation, together with up regulation of cell adhesion and chemotaxis.

Our aims were the characterization of LMW-PTP

*Laboratório de Imunologia, INSA-Lisboa (Inst. Nac. de Saúde Dr. Ricardo Jorge).

**Laboratório de Genética e Centro de Metabolismo e Endocrinologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa.

***Serviço de Medicina III, Hospital Santa Maria, Lisboa.

****Cadeira de Medicina II da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa e Serviço de Medicina II do Hospital de Santa Maria, Lisboa.

*****Laboratório de Genética e Centro de Metabolismo e Endocrinologia da Faculdade Medicina da Universidade de Lisboa.

genetic polymorphisms and the evaluation of erythrocyte LMW-PTP enzymatic activity in a lupus and a control population group and the determination of genotype/phenotype relationship in SLE.

The results revealed a predominance of AA (n=8) and AB (n=21) genotypes in SLE, which are responsible for the low enzymatic activity forms, while in the control group there was a predominance of high enzymatic activity genotypes AB (n=52) and BB (n=36). The difference between the two groups was statistically significant ($p=0,04$ - χ^2 for 4 freedom degrees). The LMW-PTP median enzymatic activity in the SLE group (260.53 ± 96.18 mmol p-nitrophenolate/gHb/h) was lower than in the control group (339.84 ± 113.78 mmol p-nitrophenolate/gHb/h) ($p<0.001$).

These results suggest a relevant role for LMW-PTP in the context of SLE, namely at cellular proliferation and oxidative stress level.

Keywords: SLE; ACP1; LMW-PTP; Signal Transduction.

Introdução

O Lúpus Eritematoso Sistémico (LES) é uma doença autoimune que se caracteriza pela presença de autoanticorpos dirigidos contra estruturas do próprio, sobretudo constituintes nucleares. A sua patogenese não está ainda totalmente esclarecida, apesar de toda a investigação já realizada.

Para o estabelecimento da doença parecem concorrer uma série de factores como a susceptibilidade genética, factores endócrinos, ambientais e infecciosos.¹

O envolvimento de órgãos alvo parece estar relacionado com a existência de auto-antígenos (*autoantigen-driven*) e com a activação celular mediada por células B e T.² O equilíbrio entre as células T *helper* e as células T reguladoras, as moléculas pró e anti-inflamatórias e as alterações entre oxidantes e anti-oxidantes parece também representar um papel vital na patofisiologia do Lúpus.³ Têm sido também referidas alterações nos mecanismos de transdução de sinal ao nível dos linfócitos.⁴⁻⁶

Muitos têm sido os genes considerados como candidatos a genes de susceptibilidade ao LES e como tal estudados, nomeadamente aqueles que se relacionam com a expressão de proteínas com funções importantes para o Sistema Imunitário, já que a perda de tolerância imunitária aos antígenos (Ag)

do próprio constitui a base central da patologia lúpica.

A fosforilação de proteínas nos seus resíduos de tirosina constitui um mecanismo importante em muitas vias de transdução de sinal, controlo de crescimento celular, diferenciação e desenvolvimento.^{7,8}

As proteína tirosina fosfatases, ou PTPs, são enzimas que removem fosfatos de resíduos de tirosina contrariando ou opondo-se, em princípio, à actividade das PTKs. Embora os mecanismos moleculares da transdução de sinal e activação celular T tenham sido estudados intensamente nestes últimos anos, a participação das PTPs tem sido largamente negligenciada, apesar de em geral se ter a noção de que elas serão tão importantes quanto as PTKs para o controlo e coordenação das cascatas sinalizadoras para além do seu papel, concertiza crucial, quer na manutenção do estado de repouso das células T na ausência do Ag, quer à reconversão a esse estado após remoção dos estímulos de activação.

Embora as bases bioquímicas do papel da ACP1/LMW-PTP na patofisiologia humana permaneçam desconhecidas, têm sido aventadas diversas hipóteses a partir dos estudos realizados. Em primeiro lugar parece ser evidente a sua relevância fisiológica para o normal funcionamento dos GVs, do Sistema Imunitário, do armazenamento de lípidos nos adipócitos, dos neurónios assim como de outros tipos celulares.⁹ Em segundo lugar, as suas duas isoformas parecem ter funções biológicas distintas sendo as suas concentrações relativas diferentes nos diversos genótipos.¹⁰⁻¹⁶ Em geral, níveis elevados de actividade total da ACP1/LMW-PTP parecem reduzir as taxas metabólicas celulares, proteger contra patologias como a alergia, a asma e o aborto de repetição e reduzir os níveis de lípidos no sangue.^{9,17,18} Para além destes efeitos verifica-se também que induzem níveis elevados de glicose no sangue, a redução da produção de proteínas de fase aguda como a haptoglobina e a modulação da hipertrofia do miocárdio.⁹ Níveis baixos de actividade, por seu turno, correlacionam-se com a obesidade, talvez por um aumento do anabolismo celular e armazenamento de triglicerídeos ao nível dos adipócitos.⁹ A nível cerebral podem também favorecer o desenvolvimento da Doença de Alzheimer.⁹

Em terceiro lugar parece ser absolutamente claro que a ACP1/LMW-PTP esteja envolvida num processo regulador crítico, uma vez que mesmo



Figura 1. Estrutura tridimensional da ACP1.

pequenas diferenças nos níveis de expressão dos seus alelos são suficientes para afectar a patogenia de um modo estatisticamente significativo nas populações. Tudo isto faz com que autores como Bottini e Mustelin, por exemplo, preconizem esta enzima como possível alvo terapêutico no futuro.

A proteína tirosina fosfatase de baixo peso molecular (E.C.3.1.3.48) (cLMWPTPase) – Figura 1 – ou fosfatase ácida do *locus* 1 (ACP1) é uma enzima de 18 KDa, altamente polimórfica e que está envolvida em diversas vias de transdução de sinal.^{9,17-19} A actividade fosfatásica, codificada pelo gene ACP1, está presente em todos os tecidos humanos sob a forma de 2 proteínas ou isoenzimas designadas por ACP1 – *f* e *s* (também designadas por LMPTP-A e -B).^{20,21} Estas isoformas de tamanhos diferentes são resultado de um processo de processamento (*splicing*) alternativo²² sendo reconhecidas laboratorialmente através da sua mobilidade diferencial em electroforese em gel de amido. A ACP1/LMW-PTP, embora não relacionada estruturalmente com as outras PTPs, apresenta a sequência

de consenso típica de todos os membros desta superfamília, o CXXXXXRS/T, ao nível do seu centro activo.²³

Sabe-se que esta enzima hidroliza dois tipos de substrato que ocorrem naturalmente, sendo ambos esteres de fosfato, a FMN (Flavina Mononucleótido)²⁴ e resíduos de tirosina fosforilada em proteínas.^{11,25,26} A ACP1/LMW-PTP é controlada por um *locus* autossómico localizado no braço curto do cromossoma 2 – 2p25 – com 3 alelos codominantes mais comuns, *A, *B e *C.²⁷⁻³¹ Na população caucasiana existem 6 fenótipos proteicos correspondentes a outros tantos genótipos que apresentam importantes variações na actividade enzimática total e na razão entre as concentrações das duas isoenzimas.^{17,20} São observadas diferenças significativas entre as isoformas *f* e *s* em relação às propriedades enzimáticas e moleculares, sugerindo que possivelmente desempenharão funções diferentes.^{27,32} No entanto as isoformas quer *f* quer *s* respeitantes a cada alelo revelaram propriedades equivalentes.^{17,20}

A ACP1/LMW-PTP apresenta variações na sua actividade que estão dependentes do seu genótipo, da sua actividade de fosfotransferase e da modulação por folatos e purinas.³³ As actividades da enzima variam de genótipo para genótipo sendo cerca de 60% desta variabilidade devida ao polimorfismo electroforético.³⁴ O alelo *A está associado à actividade enzimática mais baixa, o alelo *B à actividade intermédia e o alelo *C à mais elevada.²⁷

As proporções entre *f/s* para os diferentes alelos são as seguintes: 2:1 no alelo *A, 4:1 no alelo *B e 1:4 no alelo *C, sendo a actividade total da enzima

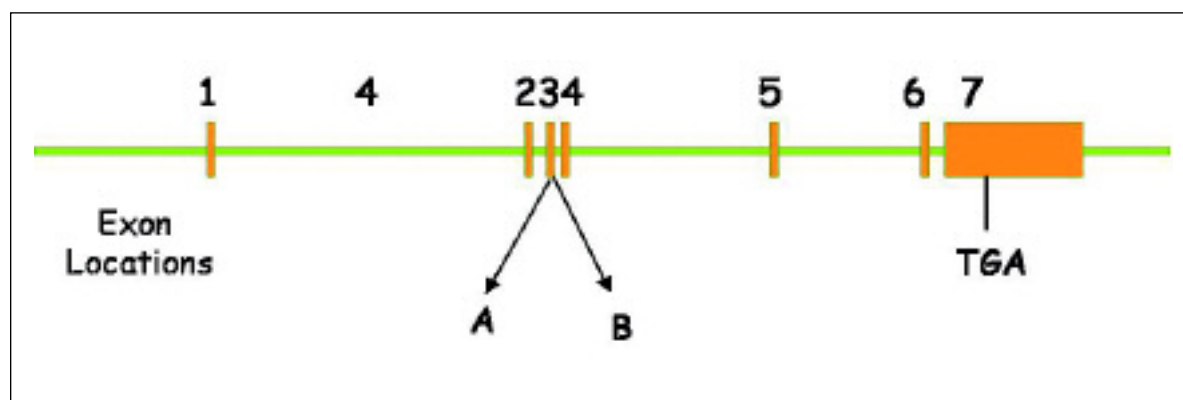


Figura 2. Organização genómica do gene ACP1. Os exões estão representados por barras verticais. Os exões que originam a isoenzima *f* e *s* estão indicados como A e B respectivamente e a região 3' não traduzida está representada por uma caixa (Bryson et al, 1995).

(*fast/slow*) de cerca de 2:3:4 para ACP1 A, ACP1 B e ACP1 C respectivamente.³⁵ Esta relação *f/s* parece não variar de tecido para tecido^{10,36} o que sugere que esta razão seja constitutiva e determinada geneticamente.

O gene ACP1 é composto por 7 exões e 6 intrões compreendendo cerca de 18kb do DNA genómico (Figura 2). Dois destes exões, o E3F e o E3S, codificam a sequência de aa das posições 39-76, para as isoformas *fe s* respectivamente.^{21,37,38} Ao nível genómico os três alelos apresentam uma grande homologia. O alelo B difere do A devido a uma transição silenciosa CÆT no codão 41 (exão E3S) e a uma transição AÆG no codão 105 (exão 5). Esta última é responsável pela alteração do aa Gln (Glutamina) para Arg (Arginina). O alelo C por seu turno difere do A e do B por uma transição silenciosa C→T no codão 43 (exão E3F). Estas diferenças são utilizadas na genotipagem por PCR-RFLP, uma vez que geram diferentes locais de restrição.^{21,39}

A ACP1/LMW-PTP liga-se especificamente e desfosforila moléculas como o receptor do PDGF-BB e da insulina, modulando assim o processo mitogénico.¹⁵ Interage ainda com outros receptores como sejam, o FGF-r⁴⁰ e o receptor da efrina.⁴¹ A ACP1/LMW-PTP é ainda capaz de reduzir o nível de fosforilação da tirosina do FGF-r e a proliferação celular em resposta ao FGF básico⁴⁰ e ao MCSF.⁴²

Os efeitos fenotípicos mais relevantes da sobre-expressão da ACP1/LMW-PTP são uma forte redução da taxa de crescimento celular em resposta à estimulação do PDGF para além de uma regulação positiva da adesão celular e quimiotaxia.¹² Deste modo, conjugando todos estes dados poderá dizer-se que eles apontam para que em geral uma actividade da ACP1/LMW-PTP diminuída esteja associada a um aumento quer das actividades metabólicas mediadas pela insulina quer da proliferação celular, enquanto uma actividade aumentada da enzima regulará negativamente todos estes processos metabólicos e mitóticos.

O LES, como se sabe, é uma patologia caracterizada centralmente por uma perda de tolerância associada a uma situação de inflamação crónica com a consequente lesão tecidular e alterações ao nível do *stress* oxidativo. É de realçar, que de entre as investigações já realizadas por diferentes autores em relação à ACP1/LMW-PTP, se abordaram outras doenças de natureza inflamatória (Doença Inflamatória do Intestino) e até autoimune (Diabetes Mellitus, Artrite Reumatóide) com resultados

muito significativos.^{17,18} Os estudos já realizados neste contexto de associação genótipo enzimático/fenótipo distante (doença) têm sido informativos e estimulantes no sentido de prosseguir a investigação sobre a sua etiopatogenia.^{9,17,18} Têm sido evidenciadas sobretudo, diferenças específicas em relação à concentração das isoformas *fe s*.⁹

Uma vez que podemos estabelecer uma linha de intersecção entre os mecanismos envolvidos na patogenia da doença, nomeadamente a resposta inflamatória celular, os mecanismos de transdução de sinal e as alterações ao nível do *stress* oxidativo e aqueles em que a ACP1/LMW-PTP surge envolvida, pareceu-nos interessante fazer uma primeira abordagem a este tema no sentido de verificar a existência de alguma correlação que pudesse motivar estudos futuros.

Objectivos

Neste estudo pretendeu-se:

a) Caracterizar os polimorfismos genéticos da ACP1 ou LMW-PTP em DNA de células humanas (leucócitos) num grupo de indivíduos com Lúpus e num grupo controlo.

b) Avaliar a actividade enzimática da ACP1 ou LMW-PTP em eritrócitos nos mesmos grupos.

O objectivo final foi, para além da caracterização genética e enzimática da LMW-PTP no LES, procurar identificar diferenças estatisticamente significativas entre os resultados dos indivíduos dos dois grupos estudados quanto aos fenótipos genéticos obtidos e à actividade enzimática expressa nos GV de modo a estabelecer uma relação genótipo/fenótipo enzimático com significado funcional no Lúpus.

Material e Métodos

O estudo foi elaborado numa amostra de 53 doentes (51 do sexo feminino e 2 do sexo masculino) com diagnóstico estabelecido de LES oriundos da consulta de Medicina II do Hosp. Stª Maria / Faculdade de Medicina – Lisboa sob a responsabilidade do Prof. Doutor Carlos Ferreira. Seleccionaram-se aleatoriamente 53 doentes da consulta que cumpriam os critérios do ACR para diagnóstico de Lúpus (média etária = 40.61±14.75 anos). O grupo controlo foi composto por 127 indivíduos (122 do sexo feminino e 5 do sexo masculino) retirados de

Quadro I. Resultados da Genotipagem nos Dois Grupos de Estudo

DISTRIBUIÇÃO DOS GENÓTIPOS					
Grupo Controlo (n=116)			Grupo Doentes LES (n=39)		
Gen	nº ind.	%	Gen	nº ind.	%
AA	9	7,8%	AA	8	20,5%
AB	52	44,8%	AB	21	53,9%
AC	9	7,8%	AC	0	-
BB	36	31,0%	BB	9	23,1%
BC	10	8,6%	BC	1	2,6%
CC	0	-	CC	0	-
«2	p/ 4 graus de liberdade p=0,040				

n= nº de indivíduos analisados

Gen = Genótipos

nº de ind. = número de indivíduos

uma amostra de dadores de sangue do IPS e de uma amostra populacional de mulheres pós-menopáusicas (média etária = 58,49±9,67 anos) do Laboratório de Genética da Fac. Medicina de Lisboa – HSM sob a responsabilidade do Prof. Doutor Manuel Bicho. Para todos os participantes foi obtido o respectivo consentimento informado.

Para a obtenção das amostras foram colhidos 2 tubos com anticoagulante (EDTA tetrasódico), sendo um deles congelado de imediato a -20°C para análise dos polimorfismos genéticos e o outro destinado às análises bioquímicas. A quantificação da hemoglobina foi determinada pelo método de Drabkin.⁴³

As actividades enzimáticas da ACP1 das amostras foram determinadas por método colorimétrico tendo como substrato o p-NPP (para-nitrofenilfosfato). Este método foi adaptado pelo Laboratório de Genética⁴⁴ a partir do descrito por Dising.⁴⁵ Para a análise genética procedeu-se primeiramente à extracção do DNA dos leucócitos do sangue periférico por método não enzimático seguido de técnica de PCR-RFLP (*Polimerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism*). O método foi desenvolvido pelo laboratório de Genética do HSM sendo realizado nas seguintes condições: iniciadores utilizados, *forward*=5' CGA TCA CCC ATT GCA GAA G-3' e *reverse*=5' CAT GAT TTT CTT AGG CAG CTC-3'. Condições de amplificação, 35 ciclos (desnaturação 94°C, 30s; emparelhamento 53°C, 30s; extensão 72°C, 45s) e um ciclo final em que a extensão decorreu a 72°C, 5min (Termocicladores utilizados: Gene Amp PCR System 2700® Applied Biosystems e

Omn-E Hybaid).

Para a descrição dos resultados obtidos recorreu-se a folhas de cálculo do programa EXCEL-Microsoft. O tratamento estatístico foi realizado no programa *Primer of Biostatistics* versão 5,0 (MacGraw-Hill, 2002). Os testes utilizados foram o ANOVA, o *t-student* e o χ^2 (valores estatisticamente significativos para $p < 0,050$).

Os doentes foram avaliados clinicamente pelo programa BLIPS™ versão 3,0 (©ADS-Limathon Ltd 1996-2001) aprovado pelo «The British Isles Lupus Assessment Group».^{46,47} Os índices estudados foram o BILAG, SLEDAI, SLAM e SLICC. Estes índices permitem medir a actividade clínica

da doença através de um sistema de pontuação que reflecte a gravidade das lesões e o grau de atingimento dos principais sistemas envolvidos.

Resultados

Devido a dificuldades técnicas não foi possível determinar o genótipo/quantificar a actividade da ACP1 em algumas das amostras quer no grupo controlo quer no grupo de doentes. Deste modo a amostra ficou com as seguintes dimensões: 116 indivíduos no grupo controlo/39 no grupo de doentes para a genotipagem e 94 indivíduos no grupo controlo/38 indivíduos no grupo de doentes para a quantificação da actividade da enzima.

Os resultados obtidos para a caracterização genética da ACP1 estão apresentados no Quadro I. A análise dos dados permite concluir que no grupo de doentes a predominância foi do genótipo AB (53,9%) que corresponde a um dos que dão origem às formas enzimáticas com menor actividade enquanto no grupo controlo a predominância foi para os genótipos AB (44,8%) e BB (31,0%) que originam, no caso destes últimos, formas enzimáticas de actividade elevada. Comparando os dois grupos em relação à frequência dos diferentes genótipos verificou-se a existência de diferenças estatisticamente significativas ($p=0,04$ no teste do χ^2 p/ 4 graus de liberdade).

Os resultados obtidos para a determinação da actividade enzimática estão apresentados no Quadro II. Como se pode verificar a média das actividades no grupo dos doentes ($\chi=260.53 \pm 96.18$) foi me-

Quadro II. Resultados da Análise Estatística das Actividades dos Diferentes Genótipos

DISTRIBUIÇÃO DOS GENÓTIPOS						
Grupo Controlo (n=94)			Grupo Doentes LES (n=38)			t student
Gen	nº ind.	Activ. Média	Gen	nº ind.	Activ. Média	
AA	9	255,85 ± 57,79	AA	8	195,92 ± 86,41	p=0,110
AB	43	288,00 ± 83,65	AB	20	230,11 ± 84,22	p=0,012
AC	7	420,43 ± 95,38	AC	0		
BB	28	406,42 ± 118,69	BB	9	314,93 ± 90,10	p=0,041
BC	7	390,06 ± 104,00	BC	1	220,65	
T	94	339,84 ± 113,78	T	38	260,53 ± 96,18	p=<0,001

n= nº de indivíduos analisados

Gen = Genótipos

nº de ind. = número de indivíduos

Quadro III. Comparação das Médias de Actividade entre as Isoformas *Fast* e *Slow* nos Dois Grupos

FAST versus SLOW					
Grupo Controlo (n=94)			Grupo Doentes LES (n=38)		
isoforma	nº ind.	Activ. Média	isoforma	nº ind.	Activ. Média
fast	80	325,83 ± 11,86	fast	37	243,35 ± 94,22
slow	14	405,25 ± 97,15	slow	1	220,65
t student	p=<0,001				

nor do que a média do grupo controlo ($c=339.84 \pm 113.78$). Estes dados estão de acordo com a frequência dos genótipos obtidos nos dois grupos.

Fomos também analisar se as diferenças entre as médias de actividade obtidas em cada grupo para cada genótipo apresentavam diferenças estatisticamente significativas. Também aqui se encontraram diferenças estatisticamente significativas entre as médias das actividades correspondentes aos diferentes genótipos, excepto entre os 2 grupos de indivíduos portadores do genótipo AA, possivelmente devido ao baixo número de indivíduos ($n=9$ e $n=8$). Não foram analisados os resultados respeitantes ao genótipo AC porque no grupo controlo não encontramos nenhum indivíduo portador desse genótipo e ao genótipo BC porque só se encontrou 1 indivíduo no mesmo grupo. Para os genótipos AB e BB as diferenças são significativas e correspondendo ao padrão já estudado e sempre com as médias do grupo dos doentes mais baixas do que as do grupo controlo (mesmo no caso dos AA).

Finalmente comparámos a frequência de isoformas *fast* e *slow* nos dois grupos através de cál-

culo. Verificaram-se novamente diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos. O Quadro III resume os resultados desta análise. Apresentam-se ainda no Quadro IV as frequências relativas de cada alelo nos dois grupos estudados.

Em relação aos dados clínicos, considerou-se de interesse confirmar a ocorrência de algum tipo de associação entre os aspectos clínicos e os dados laboratoriais tendo em vista a concretização de um dos objectivos finais deste trabalho que consistia, como já foi referido, na procura de associações entre genótipo/fenótipo enzimático.

Para tal efectuaram-se alguns exercícios estatísticos. O primeiro consistiu em verificar se a distribuição dos genótipos da LMW-PTP era diferente, de modo estatisticamente significativo, em relação à extensão da doença, ou seja, interessava saber se existiria alguma relação entre a frequência de determinado genótipo e a progressão da doença. Para tal agruparam-se os doentes em relação ao nº de critérios acumulados (avaliação proveniente do BLIPS) em dois grupos: o dos doentes com um valor de critérios acumulados de 3 ou 4 e o dos doentes em que o mesmo fosse de 5, 6 ou 7. Foram

Quadro IV. Frequências Relativas de Cada Alelo nos Dois Grupos Estudados

FREQUÊNCIA DOS ALELOS			
Grupo Controlo (n=116)		Grupo Doentes LES (n=39)	
alelos	freq.	alelos	freq.
A	0,340	A	0,474
B	0,580	B	0,513
C	0,080	C	0,013
	1,00		1,00

então avaliadas as distribuições das frequências dos 3 genótipos encontrados (AA, AB e BB) nos dois grupos. Utilizando o teste do χ^2 concluiu-se que não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos ($p=0,100$).

O segundo exercício consistiu em verificar se a média das actividades da LMW-PTP era diferente, de modo estatisticamente significativo, nos dois grupos de doentes com diferentes graus de extensão de doença ou seja pretendia-se saber se a actividade enzimática da LMW-PTP variava de modo significativo com o grau de progressão da doença. Utilizando o teste t concluiu-se que não se verificaram diferenças estatisticamente significativas ($p=0,121$).

Realizaram-se ainda mais alguns exercícios tentando relacionar quer a frequência dos genótipos quer a média das actividades enzimáticas com os índices de avaliação clínica mas sempre com resultados negativos. No entanto deverá ter-se em conta a dimensão demasiado pequena da amostra uma vez que apenas 24 dos 53 doentes estudados apresentaram estudo clínico completo.

Em relação aos aspectos clínicos não foi possível, pois, obter conclusões com verdadeiro significado o que conduz ao reforço da ideia de que é importante alargar a amostra e aprofundar o estudo efectuado.

Discussão

As bases genéticas e bioquímicas das diferentes patologias variam muito de caso para caso. Enquanto algumas doenças são monogénicas o que conduz facilmente ao seu diagnóstico, compreensão e eventual tratamento ou sua tentativa, outras, como é o caso do LES, são multifactoriais com pa-

drões complexos em que se entrelaçam factores genéticos, ambientais e fisiológicos.^{1,4,48}

É generalizada a ideia de que a susceptibilidade para uma determinada doença ou para os seus sinais clínicos é largamente determinada pela combinação de diferentes alelos de vários genes de predisposição, que individualmente podem concorrer de um modo limitado mas que juntos evidenciam uma sinergia importante. Neste contexto, a identificação de polimorfismos genéticos funcionais poderá pois fornecer uma base relevante de estudo destas interacções genéticas.¹

Os resultados por nós obtidos originaram informação relevante, uma vez que se observaram diferenças estatisticamente significativas entre o grupo de doentes e o grupo de controlo.

A LMW-PTP é uma enzima moduladora da proliferação, diferenciação adesão e mobilidade celulares. Os efeitos biológicos mais relevantes da sobreexpressão da LMW-PTP são, como já foi referido, uma forte redução na taxa de crescimento celular em resposta ao estímulo pelo PDGF para além de uma regulação positiva da adesão celular e quimiotaxia.^{12,49} Pensou-se durante muito tempo que a LMW-PTP era uma enzima exclusivamente citosólica. Ora, ao contrário, ela não se confina apenas ao citoplasma mas foi também encontrada ao nível do citoesqueleto, associada embora de um modo ligeiro, à membrana.⁵⁰ Também segundo alguns autores a sua fosforilação dependerá da localização.^{40,42,50} Rigacci e colaboradores⁵¹ demonstraram também que a LMW-PTP se associa e desfosforila o p125FAK, participando na remodelação da adesão focal e promovendo a mobilidade celular na ausência de factores de crescimento.

Chiarugi propõe que a LMW-PTP seja uma fosfatase bifuncional que regule quer a intensidade, quer a velocidade de formação dos processos de adesão celular através da fosforilação alternativa das suas duas tirosinas, Tyr¹³¹ e Tyr¹³² por proteína tirosina cinases do tipo Src.¹⁴ Quanto à fosforilação na Tyr¹³² pensa-se que interaja com a proteína Grb2.¹³ A fosforilação a este nível leva a um aumento da intensidade da adesão celular.

Recentemente a LMW-PTP foi também associada à caveolina, sugerindo um possível envolvimento na regulação da actividade desta proteína.⁵² A caveolina é fosforilada em tirosina *in vivo* por cinases da família da Src, é recrutada para os *caveolae* regulando a actividade de diversas proteínas envolvidas em cascatas sinalizadoras da célula. Este papel da LMW-PTP poderá ser relevante no LES

uma vez que, como se sabe, alguns autores põem a hipótese de que algumas das deficiências na transdução de sinal que ocorrem nos linfócitos dos indivíduos com LES poderão ter a ver com alterações ao nível do rearranjo da membrana, prévios à reunião das proteínas intervenientes nesses mecanismos.

A LMW-PTP tem sido também implicada como regulador positivo no sistema receptor da efrina pois o recrutamento da enzima para o complexo daquele receptor é importante para a promoção da adesão celular e da associação de tipo capilar endotelial.^{41,53} Os dados por nós obtidos vão no sentido de uma menor actividade por parte da ACP1/LMW-PTP o que resultará, provavelmente, numa acção menos repressora da proliferação, ou seja, provavelmente as células imunitárias dos indivíduos com LES apresentarão maiores índices de proliferação e diferenciação o que, como é óbvio, favorece a situação de inflamação crónica.

Outra das funções da ACP1/LMW-PTP relatada nos últimos anos, foi a sua participação nos fenómenos de transdução de sinal induzidos pelo TCR, ou seja, após activação celular T via reconhecimento do antigénio. Mustelin referiu, pela primeira vez, esta participação da ACP1/LMW-PTP demonstrando que ela é capaz de exercer um efeito positivo sobre a transdução de sinal através da desfosforilação de um sítio regulador negativo da cinase Zap70 (a Tyr 292).¹⁹ No entanto, o mesmo autor afirma que esta poderá não ser a única função exercida pela ACP1/LMW-PTP ou ser apenas uma acção transitória.

Aparentemente, pois, os nossos resultados confrontam-se aqui com uma contradição. Tratando-se de uma patologia em que se verifica precisamente uma situação de inflamação continuada, com activação celular T persistente seriam de esperar resultados de ACP1/LMW-PTP com actividades mais elevadas. Pensamos, no entanto, que, provavelmente e tal como refere o próprio Mustelin nos seus últimos artigos, que a ACP1/LMW-PTP poderá exercer a sua acção sobre diferentes substractos ou em diferentes localizações e consequentemente com efeitos pleiotrópicos. Uma das questões interessantes é a da localização da enzima como já foi referido anteriormente. Mustelin, nos seus trabalhos sobre a transdução de sinal, encontrou-a ao nível da membrana dos linfócitos, mas apenas a isoforma S. No entanto, outros autores, como Ramponi, relataram a sua presença quer ao nível da membrana, quer ao nível do citoplasma.¹⁶

Por outro lado, sabemos que as duas isoformas apresentam diferentes propriedades enzimáticas e moleculares o que nos pode levar a pensar que a sua acção final seja diferente e dependente da sua localização e isoforma.

A ACP1/LMW-PTP apresenta ainda uma outra função, a desfosforilação da FMN.²⁴ As duas isoformas da ACP1/LMW-PTP são activas, *in vitro*, contra a FMN desfosforilando-a e fazendo-a retornar a riboflavina. O mesmo autor conclui ainda no mesmo estudo que a ACP1/LMW-PTP é responsável pela maior parte da função fosfatásica intracelular sobre a FMN. Se esta acção ocorrer do mesmo modo *in vivo*, então a ACP1/LMW-PTP poderá ser um elemento importante para os processos de respiração e defesa anti-oxidante das células através da regulação dos níveis de FMN e FAD disponíveis para um largo número de enzimas dependentes da Flavina-Nucleótido, como por exemplo a Glutathione Redutase (GR).

Um último factor a ter em conta e não menos importante é o da possível modulação da actividade da enzima através de substâncias do meio. Ambas as isoformas da ACP1/LMW-PTP são inactivadas pelo H₂O₂ e pelo NO.^{54,55} Tem sido demonstrado que as ROS (espécies reactivas de oxigénio) tais como o O₂⁻ ou o H₂O₂ são produzidas transitoriamente ao nível intracelular quando as células são estimuladas com citocinas ou factores de crescimento.⁵⁶ Para além disto verifica-se a ocorrência de *stress* oxidativo em determinadas condições fisiológicas tais como o «burst» oxidativo macrofágico ou linfocítico ou em situações patológicas e outras.⁵⁶ Recentemente descobriu-se mesmo que o tratamento com factores de crescimento ou com H₂O₂ induz um aumento dos níveis de fosforilação em tirosina proteica. Ora este aumento só poderia ocorrer de dois modos, ou por activação das PTKs ou por inactivação das PTPs. Como não existem até hoje evidências que ocorra tal acção sobre as PTKs e as possuímos no caso das PTPs então provavelmente esse será o mecanismo.

Deste modo, e sabendo nós que no LES os níveis do *stress* oxidativo se encontram elevados, então, as actividades por nós encontradas nestes doentes poderão estar, pelo menos em alguma extensão, diminuídas também por este mecanismo. Para além deste efeito, esta inactivação, sendo geral para todas as PTPs poderá também condicionar um alongamento na resposta visto que os níveis de fosforilação são favorecidos em relação aos de desfosforilação.^{57,58}

Conclusões

Concluímos, pois, que a média da actividade enzimática da LMW-PTP no grupo de doentes se revelou mais baixa do que a do grupo controlo o que parece estar de acordo, pelo menos em parte, com os genótipos prevalentes encontrados em ambos os grupos. O grupo de doentes mostrou uma maior proporção de genótipos de menor actividade enzimática enquanto o grupo controlo evidenciou, em primeiro lugar, uma maior heterogeneidade de genótipos e, em segundo lugar, uma maior proporção de genótipos correspondentes a maior actividade enzimática.

Os resultados obtidos neste trabalho permitem considerar interessante a sua progressão. De facto, uma vez que se encontraram diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos estudados, em relação aos genótipos da ACP1/LMW-PTP e à respectiva actividade enzimática nos glóbulos vermelhos, pode considerar-se que este facto implicará algum tipo de diferença no funcionamento desta enzima ao nível dos mecanismos de transdução de sinal e/ou outros, logo, também ao nível imunológico. Deste modo, é possível que estas diferenças, para além das resultantes da ocorrência das duas isoformas da enzima (também determinadas de modo diferente pelos genótipos), determinem alterações imunológicas importantes nos doentes com LES.

Correspondência para:

Maria Fátima A. Esteves Martins
Av. Pe Cruz 1649-016 Lisboa.
Telef: 217 519 333
E-mail: fmartins@insa.min-saude.pt

Referências:

1. Tsao BP. The genetics of human systemic lupus erythematosus. *Trends Immunol* 2003;24:595-602.
2. Kewalramani, Singh AK. Immunopathogenesis of Lupus and Lupus Nephritis: recent insights. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2002;11:273-277.
3. Das Un. Oxidants and antioxidants, essential fatty acids, eicosanoids, cytokines, gene/oncogenes expression and apoptosis in SLE. *J Assoc Phys India* 1998;46:630-634.
4. Tsokos, G.C. Overview of cellular immune function. In: R.G. Lahita, editor. *Systemic lupus erythematosus*. New York USA: Academic Press, 1998: 17-54.
5. Tsokos GC, Liossis SC. Immune cell signaling defects in lupus: activation, anergy and death. *Immunology Today* 1999;20:119-124.
6. King PD. Lupus-like autoimmunity caused by defects in T-cell signal transduction. *Curr Opin Investig Drugs* 2004;5:517-23.
7. Cantley LCKR, Auger C, Carpenter B et al. Oncogenes and signal transduction. *Cell* 1991;64:281-302.
8. Bishop MJ. Molecular themes in oncogenesis. *Cell* 1991;64:235-248.
9. Bottini N, Bottini E, Gloria-Bottini F, Mustelin T. Low-molecular-weight protein tyrosine phosphatase and human disease: in search of biochemical mechanisms. *Arch Immunol Exp (Warsz)* 2002;50:95-104.
10. Blake NM, Kirk RL, Barnes KR, Thompson JM. Expression of human red cell acid phosphatase activity in placenta and other tissues. *Jpn J Hum Genet* 1973;18:10-23.
11. Boivin P, Galand C. The human red cell acid phosphatase is a phosphotyrosine protein phosphatase which dephosphorylates the membrane protein band 3. *Biochem Biophys Res Commun* 1986;134:557-564.
12. Chiarugi P, Cirri P, Marra F et al. The Src and signal transduction pathways as specific targets for low molecular weight phosphotyrosine-protein phosphatase in platelet-derived growth factor signaling. *J Biol Chem* 1998;273:6776-6785.
13. Bucciantini M, Chiarugi P, Cirri P et al. The low Mr phosphotyrosine protein phosphatase behaves differently when phosphorylated at Tyr131 or Tyr132 by Src kinase". *FEBS Lett* 1999;456:73-78.
14. Chiarugi P, Cirri P, Taddei L et al. The low Mr protein-tyrosine phosphatase is involved in Rho-mediated cytoskeleton rearrangement after integrin and platelet-derived growth factor stimulation. *J Biol Chem* 2000;275:4640-4646.
15. Taddei M, Chiarugi P, Cirri P et al. LMW-PTP exerts a differential regulation on PDGF- and insulin-mediated signaling. *Biochem. Biophys Res Commun* 2000;270:564-569.
16. Rauei G, Ramponi G, Chiarugi P. Low molecular weight protein tyrosine phosphatases: small but smart. *Cell Mol Life Sci* 2002;59:941-949.
17. Bottini E, Gloria-Bottini F, Borgiani P. ACP1 and human adaptability, I: association with common diseases: a case-control study. *Hum Genet* 1995;96:629-37.
18. Bottini E, Bottini FG, Borgiani P, Businco L. Association between ACP1 and favism: a possible biochemical mechanism. *Blood* 1997;87:2613-2615.
19. Bottini N, Stefanini I, Williams S, et al. Activation of ZAP-70 through specific dephosphorylation at the inhibitory Tyr-292 by low-molecular weight phosphotyrosine phosphatase (LMPTP). *J Biol Chem* 2002; 242:20-24224.
20. Dissing J. Human "red cell" acid phosphatase (ACP1) genetic, catalytic and molecular properties. PhD Thesis, Copenhagen University, Copenhagen, Denmark. 1993.
21. Lazaruk KDA, Dissing J, Sensabaugh GF. Exon struc-

- ture at the Human Acp1 locus supports alternative splicing model for f-isozyme and s-isozyme generation. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;196:440-446.
22. Dissing J, Johnsen AH, Sensabaugh GE. Human red cell acid phosphatase (ACP1) – the amino acid sequence of the two isozymes Bf and Bs encoded by the ACP1*B allele. *J Biol Chem* 1991;266:20619-20625.
 23. Ramponi G, Stefani M. Structure and function of the low Mr phosphotyrosine protein phosphatases. *Biochim Biophys Acta* 1997;1341:137-156.
 24. Fuchs KR, Shekels LL, Bernlohr DA. Analysis of the ACP1 gene product – classification as an FMN phosphatase. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;189:1598-1605.
 25. Luffman JE, Harris H. A comparison of some properties of human red cell acid phosphatase in different phenotypes. *Ann Hum Genet* 1967;30:387-400.
 26. Mansfield E, Sensabaugh GE. Red cell acid phosphatase: modulation of activities by purines. In: Brewer GJ ed. *The Red Cell* (vol.4). New York: Alan R Liss Inc., 1978: 233-249.
 27. Spencer N, Hopkinson DA, Harris H. Quantitative differences and gene dosage in the human red cell acid phosphatase polymorphism. *Nature* 1964;201: 299-300.
 28. Jenkins T, Corfield V. The red cell acid phosphatase polymorphism in Southern Africa: population data and studies on the R, RA and RB phenotypes. *Ann Hum Genet* 1972;35:379-391.
 29. Yoshihara CM, Mohrenweiser HW. Characterization of ACP1TIC-1, an electrophoretic variant of erythrocyte acid phosphatase restricted to the Ticuna Indians of Central Amazonas. *Ann Hum Genet* 1980;32:898-907.
 30. Mohrenweiser H, Novotny JE. ACP1GUA-1_A low-activity variant of human erythrocyte acid phosphatase: association with increase glutathione reductase activity. *Am J Hum Genet* 1982;34:425-433.
 31. Cavalli-Sforza LL, Menozzi P, Piazza A. In: NJ. Princeton University. *The history and geography of human genes*. Princeton: NJ. Princeton University Press, 1994.
 32. Dissing J. In: Brinkman B and Henningsen K, eds. *Advances in Forensic Haemogenetics Vol.1*. Berlin: Springer-Verlag, Berlin, 1986:127-131.
 33. Golden VL, Sensabaugh GE. Phenotypic variation in the phosphotransferase activity of human red cell acid phosphatase (ACP1). *Hum Genet* 1986;72:340-343.
 34. Eze LC, Tweedie MCK, Bullen MF, Wren PJJ, Evans DAP. Quantitative genetics of human red cell acid phosphatase. *Ann Hum Genet* 1974;37:333.
 35. Dissing J. Immunochemical characterization of human red cell acid phosphatase isozymes. *Biochem Genet* 1987;25:901-917.
 36. Swallow DM, Povey S, Harris H. Activity of the “red cell” acid phosphatase locus in other tissues. *Ann Hum Genet* 1973;37:31-38.
 37. Bryson GLM, Massa H, Trask BJ, Vanetten RL. Gene structure, sequence and chromosomal localization of the human red cell-type low-molecular-weight acid phosphotyrosyl phosphatase gene, ACP1. *Genomics* 1995;30:133-140.
 38. Lazaruk KDA. PhD dissertation: Molecular genetics of human red cell acid phosphatase. Berkeley, Univ. of California, 1995.
 39. Rudberk L, Dissing J, Lazaruk KDA, Sensabaugh G. Human 18KDa phosphotyrosine protein phosphatase (ACP1) polymorphism: studies of rare variants provide evidence that substitutions within or near alternative spliced exons affect splicing result. *Ann Hum Genet* 2000;64:107-116.
 40. Rigacci S, Rovida E, Bagnoli S, Dello Sbarba P, Berti A. Low M(r) phosphotyrosine protein phosphatase activity on fibroblast growth factor receptor is not associated with enzyme translocation. *FEBS Lett* 1999;459:191-194.
 41. Stein E, Lane AA, Cerretti DP et al. Eph receptors discriminate specific ligand oligomers to determine alternative signaling complexes, attachment, and assembly responses. *Genes Dev* 1998;12:667-678.
 42. Rovida E, Rigacci S, Paccagnini A, Sbarba PD, Berti A. The low-molecular-weight phosphotyrosine protein phosphatase, when overexpressed, reduces the mitogenic response to macrophage colony-stimulating factor and tyrosine phosphorylation of its receptor. *Biochem Res Commun* 1998;253:300-304.
 43. Drabkin D L, Austin J H. Spectrophotometric studies: I Spectrophotometric constants for common hemoglobin derivatives in human, dog and rabbit blood. *J Biol Chemistry* 1932;98:719.
 44. Marques E, Crespo ME, Silva ZI, Bicho M. Redox modulation of reductase and phosphatase activities in human erythrocytes. *Protoplasma* 1999; 206: 68-173.
 45. Dissing J, Dahl O, Svensmark O. Phosphoric and arsonic acids as inhibitors of human red cell acid phosphatase and their use in affinity chromatography. *Biochim Biophys Acta* 1979;569:159-176.
 46. Hay EM, Bacon PA, Gordon C et al. The BILAG index: a reliable and valid instrument for measuring clinical disease activity in systemic lupus erythematosus. *QJ Med* 1993;86:447-458.
 47. Isenberg DA, Gordon C. From BILAG to BLIPS – Disease activity assessment in Lupus: past, present and future. *Lupus* 2000;9:651-654.
 48. Mok CC, Lau CS. Pathogenesis of Systemic Lupus erythematosus. *J Clin Pathol* 2003;56: 481-90.
 49. Chiarugi P, Cirri P, Raugei G et al. PDGF receptor as a specific in vivo target for low Mr phosphotyrosine protein phosphatases. *FEBS Lett* 1995;372:49-53.
 50. Cirri P, Chiarugi P, Taddei L et al. Low molecular weight protein-tyrosine phosphatase tyrosine phosphorylation by c-Src during platelet-derived

- growth factor-induced mitogenesis correlates with its subcellular targeting. *J Biol Chem* 1998;273:32522-32527.
51. Rigacci S, Rovida E, Dello Sbarba P, Berti A. Low Mr Phosphotyrosine protein phosphatase associates and dephosphorylates p125-focal adhesion kinase, interfering with cell motility and spreading. *J Biol Vhem* 2002;277:41631-41636.
52. Caselli A, Taddei ML, Manao G, Camici G, Ramponi G. Tyrosine phosphorylate caveolin is a physiological substrate of the low Mr protein-tyrosine phosphatases. *J Biol Chem* 2001;276:18849-18854.
53. Parri M, Burichi F, Taddei ML et al. Ephrin A1 repulsive response is regulated by an EphA2 tyrosine phosphatase. *J Biol Chem* 2005;280:34008-34018.
54. Caselli A, Camici G, Manao G et al. Nitric oxide causes inactivation of the low molecular weight phosphotyrosine protein phosphatases. *J Biol Chem* 1994;269:24878-24882.
55. Caselli A, Marzocchini R, Camici G et al. The inactivation mechanism of low molecular weight phosphotyrosine protein phosphatase by H₂O₂. *J Biol Chem* 1998;273:32554-32560.
56. Kamata H, Hirata H. Redox regulation of cellular signalling. *Cell Signal* 1999;11:1-14.
57. Denu JM, Tanner KG. Specific and reversible inactivation of protein tyrosine phosphatases by hydrogen peroxide: evidence for a sulfenic acid intermediate and implications for redox regulation. *Biochemistry* 1998;37:5633-5642.
58. Hecht D, Zick Y. Selective inhibition of protein tyrosine phosphatase activities by H₂O₂ and vanadate in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;188:773-779.437: 263-266.
-

2nd Mediterranean Clinical Immunology Meeting

Turquia, Antalya
4-7 de Outubro de 2008

Data limite para envio de resumos:
1 de Julho de 2008

ACR/ARHP Annual Scientific Meeting

EUA, San Francisco
24-29 de Outubro de 2008

ESTUDO RAISE – ESTUDO OBSERVACIONAL, TRANSVERSAL, PARA AVALIAÇÃO DA REALIDADE ACTUAL DO IMPACTO SÓCIO-ECONÓMICO DA ESPONDILITE ANQUILOSANTE

Miranda L,^{*} Negreiro F,^{**} Queiroz MJ,^{*} Silva C^{**}

Resumo

Objectivos: Avaliar a relação entre as medidas de actividade, funcionalidade e de qualidade de vida (QV) com os custos suportados pelos doentes com espondilite anquilosante (EA) em Portugal.

Material e Métodos: Estudo observacional, transversal, realizado em doentes com diagnóstico de EA, independentemente do estadio da doença. Foram recolhidos dados sobre as características sócio-demográficas, consumo de recursos em saúde e escalas de actividade, funcionalidade e QV: *Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index* (BASDAI), *Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index* (BASFI), *Health Assessment Questionnaire* (HAQ) e EQ-5D incluindo *Visual Analogue Scale* (VAS).

Resultados: Foram incluídos 127 doentes, dos quais 67,7% eram do sexo masculino, com uma média de idades de 48,7 anos (min-máx: 22-75 anos). Dos doentes empregados, 20,6% necessitaram modificar a sua actividade profissional devido à EA. A duração média da doença foi de 14,4 anos. Verificou-se, no último ano, que 85,0% dos doentes foram, em média, a 7 consultas devido à EA; 89,0% e 67,7% efectuaram exames laboratoriais e outros exames complementares, respectivamente; 67,5% realizaram tratamentos de fisioterapia; 3,1% foram internados e 85,8% estavam medicados para a EA. O custo total mediano suportado por doente com EA foi 525 €. Verificaram-se as seguintes pontuações médias: 5 no BASDAI, 4,9 no BASFI, 1,1 no HAQ e 58,7 na VAS. Observou-se uma correlação estatisticamente significativa entre o custo total com a doença suportado pelo doente e as escalas BASDAI ($r=0,257$; $p=0,004$) e HAQ ($r=0,299$; $p=0,010$).

Conclusões: Os resultados apontam no sentido de que um pior estado de saúde se traduz num custo mais elevado para os doentes.

Palavras-chave: Espondilite Anquilosante; Qualidade de vida; Custos em saúde; Actividade; Funcionalidade.

Abstract

Objectives: Evaluate the relationship between activity, functional and quality of life (QoL) measures with the costs supported by the Portuguese patients with ankylosing spondylitis (AS) in Portugal.

Methods and Materials: Observational and cross-sectional study, performed in patients with AS diagnosis, independent from the stage of the disease. Sociodemographics data, use of health resources, activity, functional and QoL scales were collected: *Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index* (BASDAI), *Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index* (BASFI), *Health Assessment Questionnaire* (HAQ) and EQ-5D including *Visual Analogue Scale* (VAS).

Results: 127 patients were included, of whom 67.7% were male, with an average age of 48.7 years (range: 22-75 years). Among employed patients, 20.6% needed to modify their professional activity due to AS. The mean duration of the disease was 14.4 years. It was observed, in the last year, that 85.0% of the patients performed on average 7 visits to the physician due to AS; 89.0% and 67.7% performed laboratory analysis and other exams respectively; 67.5% performed physiotherapy treatments; 3.1% were hospitalized and 85.8% were taking medication for AS. The median total cost supported by an AS patient was 525 €. It was observed the following average scores: 5 in BASDAI, 4.9 in BASFI, 1.1 in HAQ and 58.7 in VAS. It was observed a statistically significant correlation between the total cost with the disease supported by the patient and BASDAI ($r=0.257$; $p=0.004$) and HAQ ($r=0.299$; $p=0.010$) scales.

Conclusions: The results indicate that a worst state of health turn into a higher cost for the patients.

^{*}Instituto Português de Reumatologia, Lisboa

^{**}Eurotrials – Consultores Científicos, Lisboa

Keywords: Ankylosing Spondylitis; Quality of life; Health care costs; Activity; Functionality.

Introdução

A Espondilite Anquilosante (EA) é uma doença reumática sistémica inflamatória que pertence a um grupo de patologias, designadas por espondiloartropatias seronegativas (EASN), que apresentam uma série de características clínicas semelhantes, nomeadamente forte envolvimento do esqueleto axial, artrite periférica assimétrica dos membros inferiores, nomeadamente a nível das enteses, presença de sacroiliíte radiológica, ausência de factor reumatóide, envolvimento extra-articular, como seja a uveíte anterior (30%), predisposição genética e associação com o antigénio de histocompatibilidade HLA-B27, que se encontra presente entre 50 a 95% dos doentes com EA.¹⁻⁴ Estas doenças podem ser difíceis de diferenciar uma vez que podem ocorrer simultânea ou sequencialmente.^{1,4}

Dados epidemiológicos recentes referem taxas de prevalência similares entre a artrite reumatóide (AR) e todo o grupo das EASN (0,6-1,9%),^{5,6} tendo a EA uma prevalência de 0,1-1,4%.^{7,8} Em Portugal, não existem dados robustos sobre a prevalência das EASN, embora a bibliografia existente aponte para uma prevalência de EA de 0,3%.⁹

O impacto económico das doenças reumáticas é uma área de estudo e de importância social cada vez mais evidente. Se o paradigma das doenças reumáticas é a AR, sabe-se por alguns trabalhos realizados anteriormente que os custos da EA se encontram próximos dos da AR¹⁰ apesar de, em termos laborais, os doentes com EA apresentarem maior taxa de emprego que os com AR.¹¹

Relativamente ao impacto sócio-económico fala-se, em primeiro lugar, da incapacidade de manter um emprego, sendo este valor monetário associado a perda de produtividade. Em segundo lugar, surge o custo directo com a utilização de recursos de saúde, e por fim o impacto que a EA tem na qualidade de vida e bem-estar psicológico, que não pode ser expresso em termos monetários, e que se expressa como custos intangíveis.¹¹

Objectivos

Este estudo teve como objectivos: avaliar as medidas de actividade (BASDAI), funcionalidade (BAS-

FI), qualidade de vida (HAQ, EQ-5D e VAS) e os custos, com a doença, suportados pelos doentes com EA em Portugal; analisar a relação entre as diversas medidas; analisar a relação entre custos e as medidas de actividade, funcionalidade e de qualidade de vida, em Portugal.

Material e Métodos

Este estudo observacional, transversal, com uma observação temporal, foi conduzido para avaliar a realidade actual do impacto sócio-económico da EA.

A amostra do estudo incluiu todos os doentes que referiram ter-lhes sido diagnosticado EA e disponíveis para entrevista em qualquer uma das reuniões promovidas pela Associação Nacional da Espondilite Anquilosante (ANEA), entre Fevereiro e Junho de 2005, nos núcleos regionais mais activos e com maior número de sócios (Braga, Ovar, Viseu, Cova da Beira, Leiria e Lisboa).

Foram recolhidos dados relativos a características sócio-demográficas, consumo de recursos em saúde, assistência informal ao doente por parte de terceiros e medidas de actividade (BASDAI), funcionalidade (BASFI) e qualidade de vida (HAQ e EQ-5D incluindo VAS) do doente. Estas escalas foram escolhidas pela sua reprodutibilidade mas também pela sua consistência interna.¹²⁻¹⁵ As escalas BASDAI, BASFI e HAQ não estão validadas para Português.

A recolha dos dados foi realizada através de entrevista, conduzida por estudantes de Sociologia da Universidade Nova de Lisboa, que se deslocaram de Lisboa para essas reuniões, através de um questionário especificamente desenhado para o estudo com questões dirigidas aos doentes e aos seus prestadores de cuidados de saúde.

Medidas de actividade, funcionalidade e qualidade de vida

BASDAI

Esta escala é constituída por escalas visuais analógicas, pontuadas de 0 (ausente) a 10 (muito intenso), para avaliar 5 sintomas *major* da EA («fadiga e cansaço», «dor no pescoço, costas ou anca», «dor ou inchaço nas articulações», «incómodo nas zonas dolorosas ao tacto ou à pressão» e «rigidez matinal») e a duração da rigidez matinal. A pontuação final BASDAI varia entre 0 e 10, em que valores mais elevados correspondem a uma maior actividade da doença.¹²

BASFI

Esta escala inclui 8 questões relacionadas com a anatomia funcional («colocar meias ou collants», «dobrar-se», «chegar a prateleira», «levantar-se de cadeira», «dar volta na cama», «manter-se de pé», «subir degraus» e «olhar para trás sem rodar o corpo») e 2 questões que avaliam a capacidade do doente em realizar as actividades diárias («tarefas com esforço físico» e «completar tarefas»), cada uma respondida através de uma escala visual analógica pontuada de 0 (fácil) a 10 (impossível).

A pontuação final BASFI varia entre 0 e 10, em que valores mais elevados correspondem a uma maior incapacidade do doente.¹³

HAQ

Este questionário é constituído por 20 itens, divididos em 8 categorias de limitações funcionais («vestir-se e arranjar-se», «levantar-se», «comer», «caminhar», «higiene», «alcançar», «preensão» e «actividades»). Os doentes classificam de 0 a 3 o grau de dificuldade que sentem quando realizam cada um dos itens específicos (0= «sem qualquer dificuldade», 1= «com alguma dificuldade», 2= «com muita dificuldade» e 3= «incapaz»).¹⁴

A pontuação final HAQ varia de 0 a 3, em que valores mais elevados correspondem a uma maior incapacidade do doente.

EQ-5D

Nesta escala, adaptada e validada para a língua portuguesa, o doente assinala o seu estado de saúde em cada uma das cinco categorias («mobilidade», «cuidados pessoais», «actividades habituais», «dor/mal estar» e «ansiedade/depressão») classificando cada uma delas como «sem problemas», «alguns problemas» ou «problemas graves».¹⁵

VAS

Esta escala, adaptada e validada para a língua portuguesa, mede o estado de saúde do doente e é representada por uma linha de 0 a 100, onde o «pior estado de saúde imaginável» é assinalado em 0 e o «melhor estado de saúde imaginável» em 100.¹⁵

Custos

Os custos apresentados são referentes aos custos suportados pelos doentes inquiridos no último ano em consultas, exames laboratoriais e outros exames complementares, tratamentos de fisioterapia, internamento, internamento para reabilitação, medicação e outras despesas (deslocações, esta-

dias fora de casa, assistência domiciliária e outras). Todos os custos, excepto os da medicação, foram referidos pelo próprio doente. Os custos para a medicação foram calculados com base na posologia indicada pelo doente e de acordo com os preços disponibilizados por fontes oficiais,¹⁶ que correspondem ao preço máximo desses medicamentos.

Análise estatística

As variáveis quantitativas foram descritas através de estatísticas descritas (média, mediana, desvio padrão (DP), mínimo e máximo) e as variáveis qualitativas foram sumariadas através de frequências absolutas (n) e relativas (%). O coeficiente de correlação de Spearman foi calculado para analisar a associação entre as escalas BASDAI, BASFI, HAQ e VAS e a associação entre custos e escalas.

Todos os testes estatísticos foram efectuados bilateralmente, considerando-se um nível de significância de 5%. A análise estatística foi efectuada utilizando-se o *software* estatístico SPSS versão 13.0.

Resultados

Incluíram-se neste estudo um total de 127 doentes, 86 homens (67,7%) e 41 mulheres (32,3%), com idades compreendidas entre os 22 e os 75 anos e uma média de 48,7 anos, verificando-se a percentagem mais elevada (31,0%) de doentes no grupo etário dos 35 aos 44 anos. A maioria dos inquiridos era casada (80,3%), vivia com a família adquirida (82,7%) e referiu ter um nível de escolaridade inferior ou igual ao ensino básico (62,9%).

Impacto da EA na situação profissional

Os 68 (53,6%) inquiridos que se encontravam empregados referiram um número mediano de 5 dias de trabalho perdidos, no último ano. Verificou-se ainda que, destes 68 inquiridos, cerca de um quinto modificou a sua actividade devido à EA, sendo a redução do horário de trabalho, a mudança de funções e de profissão as principais mudanças registadas (em 35,7%, 14,3% e 14,3% dos inquiridos que referiu ter modificado a actividade devido à EA, respectivamente).

Dos doentes inquiridos, 37 (29,1%) deixaram de trabalhar devido à EA, dos quais 34 ficaram reformados e 3 desempregados.

Cerca de 31% dos inquiridos receberam algum tipo de indemnização (reforma de invalidez, subsídio, *etc.*) devido à EA.

Quadro I. Caracterização da doença

	Total (n=127)
Idade à data de diagnóstico (anos)	
Média ± DP	34,5 ± 11,4
Mediana (Mín-Máx)	33,5 (11-64)
Duração da EA desde o diagnóstico (anos)	
Média ± DP	14,4 ± 10,3
Mediana (Mín-Máx)	12,5 (0-45)
Duração da EA desde 1º episódio (anos)	
Média ± DP	24,8 ± 12,9
Mediana (Mín-Máx)	25,0 (2-55)
Atraso no diagnóstico (anos)	
Média ± DP	10,3 ± 9,3
Mediana (Mín-Máx)	8,0 (0-39)
Patologias concomitantes, n (%)	
Diabetes	8 (11,3%)
Doenças respiratórias	13 (18,3%)
Doenças cardiovasculares*	14 (19,7%)
Hipertensão	22 (31,0%)
Doenças do aparelho digestivo	29 (40,8%)
Outras	32 (45,1%)

DP – Desvio padrão; Mín – Mínimo; Máx – Máximo.

*Excluindo a hipertensão.

Caracterização da EA

De acordo com a Quadro I, os doentes inquiridos apresentavam uma média de idades à data de diagnóstico de 34,5 anos, variando entre os 11 e os 64 anos.

A duração média da doença foi de 14,4 anos desde o diagnóstico e de 24,8 anos desde o presumível primeiro episódio, resultando num atraso médio de 10,3 anos no diagnóstico.

De acordo com a Quadro II, verificou-se um BASDAI médio de 5. Das 6 categorias do BASDAI, a «dor no pescoço, costas ou anca» foi o sintoma que registou maior intensidade (pontuação média: 6,3). Relativamente à escala BASFI observou-se uma pontuação média de 4,9, apresentando «olhar para trás sem rodar o corpo» a menor funcionalidade (pontuação média: 6,7). Em média, os doentes referiram sentir alguma dificuldade em realizar as actividades diárias registando um HAQ médio de 1,1 (Quadro II). Das 8 categorias do HAQ, «alcançar» foi a que apresentou percentagem mais elevada de doentes (89%) com algum grau de dificuldade (Figura 1). Das cinco categorias do EQ-5D

Quadro II. Medidas de actividade, funcionalidade e qualidade de vida

	Total (n=127)
BASDAI (0-10)	
Média ± DP	5,0 ± 2,4
Mediana (Mín-Máx)	5,1 (0-10)
BASFI (0-10)	
Média ± DP	4,9 ± 2,3
Mediana (Mín-Máx)	5,0 (0-9,6)
HAQ (0-3)	
Média ± DP	1,1 ± 0,6
Mediana (Mín-Máx)	1,1 (0-2,4)
VAS (0-100)	
Média ± DP	58,7 ± 22,6
Mediana (Mín-Máx)	60,0 (0-100)

DP – Desvio padrão; Mín – Mínimo; Máx – Máximo.

(Figura 2), a «dor/mal estar» registou a percentagem mais elevada (78%) de doentes inquiridos com algum tipo de problemas ou problemas graves e os «cuidados pessoais» a que apresentou a menor percentagem (41%). O total de doentes inquiridos apresentou um VAS médio de 58,7 (Quadro II) e cerca de 62% apresentou um VAS superior a 50.

Consumo de recursos em saúde

No ano anterior à realização do questionário, 85,0% dos doentes foram em média a 7 consultas devido à EA, sendo as mais frequentes as consultas de reumatologia, clínica geral e fisioterapia. Aproximadamente 89% e 68% dos inquiridos efectuaram exames laboratoriais e outros exames complementares, respectivamente e 67,5% realizaram tratamentos de fisioterapia. Apenas 3,1% dos doentes necessitaram de internamento no último ano, apresentando cada um deles, em média, cerca de 2 internamentos (Quadro III). Em 75,0% dos casos os internamentos foram realizados em Estruturas Públicas (incluindo Hospitais S.A.).

A maioria dos doentes (85,8%) estavam a tomar medicação para o tratamento da patologia em causa, sendo os AINEs os mais utilizados (56,7%), seguidos dos DMARDs (26,8%), analgésicos (4,7%), corticóides (3,9%) e relaxantes musculares (2,4%). Aproximadamente 13% dos doentes referiu estar a tomar protectores gástricos.

Custos suportados pelo doente

Os custos suportados pelo doente relativamente ao

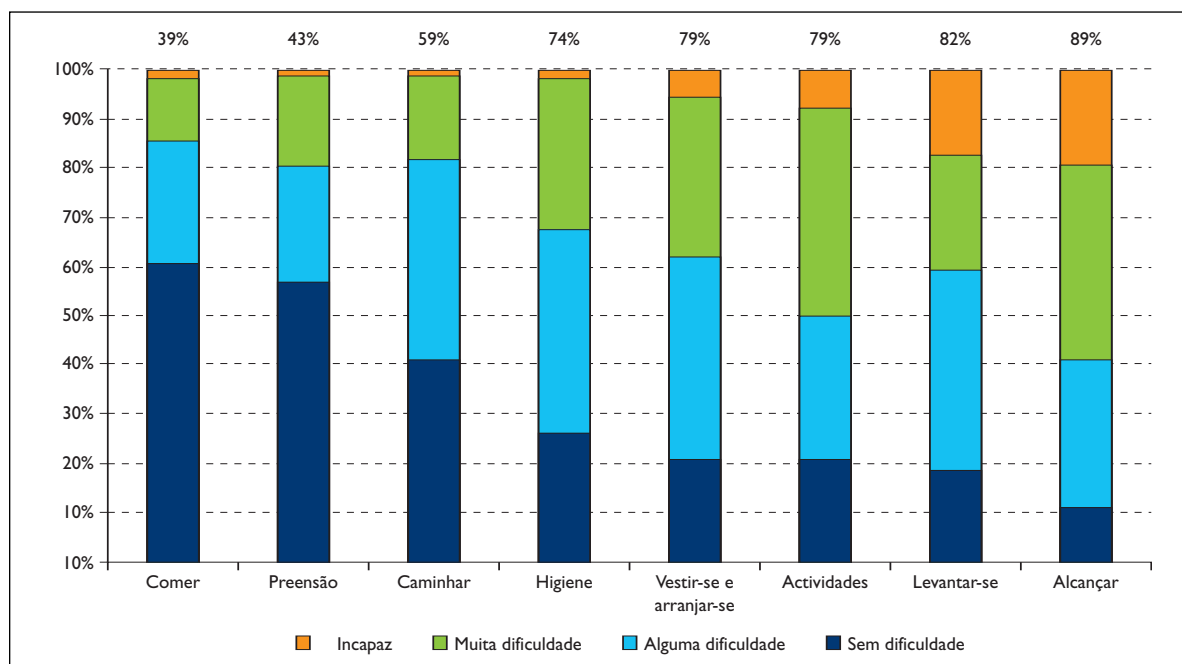


Figura 1. Escala HAQ (a percentagem apresentada no topo de cada barra representa a percentagem de doentes com alguma dificuldade, muita dificuldade ou incapaz).

tratamento da EA, durante o último ano, encontram-se descritos na Quadro IV. O custo total médio/mediano, com a doença, suportado pelos doentes foi de cerca de 1.367 /525 €. Os tratamentos de fisioterapia e as deslocações para o local de tratamento foram os recursos em saúde com maior peso relativamente ao custo total médio suportado pelo doente. A medicação para a EA foi o recurso em saúde que registou maior peso relativamente ao custo total mediano suportado pelo doente.

Os valores médios e medianos dos custos analisados apresentaram-se consideravelmente diferentes, verificando-se valores medianos iguais a zero na maioria dos consumos de recursos em saúde. Tal deve-se ao facto de muitos dos doentes terem referido não suportar nenhum custo para alguns desses recursos e muitas das necessidades básicas do tratamento da EA se encontrarem em grande parte comparticipadas pelo Sistema Nacional de Saúde.

Correlação entre escalas e custos

Verificaram-se correlações estatisticamente significativas entre as escalas BASDAI, BASFI, HAQ e VAS ($p < 0,001$). As escalas BASDAI, BASFI e HAQ foram as que apresentaram correlações mais elevadas (com coeficientes de correlação superiores

a 0,63), registando-se a correlação mais forte ($r = 0,820$; $p < 0,001$) entre as escalas HAQ e BASFI. A VAS apresentou correlações negativas com as escalas BASDAI, BASFI e HAQ o que significa que valores mais elevados de VAS estão tendencialmente associados a valores mais baixos nas outras três escalas (Quadro V).

Relativamente à correlação entre custos e escalas, verificou-se existir uma correlação estatisticamente significativa entre o custo total, com a doença, suportado pelo doente e BASDAI ($r = 0,257$; $p = 0,004$) e entre o custo total e HAQ ($r = 0,229$; $p = 0,010$).

Considerando-se apenas o custo da medicação para a EA, verificou-se a existência de uma correlação estatisticamente significativa entre este custo e HAQ, BASFI e BASDAI (respectivamente, $r = 0,297$, $r = 0,275$ e $r = 0,276$; $p < 0,010$).

Estes resultados apontam no sentido de que um pior estado de saúde do doente se traduz num custo mais elevado suportado pelo doente.

Discussão

A maioria dos doentes incluídos era do sexo masculino, verificando-se uma elevada percentagem

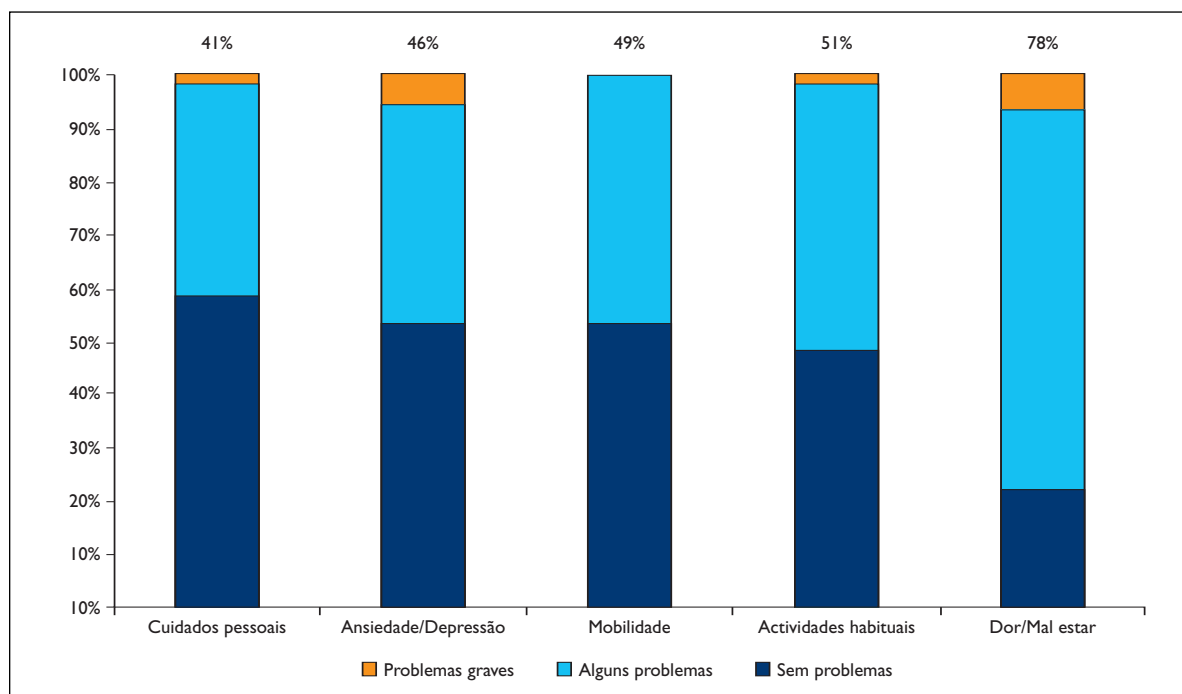


Figura 2. Escala EQ-5D (a percentagem apresentada no topo de cada barra representa a percentagem de doentes com alguns problemas ou problemas graves)

de doentes no grupo etário dos 35 aos 44 anos. Este perfil mostra-se semelhante ao referido em outros estudos. Nesta amostra de doentes, verificou-se um atraso médio no diagnóstico de 10 anos. Este valor mostra-se superior ao documentado em outros países, o que poderá ter implicações futuras na incapacidade destes doentes.¹⁷⁻¹⁹

Em termos laborais, embora aproximadamente metade dos doentes se encontrasse empregada, 20,6% necessitaram modificar a sua actividade (*e.g.* tipo de função, horas de trabalho) e 29,1% deixaram de trabalhar devido à EA. Sabe-se que o abandono laboral é progressivo com a evolução da doença, verificando-se que 33% dos doentes deixam de trabalhar 20 anos após o diagnóstico da doença.²⁰ O impacto desta doença no contexto laboral é porventura mais elevado do que em outras doenças reumáticas sistémicas uma vez que os doentes com EA encontram-se maioritariamente no seu período de vida activa. Alguns estudos apontam para a existência de diferenças, entre países, relativamente à incapacidade laboral devido à EA. Num estudo realizado na Finlândia, cerca de 10 a 15% dos doentes apresentaram incapacidade laboral.²¹ Num outro estudo realizado no Reino Unido, verificou-se que 41% necessitaram de mo-

dificar a sua actividade profissional por causa da EA.²² Um outro estudo, realizado no mesmo país, mostrou que 31% dos doentes apresentavam incapacidade laboral e 15% teve de modificar a sua actividade.²³ Em quatro países (EUA, Holanda, França e Bélgica), a percentagem de doentes com incapacidade laboral variou entre 9 e 41%, com um nível médio de absentismo de 6 a 19 dias por ano.^{24,25}

No estudo em análise, o custo total médio/mediano anual suportado pelo doente foi de 1.367 /525 €. Os tratamentos de fisioterapia representaram o maior encargo (37,6%) seguido das deslocações para os tratamentos (23,3%) e a assistência domiciliária por conta própria (18,2%). A medicação só foi responsável por 5,5% dos custos directos com a doença. Os valores médios e medianos dos custos analisados apresentaram-se consideravelmente diferentes, verificando-se valores medianos iguais a zero na maioria dos consumos de recursos em saúde. Tal deve-se ao facto de muitos dos doentes terem referido não suportar nenhum custo para alguns desses recursos.

Dado que os tratamentos de fisioterapia são o encargo com maior peso para os doentes, conclui-se que as necessidades básicas do tratamento da EA (consultas de reumatologia, exames comple-

Quadro III. Consumo de recursos

	n (%)	Média	Mediana
Consumo de recursos em saúde, último ano			
Consultas	108 (85,0%)	7,0	4,0
Exames laboratoriais	113 (89,0%)	4,9	4,0
Outros exames complementares	86 (67,7%)	3,5	3,0
Fisioterapia	85 (67,5%)	155,9	108,0
Internamento	4 (3,1%)	1,5	1,5
Internamento – HD	8 (7,3%)	3,5	3,0
Internamento – reabilitação	1 (0,8%)	–	–
Internamento – reabilitação em HD	1 (0,9%)	–	–
Outros consumos, último ano			
Estadias fora de casa, dias	6 (4,7%)	5,0	3,5
Assistência domiciliária – por conta própria, horas/semana	10 (7,9%)	25,9	8,5
Assistência domiciliária – assistência social, horas/semana	2 (1,6%)	2,0*	2,0*
Outros	30 (24,2%)	–	–
Deslocações para locais de tratamento, último ano	102 (80,3%)	61,5	16,0
Distância, em Km	–	71,9	34,0

HD - Hospital de dia.

*Apenas um doente referiu o número de horas por semana.

Quadro IV. Custos suportados pelo doente devido à EA, no último ano

	% de doentes com encargos	Custo médio	%*	Custo mediano
Consultas	32,3%	77	5,6%	0
Exames laboratoriais	13,4%	10	0,7%	0
Outros exames complementares	14,2%	20	1,5%	0
Fisioterapia	43,3%	514	37,6%	0
Internamento	0,8%	1	0,1%	0
Internamento - reabilitação	0,0%	0	0,0%	0
Medicação	55,9%	75	5,5%	24
Deslocações para local de tratamento	50,4%	318	23,3%	3
Estadias fora de casa	0,8%	3	0,2%	0
Assistência domiciliária - por conta própria	3,9%	249	18,2%	0
Assistência domiciliária - assistência social	0,0%	0	0,0%	0
Outros	22,0%	112	8,2%	0
Custo total	–	1.367	–	525

* Percentagem relativa ao custo médio total.

mentares e medicação) encontram-se, em grande parte, comparticipadas pelo Sistema Nacional de Saúde.

O custo do tratamento da doença poderá ser alterado no futuro através da introdução dos agentes biológicos que, sendo mais eficazes, serão cada vez mais utilizados em 1ª linha e cujos custos irão eventualmente aumentar os gastos directos do

doente ou do Sistema Nacional de Saúde.¹⁰

Os resultados obtidos nas diferentes escalas demonstram que na amostra escolhida se encontravam doentes com EA em diversos estadios da doença, embora, em média o seu estado de saúde se mantivesse num nível intermédio.

Um ponto importante é a presença de uma VAS de dor perto de 50 o que reflecte o que está descri-

Quadro V. Correlação entre escalas e custos

	R	Valor p
BASFI vs BASDAI	0,626	<0,001
HAQ vs BASDAI	0,637	<0,001
HAQ vs BASFI	0,820	<0,001
VAS vs BASDAI	-0,469	<0,001
VAS vs BASFI	-0,425	<0,001
VAS vs HAQ	-0,425	<0,001
Custo total vs BASDAI	0,257	0,004
Custo total vs BASFI	0,137	0,129
Custo total vs HAQ	0,229	0,010
Custo total vs VAS	-0,077	0,393
Custo em medicação vs BASDAI	0,276	0,002
Custo em medicação vs BASFI	0,275	0,002
Custo em medicação vs HAQ	0,297	0,001
Custo em medicação vs VAS	-0,165	0,065

R – Coeficiente de correlação de Spearman.

to que mesmo em populações com longa evolução da EA a dor e a rigidez continuam presentes e são fonte de incapacidade física e psicológica.²⁶

Verificou-se uma forte correlação entre o custo total e as escalas BASDAI e HAQ, o que aponta no sentido de que um pior estado de saúde se traduz num custo, suportado pelo doente, mais elevado. No entanto, os coeficientes de correlação não se revelaram muito fortes o que poderá significar que os custos suportados pelo doente espondilítico podem depender de outros factores para além do estado de saúde do doente.

Embora neste estudo se tenham recolhido dados sobre o impacto que a patologia causa junto de terceiros, tais não foram utilizados na análise, uma vez que não se conseguiu obter um número significativo de participantes que prestavam cuidados de saúde aos doentes com EA.

O método de selecção dos doentes utilizado (apenas os disponíveis para entrevista em reuniões promovidas pela ANEA) poderá constituir uma limitação deste estudo. As características desta amostra poderão encontrar-se enviesadas comparativamente às características da população de doentes com EA portugueses. Uma das possíveis causas da amostra apresentar uma baixa percentagem de idosos poderá estar relacionada com o facto destes terem dificuldade em se deslocar para participar nestas reuniões. Uma vez que esta amostra poderá apresentar idades ligeiramente diferentes das da população portuguesa de doentes com

EA, os custos aqui apresentados poderão estar subestimados dada a previsível comorbilidade relacionada com a doença associada à idade.

Uma outra limitação deste estudo prende-se com o facto de não ter havido uma verificação do diagnóstico de EA, sendo este apenas confirmado pelo inquirido. No entanto, e uma vez que os inquiridos são sócios da ANEA, a informação recolhida torna-se muito mais fidedigna relativamente ao diagnóstico do que se fosse recolhida através de um inquérito de rua.

Serão necessários estudos adicionais que, com uma amostra de maior dimensão representativa da população portuguesa de doentes com EA, consigam estimar custos indirectos relativos à produtividade, absentismo e incapacidade laboral dos doentes e dos seus prestadores de cuidados de saúde, para uma melhor caracterização do impacto desta doença na sociedade portuguesa.

Conclusões

Relativamente a outras publicações, os doentes deste estudo apresentaram maior percentagem de reformados devido à doença e menores custos associados. Contudo, dado o rendimento *per capita* do nosso país, tal pode revelar um esforço familiar superior ao de outros países. Os custos em Portugal com a EA decorrem em primeiro lugar de tratamentos de fisioterapia e de deslocações, o que demonstra que as necessidades básicas de seguimento e terapêutica estão assumidas em grande parte pelo Serviço Nacional de Saúde. Será importante equacionar um racional de custo-eficácia dos tratamentos de fisioterapia na EA, e se tal for favorável deverão ser fornecidas formas de realização desses mesmos programas que incluam o transporte.

Os custos associados à EA seriam mais elevados se tivessem sido considerados os custos relativos à produtividade laboral e à prestação de cuidados de saúde por parte de terceiros.

A maioria dos doentes inquiridos encontrava-se abrangida pelo Sistema Nacional de Saúde e os custos referidos neste estudo referem-se apenas aos custos suportados pelo doente.

Agradecimentos

Agradece-se o apoio da Associação Nacional de Espondilite Anquilosante (ANEA) e a colaboração do grupo de estudantes de Sociologia da Universidade Nova de Lisboa.

Correspondência para:

Maria João Queiroz
 Rua Tierno Garvan, Torre 3, Piso 16, 1070-276 Lisboa
 Fax: 21 382 54 52
 E-mail: m.joaoqueiroz@eurotrials.pt

Referências:

1. Yu David. Preface. *Rheum Dis Clin of North America*, 01 November 1998 V-24;4:XV-XVI.
2. Maksymowych W P. Novel therapies in the treatment of spondyloarthritis. *Expert Opin Investig Drugs* 2002;11:937-946.
3. Braun J, Brandt J, Listing J et al. Treatment of active ankylosing spondylitis with infliximab: a randomised controlled multicentre trial. *Lancet* 2002;359:1187-1193.
4. Brandt J, Haibel H, Cornely D et al. Successful treatment of active ankylosing spondylitis with the anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody infliximab. *Arthritis Rheum* 2000;43:1346-1352.
5. Toussiot E, Wendling D. Recent progress in ankylosing spondylitis treatment. *Expert Opin Pharmacother* 2003;4:1-12.
6. Sieper J, Braun J. New treatment options in ankylosing spondylitis: a role for anti-TNFalpha therapy. *Ann Rheum Dis* 2001;60:58-61.
7. Braun J, Brandt J, Listing J, Rudwaleit M, Sieper J. Biologic therapies in the spondyloarthritis: new opportunities, new challenges. *Curr Opin Rheumatol* 2003;15:394-407.
8. Braun J, van der Heijde D. Novel approaches in the treatment of ankylosing spondylitis and other spondyloarthritis. *Expert Opin Investig Drugs* 2003;12:1097-109.
9. Rede de referência hospitalar de reumatologia; Ministério da Saúde; Direcção Geral de Saúde; Direcção de serviços de planeamento. Lisboa: Direcção-Geral da Saúde, 2003 – página 5.
10. Verstappen SM, Jacobs JW, van der Heijde DM et al. Utility and direct costs: ankylosing spondylitis compared with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2007;66:727-731.
11. Sieper J, Braun J, Rudwaleit M, Boonen A, Zink A. Ankylosing spondylitis: an overview *Ann Rheum Dis* 2002;61:8-18.
12. Garrett S, Jenkinson T, Kennedy LG, Whitelock H, Gaisford P, Calin A. A new approach to defining disease status in ankylosing spondylitis: The Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index. *J Rheumatol* 1994;21:2286-2291.
13. Calin A, Nakache JP, Gueguen A et al. A new approach to defining functional ability in Ankylosing Spondylitis: The development of the Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index. *J Rheumatol* 1994;21:2281-2285.
14. Bruce B, Fries J. The Stanford health assessment questionnaire (HAQ): a review of its history, issues, progress, and documentation. *J Rheumatol* 2003;30:167-178.
15. EQ-5D available versions (May 2006). Disponível em <http://www.euroqol.org/>. Acessibilidade verificada (Agosto 2006).
16. Infarmed. Infomed - Medicamentos de uso Humano. Disponível em <http://www.infarmed.pt/info-med/inicio.php>. Acessibilidade verificada (Agosto 2006).
17. Khan MA. Ankylosing spondylitis: introductory comments on its diagnosis and treatment. *Ann Rheum Dis* 2002;61:3-7.
18. Ward MM. Functional disability predicts total costs in patients with ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum* 2002;46:223-231.
19. Boonen A, van der Heijde D, Landewé R et al. Work status and productivity costs due to ankylosing spondylitis: comparison among three European countries. *Ann Rheum Dis* 2002;61:429-437.
20. Boonen A, Chorus A, Miedema H et al. Withdrawal from labour force due to work disability in patients with ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 2001;60:1033-1039.
21. Currence S, Graham D, Little H, Rubenstein J, Rosen P. The natural disease course of ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum* 1983;26:186-190.
22. Wordsworth BP, Mowat AG. A review of 100 patients with ankylosing spondylitis with particular reference to socio-economic effects. *Br J Rheumatol* 1986;25:175-180.
23. Barlow JH, Wright CC, Williams B, Keat A. Work disability among people with ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum* 2001;45:424-429.
24. Boonen A, van der Heijde D, Landewe R et al. Direct costs of ankylosing spondylitis and its determinants: an analysis among three European countries. *Ann Rheum Dis* 2003;62:732-740.
25. Boonen A, van den Heuvel R, van Tubergen A et al. Large differences in cost of illness and wellbeing between patients with fibromyalgia, chronic low back pain, or ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 2005;64:396-402.
26. Gran JT, Skomsvoll JE. The outcome of ankylosing spondylitis: a study of 100 patients *Br J Rheumatol* 1997;36:766-771.

A CAPILAROSCOPIA DO LEITO UNGUEAL NA AVALIAÇÃO PROGNÓSTICA DO FENÓMENO DE RAYNAUD E DA DOENÇA INDIFERENCIADA DO TECIDO CONJUNTIVO

Sara Cortes,* Paulo Clemente-Coelho**

Resumo

Introdução: As alterações microvasculares envolvidas na patogénese de várias doenças do tecido conjuntivo podem ser detectadas pela capilaroscopia do leito ungueal.

Objectivo: Avaliar, em doentes com fenómeno de Raynaud ou com doença indiferenciada do tecido conjuntivo, o interesse dos resultados da capilaroscopia e a sua correlação com a evolução diagnóstica e alterações na terapêutica.

Métodos: Selecção dos resultados capilaroscópicos e laboratoriais de doentes enviados com os diagnósticos de fenómeno de Raynaud (sem diagnóstico de doença definida do tecido conjuntivo) ou de doença indiferenciada do tecido conjuntivo. Comparação do diagnóstico e terapêutica actuais com os existentes à data da capilaroscopia.

Resultados: Incluídos 80 doentes, com idade $51,4 \pm 14,3$ anos (média $\pm$ dp), 78 do sexo feminino (97,5%), com: fenómeno de Raynaud mais doença indiferenciada do tecido conjuntivo – 27 doentes (33,8%); fenómeno de Raynaud – 46 (57,5%); doença indiferenciada do tecido conjuntivo – 7 (8,7%).

Resultados da capilaroscopia foram: normal – 30 doentes (37,5%); alterações ligeiras (tortuosidade e/ou alargamento) – 16 (20,0%); alterações significativas – 34 (42,5%) (hemorragias – 25 doentes (31,3%); megacapilares – 26 (32,5%); áreas avasculares – 3 (3,8%). Após capilaroscopia ocorreu introdução de novos tratamentos em 32 doentes (40,0%) e um novo diagnóstico em 39 (48,8%). As alterações *maior* na capilaroscopia correlacionaram-se com a evolução diagnóstica e a introdução de nova medicação ($p < 0,0001$).

Conclusão: A capilaroscopia em doentes com fenómeno de Raynaud ou com doença indiferenciada do

tecido conjuntivo tem um papel na avaliação prognóstica relacionada com a possibilidade de uma evolução no diagnóstico ou para a necessidade de introdução de novos tratamentos.

Palavras-Chave: Capilaroscopia; Raynaud; Conjuntivo; Indiferenciada; Prognóstico.

Abstract

Background: Microvascular abnormalities involved in the pathogenic mechanism of several connective tissue disorders can be detected by nailfold capillaroscopy.

Objectives: Evaluation of the interest of nailfold capillaroscopy results in patients with Raynaud's phenomenon or undifferentiated connective tissue disease and their correlation with diagnostic and therapeutic evolution.

Methods: Selection of capillaroscopic and laboratory results of patients with the diagnosis of Raynaud's phenomenon (without defined connective tissue disease) or undifferentiated connective tissue disease. Evaluation of the present diagnosis and treatment comparing with the ones existed at the time of capillaroscopy performance.

Results: 80 patients were enrolled, with an age of 51.4 ± 14.3 years (mean $\pm$ SD), 78 females (97.5%) with: Raynaud's phenomenon and undifferentiated connective tissue disease – 27 patients (33.8%); Raynaud's Phenomenon – 46 patients (57.5%); undifferentiated connective tissue disease – 7 patients (8.7%). The capillaroscopic results were: normal – 30 patients (37.5%); minor changes (tortuosity, enlargement) – 16 patients (20.0%); major changes – 34 patients (42.5%) (hemorrhages – 25 patients (31.3%); megacapillaries – 26 patients (32.5%); avascular areas – 3 patients (3.8%).

The introduction of new treatments after the capillaroscopy occurred in 32 patients (40.0%) and a new

*Instituto Português de Reumatologia (IPR), Lisboa Portugal

**Responsável da Unidade de Técnica de Capilaroscopia do IPR e da Consulta de Fenómeno de Raynaud/Esclerose Sistémica

diagnosis was done in 39 patients (48.8%).

Major changes in capillaroscopy correlated with the change of diagnosis and the introduction of a new treatment ($p < 0.0001$).

Conclusion: Nailfold capillaroscopy performed in patients with isolated Raynaud's phenomenon or undifferentiated connective tissue disease has a role in the prognostic evaluation related to the possibility of an evolution of the diagnosis or to the need of the introduction of new treatments.

Keywords: Capillaroscopy; Raynaud; Connective; Undifferentiated; Prognosis.

Introdução

As alterações da microcirculação estão frequentemente presentes nas doenças difusas do tecido conjuntivo (DDTC). O seu estudo pode ser facilmente realizado pela execução de capilaroscopia do leito ungueal (CLU), uma técnica segura e não invasiva, de extrema importância na avaliação de indivíduos que apresentam fenómeno de Raynaud (FR), expressão clínica de hiper-reatividade vascular ao frio e que pode ser primário (funcional, sem patologia associada) ou secundário (expressão de microangiopatia associada a patologia). As alterações microangiopáticas estão quase universalmente presentes na Esclerose Sistémica (ES). Mais de 95% destes doentes apresentam desorganização da arquitectura microvascular, hemorragias, megacapilares, áreas avasculares ou fenómenos de neovascularização, alterações estas que surgem de uma forma sequencial e têm valor prognóstico e diagnóstico nesta patologia.¹

As alterações microvasculares também estão documentadas em outras patologias reumáticas como a Dermato/Polimiosite (DM/PM), a Síndrome dos Anticorpos Antifosfolípidos (SAAF), a Síndrome de Sjogren (SS) ou o Lúpus Eritematoso Sistémico (LES).²

A CLU é o exame de eleição para o estudo da microvasculatura e tem um valor preditivo negativo muito elevado (>90%) para um FR secundário. O seu valor preditivo positivo é no entanto inferior (cerca de 50%) mas melhor que qualquer outro teste de rastreio isolado na avaliação do FR.³

Objectivo: Avaliar, em doentes com fenómeno de Raynaud ou com doença indiferenciada do tecido conjuntivo (DITC), o interesse dos resultados da capilaroscopia do leito ungueal e a sua correlação com a evolução diagnóstica e terapêutica.

Métodos

Critérios de inclusão: doentes com FR e/ou DITC enviados à nossa unidade entre 1999 e 2003. Todos estes doentes realizaram de base uma CLU e os seguintes exames laboratoriais: Anticorpos anti-nucleares (ANA), Factor Reumatóide (FRé), Velocidade de Sedimentação Eritrocitária (VS) e doseamento da Proteína C Reactiva (PCR).

Critérios de exclusão: foram excluídos doentes que apresentassem critérios de diagnóstico para patologia reumática específica do tipo inflamatório sistémico na avaliação inicial.

Avaliação Capilaroscópica: Para a CLU foi utilizado um estereomicroscópio com amplificação de 2x a 100x, sendo observado o leito ungueal do 2º ao 5º dedos de ambas as mãos. Os resultados da CLU realizada de base foram divididos pelos seguintes grupos: 1- Normal (Figura 1); 2- Alterações ligeiras (tortuosidades capilares, alargamento segmentar) (Figura 2 e 3); 3- Alterações significativas (hemorragias, megacapilares, áreas avasculares) (Figura 4,5,6).

Tratamento dos dados: Foram relacionados os achados capilaroscópicos e laboratoriais de base com a evolução clínica e diagnóstica dos doentes até 2006.

Os dados depois de recolhidos foram codificados e gravados em folha de programa Excel. A análise dos dados foi realizada pelo programa de análise estatística EZAnalyse. Foi utilizado o teste do Qui-quadrado para comparação de proporções.

Resultados

Foram incluídos 80 doentes, média de idades de 51,4 anos (DP±14,3) (máximo 81, mínimo 24 anos). Setenta e oito (97,5%) doentes eram do sexo feminino e 2 (2,5%) do sexo masculino, com a seguinte distribuição: FR+ DITC: 27 doentes (33,8%); FR: 46 doentes (57,5%); DITC: 7 doentes (8,7%). Os resultados laboratoriais de base foram os que se seguem: VS ≥30mm/1hora: 23 doentes (28,8%); PCR ≥1mg/dl: 15 doentes (18,7%); ANA ≥1/160: 42 doentes (52,5%); FRé positivo: 15 doentes (18,8%).

Resultados da capilaroscopia: a CLU foi normal em 30 doentes (37,5%); 16 doentes (20,0%) apresentaram apenas alterações ligeiras (tortuosidades, alargamento segmentar); 34 doentes (42,5%) apresentavam alterações significativas (26 deles com a presença de megacapilares, 25 deles com hemorragias e 3 também com áreas avasculares).

A introdução de novas terapêuticas após CLU

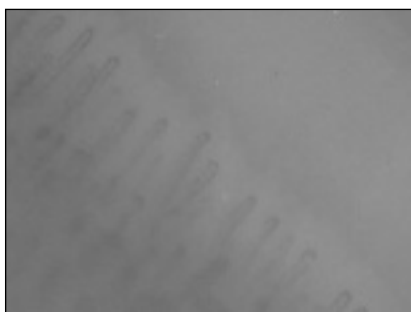
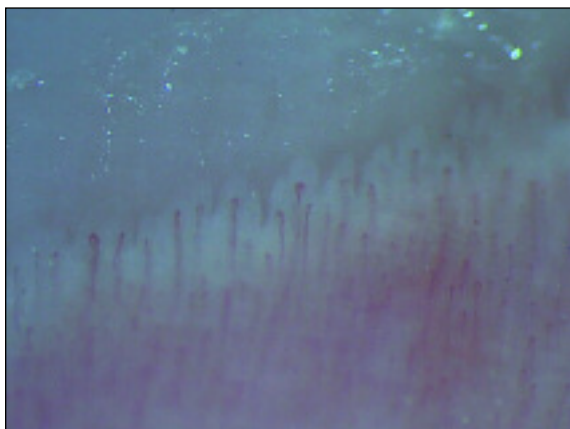


Figura 1a e 1b. Capilaroscopia normal: capilares distribuídos em «paliçada», com conformação em «gancho de cabelo», e com densidade normal.



Figura 2. Presença de dois capilares dilatados quando comparados com capilares de conformação normal.

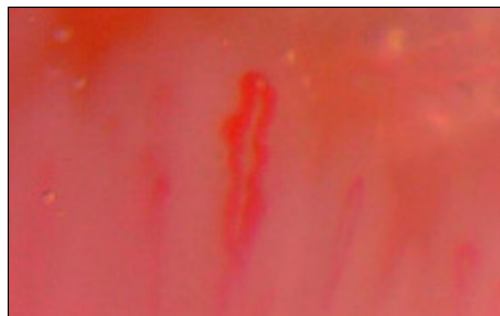


Figura 3. Capilar dilatado e tortuoso.

ocorreu em 32 doentes (40,0%): corticóides em 18 doentes (22,5%), hidroxicloroquina em 14 (17,5%) e imunossuppressores em 15 (18,8%).

Após a CLU foi efectuado um novo diagnóstico em 39 doentes (48,8%), como se descreve de seguida: DITC em 9 (11,3%) doentes (c/ o diagnóstico anterior exclusivo de FR), ES em 13 (16,3%) doentes, Síndrome de Sobreposição em 7 doentes (3,8%), AR em 3 doentes (3,8%), LES em outros 3 doentes (3,8%) e ainda os diagnósticos de SAAF, SS, arterite de Takayasu e espondilite anquilosante em, respectivamente, cada um (1,3%) dos restantes 4 doentes. O diagnóstico inicial não foi alterado em 41 doentes (51,2%) dos quais 16 doentes com FR, 21 doentes com FR+DITC e 4 doentes com DITC.

A distribuição das variáveis (alterações capilaroscópicas, ANA, VS, PCR, FRe) em relação à evolução diagnóstica e terapêutica encontra-se resumida nos Quadros I e II.

Dos 39 doentes com evolução para um novo diagnóstico, 28 apresentavam alterações capilaroscópicas significativas e 11 apresentavam alterações ligeiras ou uma capilaroscopia normal. Dos 41 doentes sem evo-

lução para um novo diagnóstico, 6 apresentavam alterações capilaroscópicas significativas e 35 apresentavam alterações ligeiras ou uma capilaroscopia normal. Dos 32 doentes em que ocorreu a introdução de novos tratamentos, 25 apresentavam alterações significativas na capilaroscopia, enquanto 7 doentes apresentavam alterações capilaroscópicas ligeiras ou inexistentes. Dos 48 doentes em que não ocorreu a introdução de novos tratamentos, 9 apresentavam alterações significativas na capilaroscopia, enquanto 39 doentes apresentavam alterações ligeiras ou uma capilaroscopia normal. Foi encontrada uma correlação estatisticamente significativa entre alterações significativas (hemorragias, megacapilares e/ou áreas avasculares) na CLU com a evolução para um novo diagnóstico e com a introdução de nova medicação ($p < 0,0001$ para ambos) (Figura 7).

Dos 39 doentes com evolução para um novo diagnóstico, 25 apresentavam ANA $\geq 1/160$ e 14 apresentavam ANA $< 1/160$. Dos 41 doentes sem evolução para um novo diagnóstico, 17 apresentavam ANA $\geq 1/160$ e 24 apresentavam ANA $< 1/160$. Dos 32 doentes



Figura 4. Hemorragias capilares em leito ungueal onde se observam várias dilatações capilares.

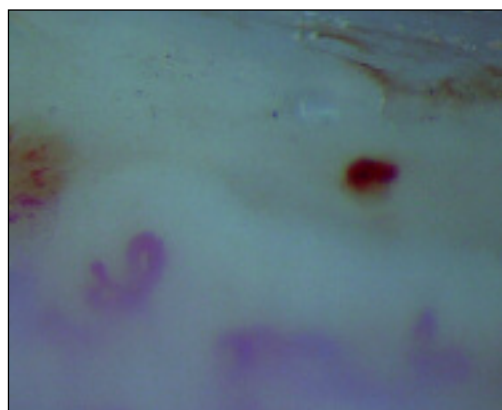


Figura 6. Zonas avasculares do leito capilar, sendo também visível uma hemorragia capilar.



Figura 5. Megacapilares e alguns capilares dilatados e tortuosos.

tes em que ocorreu a introdução de novos tratamentos, 23 apresentavam ANA $\geq 1/160$, enquanto 9 doentes apresentavam ANA $< 1/160$. Dos 48 doentes em que não ocorreu a introdução de novos tratamentos, 19 apresentavam ANA $\geq 1/160$, enquanto 29 doentes apresentavam ANA $< 1/160$. A existência de ANA positivo ($\geq 1/160$) correlacionou-se com a introdução de nova medicação ($p=0,005$), mas não com a alteração do diagnóstico ($p=0,07$) (Figura 8).

Dos 39 doentes com evolução para um novo diagnóstico, 11 apresentavam VS ≥ 30 mm/1hora e 28 apresentavam VS < 30 mm/1hora. Dos 41 doentes sem evolução para um novo diagnóstico, 12 apresentavam VS ≥ 30 mm/1hora e 29 apresentavam VS < 30 mm/1hora. Dos 32 doentes em que ocorreu a introdução de novos tratamentos, 11 apresentavam VS ≥ 30 mm/1hora, enquanto 21 doentes apresentavam VS < 30 mm/1hora. Dos 48 doentes em que não ocorreu a introdução de novos tratamentos, 12 apresen-

tavam VS ≥ 30 mm/1hora, enquanto 36 doentes apresentavam VS < 30 mm/1hora.

Dos 39 doentes com evolução para um novo diagnóstico, 7 apresentavam PCR ≥ 1 mg/dl e 32 apresentavam PCR < 1 mg/dl. Dos 41 doentes sem evolução para um novo diagnóstico, 8 apresentavam PCR ≥ 1 mg/dl e 33 apresentavam PCR < 1 mg/dl. Dos 32 doentes em que ocorreu a introdução de novos tratamentos, 5 apresentavam PCR ≥ 1 mg/dl, enquanto 27 doentes apresentavam PCR < 1 mg/dl. Dos 48 doentes em que não ocorreu a introdução de novos tratamentos, 10 apresentavam PCR ≥ 1 mg/dl, enquanto 38 doentes apresentavam PCR < 1 mg/dl.

Dos 39 doentes com evolução para um novo diagnóstico, 10 apresentavam FRe positivo e 29 apresentavam FRe negativo. Dos 41 doentes sem evolução para um novo diagnóstico, 5 apresentavam FRe positivo e 36 apresentavam FRe negativo. Dos 32 doentes em que ocorreu a introdução de novos tratamentos, 4 apresentavam FRe positivo, enquanto 28 doentes apresentavam FRe negativo. Dos 48 doentes em que não ocorreu a introdução de novos tratamentos, 11 apresentavam FRe positivo, enquanto 37 doentes apresentavam FRe negativo.

Não se encontrou correlação estatisticamente significativa entre os valores laboratoriais de base (VS, PCR ou FRe) e a evolução para um novo diagnóstico ou introdução de nova terapêutica.

Discussão

Este estudo teve como principal objectivo aferir a importância da CLU como meio preditivo para a evolução de doentes com FR e/ou DITC para um diag-

Quadro I. Evolução diagnóstica e variáveis analisadas

	EVOL DIAG +	EVOL DIAG -
Cap +	28 (35,0%)	6 (7,5%)
Cap -	11 (13,8%)	35 (43,7%)
ANA +	25 (31,2%)	17 (21,3%)
ANA -	14 (17,5%)	24 (30,0%)
VS ≥30	11 (13,8%)	12 (15,0%)
VS <30	28 (35,0%)	29 (36,2%)
PCR ≥1	7 (8,8%)	8 (10,0%)
PCR <1	32 (40,0%)	33 (41,2%)
FR+ +	10 (12,5%)	5 (6,2%)
FR+ -	29 (36,2%)	36 (45,1%)

Evol Diag = Evolução Diagnóstica

nóstico concreto de DDTC e introdução de terapêutica (corticoterapia e/ou imunossuppressores), comparando a contribuição desta técnica face à dos valores laboratoriais obtidos de base. Os achados obtidos são relevantes visto que se encontrou correlação estatisticamente significativa entre as alterações capilaroscópicas *maior* e a evolução diagnóstica e a necessidade de introdução de nova terapêutica.

Alguns trabalhos publicados demonstram a importância dos achados capilaroscópicos em diversas doenças reumáticas.^{1,2,4}

O FR é uma entidade frequente na população geral tendo uma prevalência de 5 a 20%.⁵ Estima-se que 15 to 20% dos indivíduos com FR e com alterações microcirculatórias (aferidas pela CLU) desenvolverão uma conectivite durante os dois anos subsequentes.² Na nossa série a quase totalidade dos doentes com FR e alterações capilaroscópicas positivas tiveram evolução para conectivite. Tal explica-se pela população estudada pertencer a um centro de referência de doenças reumáticas, logo com maior probabilidade de ocorrência de FR secundário a conectivite e pelo período decorrido após a capilaroscopia, na maior parte dos doentes, ser superior a dois anos.

A DITC é uma entidade relativa a um grupo de doentes que não preenchem critérios de diagnóstico suficientes para uma conectivite específica, mas que apresentam características clínicas e laboratoriais de DDTC.⁶

Diversos autores referem que uma pequena percentagem destes indivíduos evolui para uma conectivite específica, e esta proporção é maior nos doentes com menor tempo de evolução da sintomatologia.^{7,8,9}

A presença do FR é frequente na DITC e varia de 46 a 56% consoante as séries.⁷⁻¹² No nosso estudo ve-

Quadro II. Evolução terapêutica e variáveis analisadas

	EVOL TERAP +	EVOL TERAP -
Cap +	25 (31,2%)	9 (11,3%)
Cap -	7 (8,8%)	39 (48,7%)
ANA +	23 (28,7%)	19 (23,8%)
ANA -	9 (11,3%)	29 (36,2%)
VS ≥30	11 (13,8%)	12 (14,9%)
VS <30	21 (26,2%)	36 (45,1%)
PCR ≥1	5 (6,2%)	10 (12,5%)
PCR <1	27 (33,8%)	38 (47,5%)
FR+ +	4 (5,0%)	11 (13,8%)
FR+ -	28 (35,0%)	37 (46,2%)

Evol Terap = Evolução Terapêutica

rificou-se que o FR estava presente em 79,4% dos doentes com o diagnóstico inicial de DITC. Esta discrepância em relação ao descrito na literatura médica justifica-se pelo facto da população estudada ter uma alta prevalência de FR (91,3% do total de doentes estudados), o que se justifica dado tratarem-se de doentes referenciados para estudo capilaroscópico.

Num estudo que avaliou as alterações microvasculares em doentes com DITC com mais de um ano de evolução, 52,5% (n=78) apresentavam FR. As alterações microvasculares (avaliadas por CLU) dos doentes com FR + DITC mais frequentemente encontradas foram: megacapilares, capilares alargados e irregulares e menos de 2 hemorragias por dedo, dados a favor de lesão microvascular e com um padrão estável no seguimento.¹³ Neste estudo a DITC sem FR associou-se a alterações ligeiras e inespecíficas da microcirculação. Nenhum destes doentes apresentou áreas avasculares ou fenómenos de neovascularização na CLU. Apenas 3 dos 78 doentes com DITC evoluiu para uma conectivite específica: 2 para SS primário e 1 para esclerose sistémica, este último apresentando alterações importantes da arquitectura capilar.¹³

Na nossa série houve uma associação estatisticamente significativa das alterações microvasculares significativas com a evolução diagnóstica e terapêutica e uma percentagem significativa evoluiu para esclerose sistémica (16,3%). Esta discrepância pode dever-se à menor duração da DITC que pode estar associada a uma maior progressão para conectivite específica dos nossos doentes, dados que não foram incluídos neste estudo.

Hirschl e colaboradores, estudaram prospectivamente doentes com FR (n=244): neste estudo os ANA

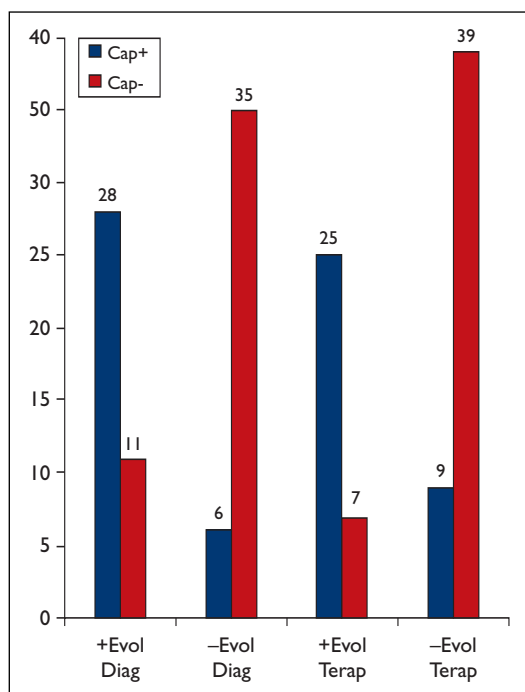


Figura 7. Resultados da Capilaroscopia e evolução diagnóstica e terapêutica.

Cap = capilaroscopia; Evol Diag = Evolução Diagnóstica ; Evol Terap= Evolução Terapêutica.

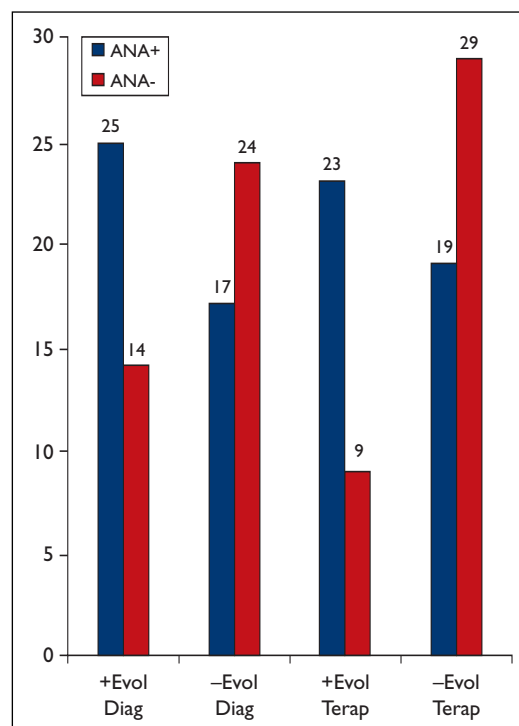


Figura 8. Resultados da Capilaroscopia e determinação dos anticorpos anti-nucleares (ANA)

Evol Diag = Evolução Diagnóstica ; Evol Terap = Evolução Terapêutica

em título $>1/320$ associaram-se a evolução para doença do tecido conjuntivo. A elevação da VS, hemograma alterado e achados patológicos na CLU não foram significativamente diferentes entre os subgrupos de suspeita de FR secundário e FR secundário estabelecido.¹⁴

Outros estudos corroboram a relação entre a elevação de VS, ANA positivo e achados capilaroscópicos patológicos de base com a suspeita de FR secundário.¹⁵⁻¹⁷ No nosso estudo os ANA positivos não se associaram com a evolução diagnóstica, mas sim com a introdução de novas terapêuticas (corticoterapia e/ou imunomoduladores).

Meli e colaboradores, demonstraram que as áreas avasculares, megacapilares e arquitectura capilar irregular são achados capilaroscópicos preditivos de conectivite num estudo que avaliou a evolução de doentes com FR sem critérios clínicos ou serológicos de base para doença do tecido conjuntivo.¹⁸

As alterações microvasculares têm sido reportadas em diversas doenças reumáticas mas é na ES que encontram a sua maior expressão. No LES as alterações mais frequentemente encontradas são ligeiras e inespecíficas (visibilidade venular, dilatações segmenta-

res e tortuosidades).^{2,19}

Um estudo recente em doentes com LES (n=123) encontrou uma relação significativa entre os índices de actividade da doença (utilizando o SLEDAI) e alterações capilaroscópicas significativas ($p<0,0001$), o que sugere a utilização da CLU para despiste das formas mais agressivas desta patologia.²⁰

Na DM está bem definido um padrão *escleroderma-like* e no SS alterações capilaroscópicas *escleroderma-like* foram associadas à presença de anticorpos anti-centrómero.^{21,22}

No SAAF primário foram referidas alterações microcirculatórias como tortuosidades e hemorragias simétricas especialmente em doentes com manifestações trombóticas e anticorpos anti-cardiolipina.^{23,24}

Conclusões

Este estudo reafirma a importância da CLU na avaliação em Reumatologia, em particular dos doentes que se apresentam com FR e/ou DITC.

A directa visualização da microcirculação do leito ungueal reflecte a microangiopatia que ocorre a ní-

vel sistémico, tendo um valor preditivo relevante na evolução clínica dos doentes com FR e/ou DITC, como demonstrado pelo nosso estudo e por outras publicações.

Sendo uma técnica não invasiva e de baixo custo, deve ser executada nos doentes que se apresentam com FR, para detecção de possíveis alterações e distinção entre FR primário e secundário.

Correspondência para:

Paulo Clemente-Coelho.

Apartado 9827. 1911 LISBOA CODEX. PORTUGAL

E-mail: jccoel@gmail.com

Referências:

1. Cutolo M, Sulli A, Pizzorni C, Accardo S. Nailfold videocapillaroscopy assessment of microvascular damage in systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2000;27:155-160.
2. Cortes S, Cutolo M. Capillaroscopic patterns in rheumatic diseases. *Acta Reumatol Port* 2007;32:29-36.
3. Luggen M, Belhorn L, Evans T, Fitzgerald O, Spencer Green G. The evolution of Raynaud's phenomenon: a longterm prospective study. *J Rheum* 1995;22:2226-2232.
4. Clemente-Coelho P. Interesse da Capilaroscopia na avaliação do Fenómeno de Raynaud, da esclerose Sistémica e de outros quadros reumatológicos com diagnóstico mal definido. *Rev. Portuguesa de Reumatologia* 2002;13:5-21.
5. Maricq HR, Carpentier PH, Weinrich MC et al. Geographic variation in the presence of Raynaud's phenomenon. Charleston, SC, USA, vs. Tarentaise, Savoie, France. *J Rheumatol* 1993;20:70-76.
6. LeRoy EC, Maricq HR, Kahaleh MB. Undifferentiated connective tissue syndromes. *Arthritis Rheum* 1980;23:341-343.
7. Mosca M, Tavoni A, Neri R, Bencivelli W, Bombardieri S. Undifferentiated connective tissue diseases: the clinical and serological profile in 91 patients followed for at least 1 year. *Lupus* 1998;7:95-100.
8. Mosca M, Neri R, Bombardieri S. Undifferentiated connective tissue diseases (UCTD): a review of the literature and a proposal for a preliminary classification criteria. *Clin Exp Rheumatol* 1999;17:615-620.
9. Mosca M, Neri R, Bencivelli W, Tavoni A, Bombardieri S. Undifferentiated connective tissue diseases: analysis of 83 patients with a minimum follow-up of 5 years. *J Rheumatol* 2002;29:2345-2349.
10. Danielli MG, Fraticelli P, Salvi A, Gabrielli A, Danielli G. Undifferentiated connective tissue disease: natural history and evolution into definite CTD assessed in 84 patients initially diagnosed as early UCTD. *Clin Rheumatol* 1998;17:195-201.
11. Danielli MG, Fraticelli P, Franceschini F et al. Five year follow-up of 165 italian patients with undifferentiated connective tissue diseases. *Clin Exp Rheumatol* 1999;17:585-591.
12. Dijkstra S, Nieuwenhuys EJ, Swaak AJ. The prognosis and outcome of patients referred to an outpatient clinic for rheumatic diseases characterized by the presence of antinuclear antibodies (ANA). *Scand J Rheumatol* 1999;28:33-37.
13. De Angelis R, Cerioni A, Del Medico P, Blassetti P. Raynaud's phenomenon in undifferentiated connective tissue disease (UCTD). *Clin Rheumatol* 2005;24:145-151.
14. Hirschl M, Hirschl K, Lenz M, Katzenschlager R, Hutter HP, Kundi M. Transition from Primary Raynaud's Phenomenon to Secondary Raynaud's Phenomenon Identified by diagnosis of an associated disease. *Arthritis Rheum* 2006;54:1974-1981.
15. Kallenberg CG, Wouda AA, Houet MH, Van Venrooij WJ. Development of connective tissue diseases in patients presenting with Raynaud's phenomenon: a six year follow-up with emphasis on the predictive value of antinuclear antibodies as detected by immunoblotting. *Ann Rheum Dis* 1998;47:634-664.
16. Meli M, Gitzelmann G, Koppensteiner R, Amann-Vesti BR. Predictive value of nailfold capillaroscopy in patients with Raynaud's phenomenon. *Clin Rheumatol* 2005;25:153-158.
17. De Angelis R, Del Medico P, Blassetti P, Cervini C. Raynaud's phenomenon: clinical spectrum of 118 patients. *Clin Rheumatol* 2003;22:279-284.
18. Meli M, Gitzelmann G, Koppensteiner R, Amann-Vesti BR. Predictive value of nailfold capillaroscopy in patients with Raynaud's phenomenon. *Clin Rheumatol* 2006;25:153-158.
19. Candela M, Pansoni A, De Carolis ST et al. Nailfold capillary microscopy in patients with antiphospholipid syndrome. *Recenti Prog Med* 1998; 89:444-449.
20. Ingegnoli F, Zeni S, Meani L et al. Evaluation of nailfold videocapillaroscopic abnormalities in patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Rheum* 2005;11:295-298.
21. Klysz T, Bogenschütz O, Junger M, Rassner G. Microangiopathic changes and functional disorders of nail fold capillaries in dermatomyositis. *Hautarzt*. 1996; 47:289-293.
22. Capobianco KG, Xavier RM, Bredemeier M, Restelli VG, Brenol JC. Nailfold capillaroscopic findings in primary Sjogren's syndrome: clinical and serological correlations. *Clin Exp Rheumatol* 2005;23:789-794.
23. Vaz JL, Dancour MA, Bottino DA, Bouskela E. Nailfold videocapillaroscopy in primary antiphospholipid syndrome (PAPS). *Rheumatology (Oxford)* 2004;43:1025-1027.
24. Sulli A, Pizzorni C, Cutolo M. Nailfold videocapillaroscopy abnormalities in patients with antiphospholipid antibodies. *J Rheumatol* 2000;27:1574-1576.

PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO E MONITORIZAÇÃO DO LÚPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO [PAMLES]

Cândida Silva,* Helena Canhão,** Anabela Barcelos,*** Luis Miranda,* Patrícia Pinto,**** Maria José Santos*****

Pelo Grupo de Estudo de Doenças Reumáticas Sistémicas (GEDRESIS) da Sociedade Portuguesa de Reumatologia

Resumo

O Lúpus Eritematoso Sistémico (LES) é uma doença complexa e multifacetada. A abordagem adequada destes doentes depende de uma avaliação clínica cuidada que identifique não só a actividade inflamatória, mas também as lesões irreversíveis, as patologias associadas e a repercussão da doença sobre o estado de saúde e a qualidade de vida do doente. O Grupo de Estudos de Doenças Reumáticas Sistémicas (GEDRESIS) da Sociedade Portuguesa de Reumatologia (SPR) sumariza os aspectos mais relevantes da avaliação e seguimento dos doentes com LES sob a forma de um protocolo clínico (PAMLES). Pretende-se com este protocolo fornecer uma ferramenta útil para aplicação na prática clínica e contribuir para a melhoria dos cuidados prestados aos doentes com LES.

Palavras-chave: Lúpus Eritematoso Sistémico; Monitorização; Protocolo; Portugal

Abstract

Systemic Lupus Erythematosus (SLE) is a complex multisystemic disease. Appropriate approach to lupus patients depends on a careful clinical evaluation that identifies disease activity, irreversible damage, co-morbid conditions, and the impact of SLE on patient's health status and quality of life. The Study Group for Systemic Rheumatic Diseases (GEDRESIS) of the Portuguese Society of Rheumatology summarizes the most relevant aspects of initial evaluation and monitoring of lupus patients in

a clinical protocol (PAMLES). The aim of this protocol is to provide a useful tool for application in clinical practice and to contribute to a better care of lupus patients.

Keywords: Systemic Lupus Erythematosus; Monitoring; Protocol; Portugal

Introdução

O Lúpus Eritematoso Sistémico (LES) é uma doença reumática sistémica de natureza autoimune que pode apresentar um espectro muito variado de manifestações clínicas. A sua prevalência em Portugal não é conhecida, mas noutros países da Europa do Sul varia entre 34-91 casos/100.000 habitantes.¹

Apesar da etiologia permanecer desconhecida, os avanços no conhecimento dos mecanismos da doença, das suas manifestações clínicas e complicações e o surgimento de novos fármacos, reflectiu-se na melhoria do prognóstico vital, sendo actualmente a sobrevivência aos 10 anos superior a 90%, em centros de referência.² Em contrapartida as complicações tardias, nomeadamente as doenças cardiovasculares, a osteoporose e as neoplasias, são problemas clínicos cada vez mais frequentes³⁻⁵ e a sua prevenção deve ser uma prioridade.

A correcta abordagem do doente com LES baseia-se num diagnóstico exacto e numa avaliação clínica e laboratorial apropriadas. Desta avaliação fazem parte a determinação da actividade inflamatória, a identificação de lesões irreversíveis e de patologias associadas e a repercussão da doença sobre o estado de saúde e a qualidade de vida.^{6,7}

Diagnóstico

Perante a suspeita clínica de LES é necessário, em primeiro lugar, ter a certeza de um diagnóstico cor-

*Instituto Português de Reumatologia, Lisboa

** Serviço de Reumatologia, Hospital de Santa Maria, Lisboa

***Serviço de Reumatologia, Hospital Infante D Pedro, Aveiro

****Unidade de Reumatologia, Hospital de S Marcos, Braga

*****Serviço de Reumatologia, Hospital Garcia de Orta, Almada

recto. Porque o lúpus é uma doença heterogénea e frequentemente com um curso policíclico, em que períodos de doença clinicamente evidente alternam com fases de quiescência, nem sempre é possível estabelecer o diagnóstico numa primeira avaliação e os atrasos no diagnóstico são frequentes.⁸ As manifestações sistémicas, tais como a febre, astenia ou emagrecimento são comuns nos períodos de actividade da doença e mais de 90% dos doentes têm atingimento músculo-esquelético ou cutâneo-mucoso no decurso do lúpus; as citopenias surgem em mais de metade dos casos e o envolvimento renal em 37% dos doentes; a presença de anticorpos antinucleares é praticamente universal e os anti-dsDNA podem ser positivos em mais de três quartos dos doentes.⁹ Os critérios de classificação do *American College of Rheumatology* (ACR) revistos em 1997,¹⁰ apesar de não constituírem critérios para diagnóstico de LES, são úteis na prática clínica.

Protocolo de Avaliação e Monitorização (PAMLES)

O PAMLES é um suporte escrito estruturado, de fácil execução, que permite ao clínico obter informação essencial sobre as características do doente e da doença. Inclui a caracterização clínica e imunológica do lúpus, a avaliação da actividade inflamatória, a identificação de lesões sequelares, descreve as patologias associadas e a repercussão da doença sobre o estado de saúde e a qualidade de vida do doente.

A avaliação inicial é sintetizada em 2 páginas (Figura 1). A primeira página contém dados demográficos, antecedentes pessoais incluindo antecedentes obstétricos, informação sobre terapêuticas prévias e terapêutica actual. É registada a data do diagnóstico de LES e os critérios ACR que o doente apresenta.

Na segunda página são registados os sintomas e os dados do *exame físico*, que deve ser completo.

Os *exames complementares* iniciais devem incluir:

- Hemograma completo
- Velocidade de sedimentação (VS), proteína C reactiva (PCR)
- Tempo de protrombina (TP), Tempo de tromboplastina activado (aPTT)
- Função renal
- Transaminases, desidrogenase láctica (LDH),

creatina-cinase (CK)

- Proteinograma
- Perfil lipídico, função tiroideia
- Urina tipo II
- CH50 e fracções C3 e C4 do complemento,
- Anticorpos antinucleares (ANA) titulados
- Anticorpos anti-dsDNA, anti RNP, anti-SSA, anti-SSB, anti-Sm, anticardiolipina IgG e IgM, anti-beta2 glicoproteína I IgG e IgM, anticoagulante lúpico e teste de Coombs
- Serologias VHB, VHC, HIV
- O doseamento da proteinúria das 24 horas, *clearance* da creatinina e *ratio* proteinúria/creatinúria podem ser necessários se houver alterações no exame sumário da urina ou na função renal.

Todos os doentes deverão ter uma radiografia de tórax, electrocardiograma (ECG) e ecocardiograma transtorácico basais.

O pedido de outros exames é orientado pela presença de problemas específicos.

Na quantificação da *actividade da doença* deve ser utilizado um instrumento standardizado, válido, fiável e sensível à mudança. São exemplos disso o *Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index (SLEDAI)*,¹¹ o *Systemic Lupus Activity Measure (SLAM)*,¹² o *European Consensus Lupus Activity Measure (ECLAM)*¹³ ou o *British Isles Lupus Assessment Group (BILAG)*.¹⁴

O SLEDAI é um índice quantitativo de fácil aplicação cuja pontuação pode variar desde 0 até 105. Avalia a presença de manifestações clínicas e laboratoriais de actividade lúpica, presentes à data da avaliação ou nos 10 dias precedentes. O SLEDAI foi objecto de actualização no ano 2000 (SLEDAI 2K)¹⁵ e é actualmente o instrumento com maior aceitação entre os reumatologistas portugueses (Quadro I).

O BILAG, revisto em 2004,¹⁶ utiliza uma avaliação qualitativa de 9 domínios, baseada na «intenção de tratar» (cinco níveis de A a E). A pontuação é feita com base na gravidade dos sintomas nas 4 semanas precedentes e na variação em relação à avaliação anterior (manifestação surgida de novo, melhor, estável ou pior). O *score A* representa doença muito activa com necessidade de tratamento imunossupressor e/ou corticóide em dose superior a 20 mg/dia de prednisolona, o *score B* representa doença moderadamente activa, o *score C* indica doença ligeira, estável, o *score D* indica ausência de actividade num órgão ou sistema previa-

Figura 1. PAM LES – Avaliação inicial

Identificação: Nome: _____ Data-nascimento ____/____/____ Sexo: F ☐ M ☐ Raça: Caucásica ☐ Negra ☐ Oriental ☐ Outra ☐ Naturalidade _____ Escolaridade: _____ anos Profissão: _____ Situação profissional actual: Activo ☐ Trabalho a tempo parcial ☐ Desempregado ☐ Baixa prolongada ☐ Reforma por doença ☐ Reforma por idade ☐	
Antecedentes pessoais relevantes: Tabaco: S ☐ N ☐ Álcool S ☐ N ☐ Exercício físico regular S ☐ N ☐ HTA: S ☐ N ☐ Dislipidemia S ☐ N ☐ Diabetes S ☐ N ☐ OP S ☐ N ☐ Cardiopatia isquémica S ☐ N ☐ AVC S ☐ N ☐ Trombose arterial periférica S ☐ N ☐ Trombose venosa ou TEP S ☐ N ☐ Outros: _____	
Antecedentes obstétricos: N° de gravidezes _____ n° PTE _____ n° PTD _____ n° Prematuros _____ pré-eclampsia (HTA+ proteinúria >3g/dia) S ☐ N ☐ NS ☐ abortos espontâneos (<10 semanas) _____ mortes fetais (≥ 10 semanas) _____ Usa algum método anticonceptivo? S ☐ N ☐ Qual? _____ Está em menopausa? S ☐ N ☐ THS? S ☐ N ☐	
Antecedentes familiares reumatológicos (AR/LES/SAFL,etc): _____	
Início do LES Data de início de sintomas: ____/____/____ Data do diagnóstico: ____/____/____ Idade: _____	
Critérios de Classificação (ACRI 1997) ☐ Rash malar ☐ Rash discóide ☐ Fotosensibilidade ☐ Úlceras orais ou nasofaríngeas ☐ Artrite (artrite não erosiva envolvendo pelo menos 2 articulações periféricas) ☐ Serosite ☐ pericardite (presença de atrito, ECG característico ou derrame documentado por eco) ☐ pleurisia (dor pleurítica, atrito ou evidência de derrame pleural na ausência de infecção) ☐ Alterações renais ☐ proteinúria >500 mg/24h ou 3+ ☐ cilindros (podem ser de eritrócitos, hemoglobina, granuloses, tubulares ou mistos) ☐ Alterações neurológicas ☐ convulsões (na ausência de fármacos ou alt. metabólicas) ☐ psicose (na ausência de fármacos ou alt. metabólicas) ☐ Alterações hematológicas ☐ Anemia hemolítica (com reticulocitose) ☐ Leucopénia (<4000 em ≥2 determinações) ☐ Linfopénia (<1500 em ≥2 determinações) ☐ Trombocitopénia (<100000 em ≥2 determinações) ☐ Alterações imunológicas ☐ anticorpos anti-DNA nativo ☐ anticorpos anti-Sm ☐ Anticardiolipina IgG ou IgM, anticoagulante lúpico ou falsa serologia para sífilis presente >6 mes. ☐ Anticorpos anti-nucleares	
Outros auto-anticorpos: antiSSA S ☐ N ☐ antiSSB S ☐ N ☐ antiRNP S ☐ N ☐ anti-beta2GPI S ☐ N ☐ título _____, teste de Coombs S ☐ N ☐ Factor Reumatóide S ☐ N ☐ anti Cardiolipina IgG título _____ IgM título _____ <i>continua na página seguinte</i>	

Terapêuticas prévias: (nome, dose, motivo de suspensão) _____

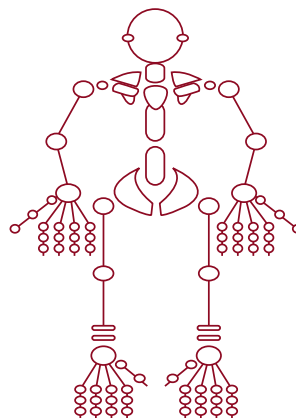
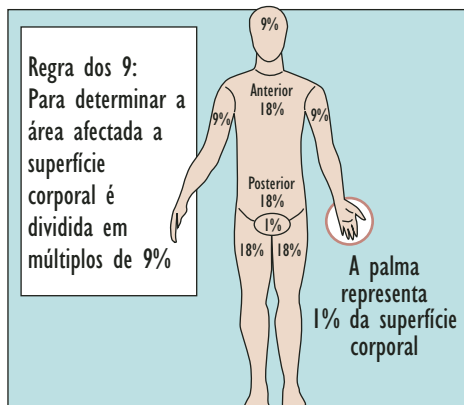
Terapêutica actual: (nome, dose, data de início) _____

Sintomas actuais: _____

Peso _____ Altura _____ IMC _____ TA _____ FC _____ Temperatura axilar _____

Adenomegalias S ☐ N ☐ Alopecia S ☐ N ☐ Úlceras orais/nasofaríngeas S ☐ N ☐ Raynaud S ☐ N ☐

Lesões cutâneas S ☐ N ☐ _____ Artrite S ☐ N ☐



Dor muscular S ☐ N ☐ Fraqueza muscular S ☐ N ☐ Edemas periféricos S ☐ N ☐

Alt cardíacas S ☐ N ☐ _____

Alt pulmonares S ☐ N ☐ _____

Alt abdominais S ☐ N ☐ _____

Alt neuropsiquiátricas S ☐ N ☐ _____

Laboratório:

Hemoglobina _____ Leucócitos _____ Linfócitos _____ Plaquetas _____

VS _____ PCR _____

Creatinina _____ CK _____ (valor ref _____)

Proteinúria _____ Eritrocitúria _____ Cilindrúria _____

ANA(título e padrão) _____

Anti-DNA(título) _____ (valor ref _____)

C3 _____ (valor ref _____) C4 _____ (valor ref _____) CH 50 _____ (valor ref _____)

Outros exames auxiliares:

☐ Radiografia tórax _____

☐ ECG _____

☐ Ecocardiograma modo M e 2D _____

Valor do SLEDAI (escala em anexo) _____

Valor do SLICC (escala em anexo) _____

SF36 (questionário em anexo)

Plano:

Quadro I. Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index 2000 SLEDAI 2k

Assinalar a pontuação se o evento estiver presente na altura da avaliação ou nos 10 dias prévios

Pontuação	Definição
8	Convulsões
8	Psicose
8	Síndrome cerebral orgânica
8	Distúrbios visuais
8	Distúrbios dos nervos cranianos
8	Cefaleia lúpica
8	AVC
8	Vasculite
4	Artrite
4	Miosite
4	Cilindros urinários
4	Hematúria
4	Proteinúria
4	Piúria
2	Rash malar
2	Alopécia
2	Mucosas
2	Pleurisia
2	Pericardite
2	Hipocomplementémia
2	Anti-dsDNA elevado
1	Febre
1	Trombocitopenia
1	Leucopenia

Pontuação total: (0-105)

mente envolvido e o *score* E ausência de envolvimento desse órgão ou sistema. A pontuação do BILAG, ainda que possa ser manual, é geralmente feita com o auxílio de um programa informático específico, o que limita a sua utilização.

Deve ser efectuada uma avaliação basal e, no mínimo, anual das *lesões irreversíveis (dano)*. Exis-

te apenas um instrumento validado para medição do dano que é o *Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology Damage Index (SLICC/ACR)*,¹⁷ apresentado no Quadro II. O SLICC quantifica as lesões surgidas após o diagnóstico de LES, presentes por mais de 6 meses, não pretendendo estabelecer qualquer re-

Quadro II. Índice de Lesão SLICC/ACR

Assinalar as alterações irreversíveis, não relacionadas com inflamação activa, que surgiram após o diagnóstico de LES e que estão presentes há pelo menos 6 meses

OCULAR:

Catarata documentada por oftalmoscopia |

Lesão retiniana OU atrofia óptica |

NEUROPSQUIÁTRICA:

Défice cognitivo (alteração da memória, dificuldade no cálculo matemático, na concentração, na linguagem falada ou escrita, diminuição do nível de performance) OU psicose *major* |

Epilepsia com necessidade de terapêutica >6 meses |

AVC (score 2 se >1x) ou ressecção cirúrgica não devida a neoplasia | 2

Neuropatia craniana ou periférica (exclui nervo óptico) |

Mielite transversa |

RENAL:

Clearance creatinina estimada ou medida < 50% |

Proteinúria $\geq 3,5\text{g}/24\text{h}$ |

Insuficiência renal terminal (diálise ou transplante) 3

PULMONAR:

Hipertensão pulmonar |

Fibrose pulmonar (clínica e Rx) |

«Schrinking lung» (Rx) |

Fibrose pleural (Rx) |

Enfarte pulmonar (Rx) ou ressecção não devida a neoplasia | 1

CARDIOVASCULAR:

Angor ou *by-pass* coronário |

Enfarte do miocárdio (score 2 se >1x) | 2

Cardiomiopatia (disfunção ventricular com tradução clínica) |

Doença valvular (sopro sistólico ou diastólico >3/6) |

Pericardite com duração superior a 6 meses ou pericardectomia |

VASOS PERIFÉRICOS

Claudicação com duração superior a 6 meses |

Perda de substância *minor* (pulpas digitais) |

Perda de substância *major* (dedo/ membro) (score 2 se >1 local) | 2

Trombose venosa com tumefacção, ulceração ou estase venosa |

GASTROINTESTINAL

Enfarte GI ou ressecção intestinal abaixo do duodeno, baço, fígado ou vesícula, qualquer que seja a causa (score 2 se >1 local) | 2

Insuficiência mesentérica |

Peritonite crónica | 1

Estenose esofágica ou cirurgia do tracto gastrointestinal superior |

Pancreatite crónica (Insuficiência pancreática exócrina ou falso quisto) |

MÚSCULO-ESQUELÉTICAS

Atrofia ou fraqueza muscular |

Artrite deformante ou erosiva |

Osteoporose com fractura ou colapso vertebral |

Necrose avascular (score 2 se >1 local) | 2

Osteomielite |

Ruptura de tendão |

PELE

Alopécia crónica cicatricial |

Cicatriz extensa ou paniculite exceptuando couro cabeludo e pulpas digitais |

Ulceração cutânea (não devido a trombose) por mais de 6 meses |

INSUFICIÊNCIA GONADAL PREMATURA (< 40 anos)

DIABETES independentemente da terapêutica |

NEOPLASIA (exclui displasia) (score 2 se >1 local) | 2

especificar _____

Total: (0-49)

Figura 2. PAM LES – Avaliação subsequente

Nome: _____

Situação profissional actual: Activo ☐ Trabalho a tempo parcial ☐ Desempregado ☐ Baixa prolongada ☐
 Reforma por doença ☐ Reforma por idade ☐

Queixas actuais/de novo _____

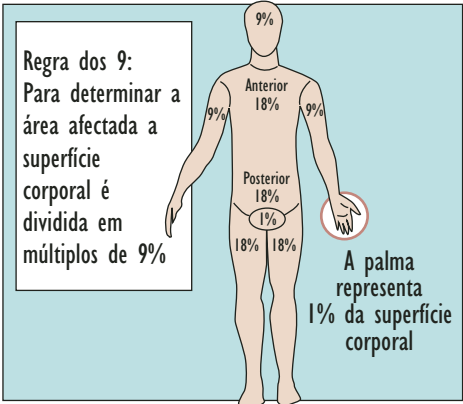
Houve alguma intercorrência? _____

Terapêutica actual: (nome, dose, data de início) _____

Efeitos adversos? _____

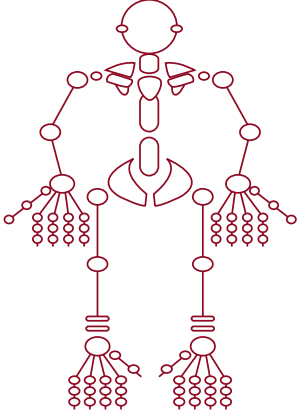
Peso _____ Altura _____ IMC _____ TA _____ FC _____ Temp axilar _____

Adenomegalias S ☐ N ☐ Alopecia S ☐ N ☐ Úlceras orais/nasofaríngeas S ☐ N ☐ Raynaud S ☐ N ☐
 Lesões cutâneas S ☐ N ☐ _____ Artrite S ☐ N ☐



Regra dos 9:
Para determinar a área afectada a superfície corporal é dividida em múltiplos de 9%

A palma representa 1% da superfície corporal



Dor muscular S ☐ N ☐ Fraqueza muscular S ☐ N ☐ Edemas periféricos S ☐ N ☐

Alt cardíacas S ☐ N ☐ _____

Alt pulmonares S ☐ N ☐ _____

Alt abdominais S ☐ N ☐ _____

Alt neuropsiquiátricas S ☐ N ☐ _____

Laboratório:

Hemoglobina _____ Leucocitos _____ Linfocitos _____ Plaquetas _____

VS _____ PCR _____

Creatinina _____ CK _____ (valor ref _____)

Proteinúria _____ Eritrocitúria _____ Cilindrúria _____

ANA(título e padrão) _____

Anti-DNA(título) _____ (valor ref _____)

C3 _____ (valor ref _____) C4 _____ (valor ref _____) CH 50 _____ (valor ref _____)

Outros exames auxiliares:

☐ Radiografia tórax _____

☐ ECG _____

☐ Ecocardiograma modo M e 2D _____

Valor do SLEDAI (escala em anexo) _____

Valor do SLICC (escala em anexo) _____

SF36 (questionário em anexo)

Plano:

lação causal com a doença. O seu valor pode variar entre 0 e 49. São avaliados 12 domínios, sendo atribuída a pontuação 1 se houver lesão irreversível. No caso de eventos repetidos, com um intervalo de tempo superior a 6 meses [por ex. acidente vascular cerebral (AVC), enfarte agudo do miocárdio (EAM), necrose avascular, neoplasia] a pontuação é 2. O valor máximo no domínio renal é 3, no caso de insuficiência renal terminal. Ao longo do tempo, o valor do SLICC pode aumentar mas nunca diminuir. Isto significa que, mesmo que haja correcção da situação inicial (por ex. cirurgia de catarata ou artroplastia da articulação afectada por necrose avascular), o dano continua a ser contabilizado.

A *qualidade de vida* pode ser avaliada com instrumentos como o *EuroQol* ou o *MOS Short Form 36 (SF 36)*,⁷ sendo que este último se encontra validado para a língua portuguesa.¹⁸

Avaliações subsequentes

O registo das avaliações subsequentes é feito em folha própria (Figura 2), em muito semelhante à 2ª página da avaliação inicial. A periodicidade das avaliações depende da situação do doente. No caso de doença estável é suficiente uma avaliação trimestral, mas é imprescindível ter disponibilidade para avaliações mais frequentes, se clinicamente justificado. Em cada consulta devem ser pesquisados activamente sintomas indicadores de actividade da doença, efeitos adversos da medicação, intercorrências (ex. infecções) e comorbilidade (ex. depressão, doença cardiovascular, neoplasia). O exame físico completo, incluindo medição da tensão arterial, é mandatório. Deverão ser solicitados exames laboratoriais mínimos necessários à monitorização da actividade lúpica (hemograma, VS, PCR, creatinina, urina II, fracções do complemento, anti-dsDNA), à monitorização de problemas específicos ou da terapêutica instituída.

O registo da actividade (em cada consulta), do dano (semestral ou anualmente) e da qualidade de vida (anualmente) é feito através dos instrumentos apropriados.

Conclusão

A correcta avaliação do doente com LES implica a identificação dos sinais de actividade da doença,

das patologias associadas, a caracterização de lesões irreversíveis e a repercussão sobre o estado de saúde e a qualidade de vida do doente. É necessário um diagnóstico inicial correcto, uma avaliação clínica detalhada em cada consulta e uma avaliação complementar que permita identificar a actividade da doença e monitorizar a segurança das terapêuticas. Por se tratar de uma doença com um curso imprevisível é importante a disponibilidade do médico para avaliações não programadas, sempre que a situação clínica o justificar. A utilização de um protocolo, como o que aqui publicamos, é relevante para a padronização da prática clínica, contribuindo assim para uma melhor abordagem dos doentes com LES.

Correspondência para:

Cândida Silva
Instituto Português de Reumatologia
Rua da Beneficência 7 - r/c
1050-034 LISBOA
E-mail candida.silva@ipr.pt

Referências:

1. Danchenko N, Satia JA, Anthony MS. Epidemiology of systemic lupus erythematosus: a comparison of worldwide disease burden. *Lupus* 2006; 15:308-318.
2. Cervera R, Kamashta M, Fonte J et al. Morbidity and mortality in systemic lupus erythematosus during a 10-year period. A comparison of early and late manifestations in a cohort of 1 000 patients. *Medicine* 2003;82: 299-308.
3. Manzi S, Meilahn EN, Rairie JE et al. Age-specific incidence rates of myocardial infarction and angina in women with systemic lupus erythematosus: comparison with the Framingham Study. *Am J Epidemiol.* 1997;145:408-415.
4. Lakshminarayanan S, Walsh S, Mohanraj M, Rothfield N. Factors associated with low bone mineral density in patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 2001;28:102-108.
5. Bernatsky S, Boivin JE, Joseph L et al. An international cohort study of cancer in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2005;52:1481-1490.
6. Lam GKW, Petri M. Assessment of systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol* 2005;23:20-32.
7. Fernando MMA, Isenberg DA. How to monitor SLE in routine clinical practice. *Ann Rheum Dis* 2005; 64:524-527.
8. Ozbek S, Sert M, Paydas S, Soy M. Delay in the diagnosis of SLE: the importance of arthritis/arthritis as the initial symptom. *Acta Med Okayama* 2003;57: 187-190.
9. Santos MJ, Capela S, Figueira R et al. Caracterização de uma população portuguesa de doentes com Lúpus Eritematoso Sistémico. *Acta Reumatol Port* 2007;32:153-161.

10. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997; 40:1725
11. Bombardier C, Gladman DD, Urowitz MB, Caron D, Chang CH. Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE. *Arthritis Rheum* 1992;35: 630-640
12. Liang MH, Socher SA, Larson MG, Schur PH. Reliability and validity of six systems for the clinical assessment of disease activity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1989;32:1107-1118
13. Vitali C, Bencivelli W, Isenberg DA, et al. Disease activity in systemic lupus erythematosus: report of the Consensus Study Group of the European Workshop for Rheumatology Research. II. Identification of the variables indicative of disease activity and their use in the development of an activity score. The European Consensus Study Group for Disease Activity in SLE. *Clin Exp Rheumatol* 19;10:541-547
14. 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: 927-937
15. Gladman D, Ibañez D, Urowitz M. Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index 2000. *J Rheumatol* 2002;29:288-291.
16. Isenberg DA, Rahman A, Allen E et al. BILAG 2004. Development and initial validation of an updated version of the British Isles Lupus Assessment Group's disease activity index for patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)* 2005;44: 902-906.
17. Gladman D, Ginzler E, Goldsmith C et al. The development and initial validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology Damage Index for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1996;39:363-369.
18. Ferreira PL. Criação da Versão Portuguesa do MOS SF-36. Parte II – testes de validação.

IOF World Congress on Osteoporosis

Tailândia, Banguécoque

3-7 de Dezembro de 2008

SÍNDROME DE GOODPASTURE

Samuel Katsuyuki Shinjo,* Eduardo Massato Hasegawa,*
Denise Maria Avancini Costa Malheiros,** Mauricio Levy-Neto*

Resumo

A síndrome de Goodpasture (SG) é uma doença auto-imune que faz parte do espectro da síndrome pulmão-rim. É caracterizada pela presença de anticorpos anti-membrana basal glomerular (anti-MBG) e de depósito linear destes anticorpos na membrana basal alveolar e glomerular, resultando em hemorragia alveolar e glomerulonefrite rapidamente progressiva, respectivamente. Um diagnóstico precoce é importante para minimizar pior prognóstico clínico. No presente trabalho, ilustramos um caso de SG, inicialmente interpretada como sendo granulomatose de Wegener; porém, o seu curso evolutivo mostrou tratar-se de SG. O paciente apresentou uma evolução satisfatória com pulsoterapia com corticosteróide e ciclofosfamida associadas a sessões de plasmaferese.

Palavras-chave: Hemorragia Alveolar; Glomerulonefrite; Granulomatose de Wegener; Síndrome de Goodpasture; Síndrome Pulmão-Rim.

Abstract

Goodpasture's syndrome (GS) is an auto-immune disease that is part of the pulmonary-renal syndrome spectrum. It is characterized by the linear deposition of anti-glomerular basement membrane antibodies (anti-GBM) in glomerular and alveolar basement membrane, resulting in alveolar hemorrhage and progressive glomerulonephritis. An early diagnosis is important to decrease clinical morbidity. In the present work, we illustrate a GS case, initially diagnosed as Wegener's granulomatosis. The patient showed favorable clinical evolution

with corticosteroid therapy associated with plasmapheresis and cyclophosphamide.

Keywords: Alveolar Hemorrhage; Glomerulonephritis; Goodpasture's syndrome; Wegener's Granulomatosis; Pulmonary-Renal Syndrome.

Introdução

A síndrome de Goodpasture (SG) é uma doença auto-imune que acomete a membrana basal alveolar e glomerular.¹ Foi descrita inicialmente em 1919 por Ernest Goodpasture num doente de 19 anos com hemorragia pulmonar e glomerulonefrite.² Em 1958, Stanton & Tange denominaram de SG uma série de doentes com características clínicas similares à da descrição inicial de Goodpasture.³ A identificação dos anticorpos anti-membrana basal glomerular (anti-MBG), em 1967, permitiu um melhor conhecimento dos mecanismos etiopatogénicos desta síndrome.

A SG acomete mais a raça branca, com predomínio discretamente maior no sexo masculino.⁴⁻⁶ Sua incidência é de aproximadamente 1 em 1 milhão de pessoas por ano.⁵ Ocorre em dois picos de incidência dependentes da idade. Um primeiro pico que afeta preferencialmente homens na 3ª década da vida e, um segundo pico, em ambos os sexos, a partir da 6ª década.⁵ Infecções virais, uso de cocaína e exposição a hidrocarbonetos são considerados como possíveis fatores desencadeantes da SG.^{4,7-9}

A SG é caracterizada pela presença de anticorpos anti-MBG e depósito linear destes anticorpos na membrana basal alveolar e glomerular, resultando em glomerulonefrite rapidamente progressiva.⁶ Os anticorpos anti-MBG circulantes exercem um papel fundamental na patogênese da doença, ao unirem-se aos epítomos, localizados na parte dominante não colágena, da cadeia $\alpha 3$, do colágeno tipo IV, da membrana basal.^{10,11} Na presença de anti-MBG, sem evidências de manifestação clínica, é utilizada a denominação «doença de Goodpasture».

*Disciplina da Reumatologia, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

**Laboratório de Fisiopatologia Renal (LIM 16), Disciplina de Patologia, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

Cerca de um quarto dos doentes com SG apresentam associados anticorpos anticitoplasma do neutrófilo (ANCA), preferencialmente anti-mieloperoxidase¹², representando um subgrupo de doentes com bom prognóstico uma vez instituído o tratamento, provavelmente por ser tratar de uma variante associada à vasculite.¹³

A recorrência da doença, caracterizada pela presença de anticorpos anti-MBG tem sido descrita, podendo ocorrer anos após a apresentação inicial, com ou sem evidência de doença renal ou pulmonar.¹⁴

Os sinais e sintomas iniciais de SG incluem sintomas *flu-like*, seguida de proteinúria e/ou hematúria microscópica.⁴ Mais de metade dos pacientes com a SG apresenta sinais e sintomas pulmonares, incluindo dispnéia, tosse, e hemoptise.⁶ Entre as manifestações renais, temos anasarca, hipertensão arterial sistêmica e insuficiência renal aguda. Raramente pode ocorrer artrite, neuropatia periférica, vasculite leucocitoclástica ou uveíte.⁴

A apresentação clínica nos jovens é frequentemente súbita, com hemoptise, queda do hematócrito, palidez, tosse, febre, dispnéia, hematúria e proteinúria não nefrótica. Por outro lado, a doença renal isolada é mais prevalente nos idosos, não se tendo verificado diferenças de sexo.⁴

No presente trabalho, relatamos um caso de SG em um paciente jovem do sexo masculino.

Caso clínico

Paciente masculino de 31 anos, pardo, previamente são, procurou serviço médico com queixa de tosse produtiva com 7 dias de evolução, acompanhada de picos febris $\leq 39^{\circ}\text{C}$. A teleradiografia do tórax inicial evidenciava infiltrado reticular na base do hemitórax direito, interpretada como sendo broncopneumonia adquirida da comunidade. O doente foi medicado com claritromicina por via oral durante 7 dias.

Após a antibioticoterapia, o paciente evoluiu com episódio de hemoptise, persistência de febre (38°C), e dispnéia ao repouso, sendo internado. Realizou nova radiografia de tórax que evidenciou infiltrado reticular à esquerda. Laboratorialmente, houve queda de 3 g/dL na hemoglobina sérica, (de 12,5 para 9,7 g/dL) e constatou-se insuficiência respiratória com hipóxia, necessitando intubação orotraqueal e ventilação mecânica. Foi iniciada a administração de ceftriaxone e azitromicina pa-

renteral, e realizada broncoscopia com colheita de lavado broncoalveolar que mostrou a presença de macrófagos contendo hemossiderina, com a pesquisa negativa para agentes infecciosos e para células neoplásicas. A tomografia computadorizada de tórax mostrou infiltrado alveolar nas bases de ambos os hemitórax.

Como a febre persistia mesmo após a antibioticoterapia parenteral, e o paciente evoluiu com descarga nasal purulenta, foi realizada tomografia computadorizada de seios da face que demonstrou pansinusite e mastoidite bilateral. Biópsia dos seios da face demonstrou infiltrado inflamatório inespecífico e ausência de granuloma ou sinais de vasculite. Apresentou melhora da febre após limpeza cirúrgica dos seios da face.

Com a hipótese diagnóstica de granulomatose de Wegener, foi iniciada pulsoterapia endovenosa com metilprednisolona 1 g ao dia, por 3 dias consecutivos, seguido de prednisona 1 mg/kg/dia oral, e gamaglobulina 400 mg/kg/dia por 5 dias. Apesar da terapia instituída, o paciente evoluiu com piora da função renal (Cr 1,59 mg/dL e Ureia 76 mg/dL), além de hematúria microscópica, sem distúrbio eritrocitário. Pesquisa de auto-anticorpos (FAN e ANCA) e imunocomplexos circulantes resultaram negativas, e os níveis de complemento total e frações C3 e C4 encontravam-se normais.

Foi administrada pulsoterapia endovenosa com ciclofosfamida 1 g/m² de superfície corpórea e o paciente apresentou melhora progressiva do quadro respiratório e estabilização da função renal após pulso. Dez dias após a pulsoterapia, e 15 dias após início da gamaglobulina e da metilprednisolona, o paciente apresentou novo quadro de hemoptise e piora da função renal (Cr 2,1 mg/dL). Optado então por 4 sessões de plasmáfereze por causa da hemoptise, havendo melhora progressiva do quadro pulmonar. Após 10 dias da plasmáfereze, pelo quadro clínico estável, o paciente foi extubado. A função renal manteve-se estável (Cr 1,8 mg/dL).

Após uma semana, evoluiu com piora rápida e progressiva da creatinina (Cr 5,4 mg/dL), sem fator agravante prévio como uso de drogas nefrotóxicas, infecção ou instabilidade hemodinâmica. Foi iniciada hemodiálise e realizada biópsia renal, que demonstrou presença de crescentes (Figuras 1 e 2) em 90% dos glomérulos representados. No exame de imunofluorescência indireta, havia depósitos lineares de IgG com distribuição difusa sobre os capilares glomerulares (dado não mostrado).

Diante da nova hipótese diagnóstica de SG, foi

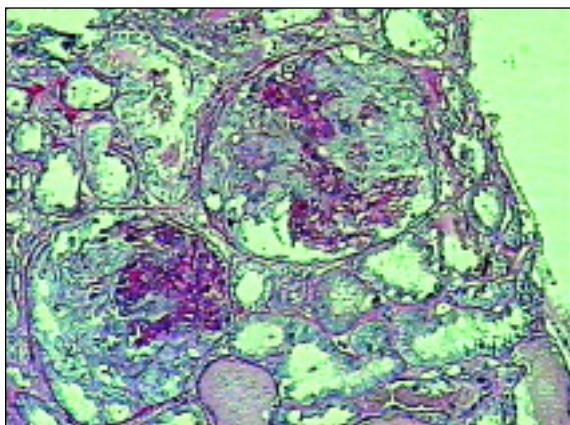


Figura 1. Glomérulos com proliferação extra-capilar formando crescentes de natureza predominantemente celular (200x, coloração com ácido periódico de Schiff, P.A.S.).

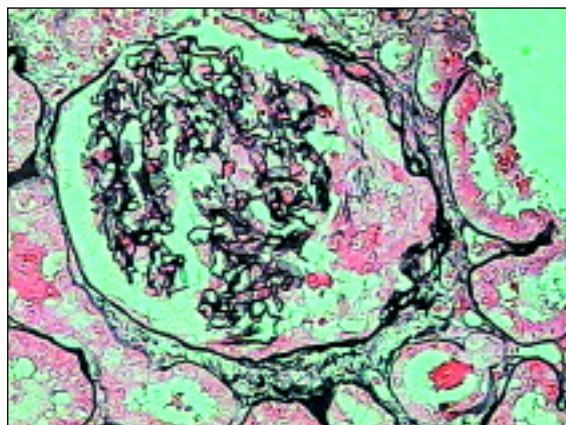


Figura 2. Presença de proliferação crescêntica preenchendo parte do Espaço de Bowman (400x, coloração com impregnação com prata metenamina, P.A.M.S.).

reiniciada plasmaferese (14 sessões) com melhora progressiva da função renal, sendo suspensa a hemodiálise (Cr 1,34 mg/dL). O paciente evoluiu com melhora do quadro clínico e recebeu a alta hospitalar para seguimento ambulatorial.

Discussão

O presente trabalho relata um caso de hemorragia pulmonar com nefrite e sinusite, sugerindo granulomatose de Wegener. Seu curso evolutivo, entretanto mostrou tratar-se de SG que teve evolução satisfatória com pulsoterapia com corticosteroíde e ciclofosfamida associadas a sessões de plasmaferese.

A SG faz parte do espectro da síndrome de pulmão-rim. Esta, por sua vez, pode acontecer em várias doenças, com diferentes mecanismos patogênicos, como vasculite sistêmica, poliangiíte microscópica, lúpus eritematoso sistêmico, granulomatose de Wegener, síndrome de Churg-Strauss, vasculite reumatóide, doença de Behçet, crioglobulinemia, edema pulmonar e insuficiência renal, uso de penicilamina e hidralazina, intoxicação por paraquato, pneumonia por *Legionella*, trombose da veia renal com embolia pulmonar, entre outras.^{5,15}

A SG é caracterizada por hemorragia pulmonar acompanhada da glomerulonefrite induzida pela presença de anticorpos anti-MBG, os quais podem estar na circulação sanguínea bem como na forma de depósito linear sobre a membrana basal glo-

merular na biópsia renal.¹⁶

Vale lembrar que a ocorrência de hemoptise isolada pode surgir em outras doenças, como fistula atrioventricular, insuficiência ventricular esquerda, embolia pulmonar, hipertensão pulmonar, trombocitopenia, bronquite, fibrose cística, neoplasia pulmonar, lúpus eritematoso sistêmico, aneurisma de aorta, trauma, etc.¹⁷

No momento do diagnóstico de SG, o prognóstico está relacionado com a presença de oligúria, fibrose avançada (mais de 50% de crescentes na biópsia renal, uma Cr superior a 5,7 mg/mL ou a necessidade de diálise).^{18,19} Os pacientes que apresentam doença moderada ou grave, e que não apresentam disfunção renal no momento do diagnóstico, geralmente respondem à terapêutica.

Por causa da evolução progressiva e rápida da doença e da alta mortalidade, o diagnóstico precoce é extremamente importante. Terapia inicial com plasmaferese combinada com ciclofosfamida oral e corticosteroíde em altas doses tem sido recomendada.^{6,18,20} Pacientes com glomerulonefrite rapidamente progressiva evoluindo com insuficiência renal aguda e que são tratados com plasmaferese e imunossupressão, apresentam uma boa resposta em 80 % dos casos.^{5,11} Neste caso, a plasmaferese é utilizada para diminuir o nível de anticorpos circulantes contra membrana basal glomerular. No entanto, já numa fase avançada, a doença tem fraca resposta a imunossupressores e plasmaferese.¹⁸

Plasmaferese diária deve ser mantida por um total de 14 dias ou até que os anticorpos anti-MBG tornem-se indetectáveis no soro. No presente caso,

os achados histológicos e a demonstração dos anticorpos anti-MBG permitiram confirmar o diagnóstico de SG e o paciente recebeu esquema de plasmaferese, associada a pulsoterapia com ciclofosfamida e corticoterapia e apresentou melhora progressiva do quadro clínico. Ressaltamos ainda a importância do exame de imunofluorescência na biópsia renal do paciente com síndrome pulmão-rim para determinar a etiologia da lesão morfológica observada. Assim, nos casos de síndrome de Goodpasture, há depósitos glomerulares com padrão linear; no lúpus eritematoso sistêmico o padrão é granular e, nas vasculites associadas ao ANCA, pauci-imune (depósitos glomerulares escassos ou ausentes).

Correspondência para:

Samuel Katsuyuki Shinjo
Disciplina da Reumatologia, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Av. Dr. Arnaldo, 455, 3º andar, sala 3133
CEP 01246-903, São Paulo, SP, Brasil.
E-mail: samuel.shinjo@gmail.com

Referências:

1. Bergs L: Goodpasture syndrome. *Critical Care Nurse* 2005; 25:50-58.
2. Goodpasture EW. The significance of certain pulmonary lesions in relation to the etiology of pneumonia. *Am J Med Sci* 1919; 58:863-870.
3. Stanton MC, Tange JD. Goodpasture's syndrome (pulmonary hemorrhage associated with glomerulonephritis). *Austr Ann Med* 1958;7:132-144.
4. Ambrus JL, Sridhan NR. Immunologic aspects of renal disease. *JAMA* 1997;278:1938-1945.
5. Salama AD, Levy JB, Lightstone L, Pusey CD. Goodpasture's disease. *Lancet* 2001;358:1374.
6. Bolton WK. Goodpasture's syndrome. *Kidney Int* 1996;50:1753-1766.
7. Stevenson A, Yaqoob M, Mason H, Pai P, Bell GM. Biochemical markers of basement membrane disturbances and occupational exposure to hydrocarbons and mixed solvents. *QJM* 1995;88:23-28.
8. Garcia-Rostan y Perez GM, Garcia Bragado F, Puras Gil AM. Pulmonary hemorrhage and antiglomerular basement membrane antibody-mediated glomerulonephritis after exposure to smoked cocaine (crack): a case report and review of the literature. *Pathol Int* 1997;47:692-697.
9. Wilson CB, Smith RC. Goodpasture's syndrome associated with influenza A2 virus infection. *Ann Intern Med* 1972;76:91-94.
10. Turner N, Mason PJ, Brown R, et al. Molecular cloning of the human Goodpasture antigen demonstrates it to be the alpha 3 chain of type IV collagen. *J Clin Invest* 1992;89:592-601.
11. Reisli I, Ozel A, Caliskan U, Cakir M, Tulunay O. Pathological case of the month: Goodpasture disease. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2001;155:1383-1386.
12. Kalluri R, Meyers K, Mogyrosi A, Madaio MP, Neilson EG. Goodpasture syndrome involving overlap with Wegener's granulomatosis and anti-glomerular basement membrane disease. *J Am Soc Nephrol* 1997;8:1795-1800.
13. Bosch X, Mirapeix E, Font J et al. Prognostic implication of anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies with myeloperoxidase specificity in anti-glomerular basement membrane disease. *Clin Nephrol* 1991;36:107-113.
14. Levy JB, Lachmann RH, Pusey CD. Recurrent Goodpasture's disease. *Am J Kidney Dis* 1996;27:573-578.
15. Valle L, Pimenta S, Pinto P, Valbuena C, Dias M, Carneiro Chaves F. Síndrome pulmão-rim. *Acta Med Port* 2005;18:235-240.
16. Lerner RA, Glasscock KJ, Dixon FJ. The role of antiglomerular basement membrane antibody in the pathogenesis of human glomerulonephritis. *J Exp Med* 1967;126:989-1004.
17. Oradell LR, Almenoff PL, Lesser M. A systematic approach to hemoptysis. *Patient Care* 1999;33:49-56.
18. Hudson BG, Tryggvason K, Sundaramoorthy M, Neilson EG. Alport's syndrome, Goodpasture's syndrome and type IV collagen. *N Engl J Med* 2003;348:2543-2556.
19. Levy JB, Turner AN, Rees AJ, Pusey CD. Long term outcome of anti-glomerular basement membrane antibody disease treated with plasma exchange and immunosuppression. *Ann Intern Med* 2001;134:1033-1042.
20. Savage CO, Pusey CD, Bowman C, Rees AJ, Lockwood CM. Antiglomerular basement membrane antibody mediated disease in the British Isles 1980-4. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1986;292:301-304.

CYCLOPHOSPHAMIDE-INTOLERANT WEGENER'S
GRANULOMATOSIS SUCCESSFULLY
TREATED WITH MYCOPHENOLATE MOFETIL

Alina Osuna,* Jesus Garrido**

Abstract

Cyclophosphamide (CYC) is a classical drug for the treatment of severe Wegener's granulomatosis (WG). However, as it causes substantial toxicity, alternative agents should be considered if optimal therapeutic CYC dose is not tolerated by an individual patient. We report the successful use of mycophenolate mofetil (MMF) in a 35-year-old patient with renal biopsy-proven pANCAWG and lung involvement. Despite a good clinical and biological response to the standard induction of remission therapy, the patient developed persistent severe CYC-related leucopenia after two months of treatment. Thus, CYC was replaced by MMF, and during the three and a half years of follow-up the patient never required haemodialysis. He has remained in complete clinical remission for the last two years, without MMF-related adverse effects.

Keywords: Wegener's Granulomatosis; Cyclophosphamide; Mycophenolate Mofetil.

Resumo

A ciclofosfamida (CYC) é o fármaco classicamente utilizado no tratamento das formas graves da granulomatose de Wegener (WG). No entanto, devido à sua elevada toxicidade, fármacos alternativos devem ser considerados sempre que doses terapêuticas não sejam toleradas. Os autores relatam o sucesso obtido no tratamento de um jovem de 35 anos com WG pANCA+, confirmada por biópsia renal, e com atingimento pulmonar. Apesar da boa resposta clínica e laboratorial à terapêutica instituída para indução da remissão, o doente desenvolveu, dois meses após início do tratamento, leucopenia grave associada ao uso da CYC, o que

impossibilitou a continuação deste tratamento. A CYC foi então substituída pelo MMF. Durante os três anos e meio de seguimento o doente nunca necessitou de realizar hemodiálise. Mantém-se em remissão completa há mais de dois anos sem evidência de efeitos adversos relacionados com o uso de MMF.

Palavras-chave: Granulomatose de Wegener; Ciclofosfamida; Micofenolato Mofetil.

Introduction

Wegener's granulomatosis (WG) is a systemic necrotizing vasculitis of small and medium size vessels, classically involving the respiratory tract and the kidneys. The presence of pathogenic serum ANCA and a biopsy of the affected organ helps for diagnostic confirmation. Cyclophosphamide (CYC) increased dramatically the long-term survival rates of WG patients¹⁻³, however its toxicity is substantial and therefore other agents should be used when CYC is not tolerated. Recently, Mycophenolate mofetil (MMF) has been used as a possible alternative for induction of remission and maintenance treatment.⁴⁻⁷ We describe a newly diagnosed WG young patient with a follow-up of three and a half years, successfully managed with MMF.

Case Report

A 35-year-old male, construction worker, with a month history of hypertension, hematuria, and impaired renal function, presented to the emergency department complaining of dyspnea, hemoptysis and chest pain. His blood pressure was 149/84 mmHg, heart rate 112 bpm, respiratory rate 42 cpm and temperature 37.6°C. Pulmonary examination revealed bilateral crepitations. The otorhinolaryngology evaluation showed bleeding from the pos-

*Serviço de Medicina 2, Hospital São Teotónio.

**Unidade de Nefrologia e Diálise, Hospital São Teotónio

terior pharynx.

At admission he presented anemia (Hb 6.2 g/dL), with normal leukocyte and platelet count, an elevated erythrocyte sedimentation rate (ESR) of 112 mm/h (normal range <10.0 mm/h) and C-reactive protein (CRP) concentration of 15.3 mg/dL (normal range <0.50 mg/dL). Coagulation was normal. The blood level of urea nitrogen (BUN) was 117 mg/dL (normal range 14-42 mg/dL) and serum creatinine 2.9 mg/dL (normal range 0.6-1.3 mg/dL). Lactate dehydrogenase (LDH) was 1355 U/L (normal range 200-480 U/L). The arterial blood gas (ABG) revealed hypoxemia. Urine test strip (Combur test®) contained 3+ protein, 3+ blood, and 2+ leukocytes. The chest radiograph showed bilateral alveolar infiltrates (Figure 1A).

He was transferred to the Intensive Care Unit (ICU) for ventilatory support with the clinical suspicion of lung-kidney syndrome and treated with intravenous antibiotics and corticosteroids because of severe respiratory failure, with symptomatic improvement.

Antinuclear antibodies (ANA), extractable nuclear antigen (ENA) and antiglomerular basement membrane antibodies (anti-GBM) tests were negative. Indirect immunofluorescent test for antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) was positive, giving a perinuclear staining (pANCA), and was confirmed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) as anti-myeloperoxidase (anti-MPO) positive (anti-proteinase 3 negative). The adenosine desaminase (ADA) and angiotensin-converting enzyme (ACE) levels were normal. The screening for an infection was negative.

The urinalysis study revealed proteinuria of 7.4 g/24h (normal range 0.05-0.08 g/24h) and a creatinine clearance of 39.2 ml/1.73 m² (normal range 90-139 ml/m²). The urinary sediment evidenced blood, proteins, leukocytes and no red cell (RBC) casts. The thoracic CT scan showed extensive bilateral diffuse alveolar infiltrates suggestive of diffuse alveolar hemorrhage (DAH) (Figure 1B).

WG was diagnosed and treatment with intravenous methylprednisolone daily pulses (MTP-p) of 1g for 3 days, followed by daily oral corticosteroids (OCS) prednisolone (1mg/kg - 60 mg) and oral CYC (100 mg) started. Trimethoprim-sulfamethoxazole (TMP/SMZ 160/800 mg) three times a week for *Pneumocystis jiroveci* pneumonia prophylaxis was added. After clinical improvement, a renal biopsy was performed, evidencing a diffuse endo-extra-capillary pauci-immune proliferative glomeru-

lonephritis in an advanced sclerosing stage with intense chronic interstitial nephritis and granuloma (Figure 2).

The evolution was markedly favourable (see Figure 3 for details). Two weeks after initiation of treatment with CYC, serum creatinine decreased to 1.5 mg/dL and CRP normalized (0.5 mg/dL). The BVAS/WG, a validated disease-specific activity score⁸, which captures all possible organ manifestations of the disease, fell from 13 at presentation to 3. The patient was discharged in a stable condition.

After two months of CYC, he developed severe leucopenia ($0.9 \times 10^9/L$), which did not resolve after dosage reduction. The patient was re-hospitalized, treated with granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) and CYC was discontinued. Several days later, due to gastrointestinal bleeding, a colonoscopy with biopsy was performed revealing a tubulovillous adenoma with high-grade dysplasia which was resected. Oral corticosteroids were maintained.

Three and a half months later, the CRP had normalized (0.2 mg/dL) and the ESR had decreased to 32 mm/h. Proteinuria (6.1 g/day) and active urinary sediment persisted; serum creatinine remained stable at the baseline value of 2.0 mg/dL, while the pANCA elevated titres persisted (31 U). Mycophenolate mofetil was instituted at an initial dose of 1g/day. At this moment, the leukocyte count was normal. Seven weeks later, the patient developed dyspnea with respiratory insufficiency and bilateral pulmonary infiltrates, without renal function deterioration (serum creatinine 1.8 mg/dL; proteinuria 2.5 g/day with active urinary sediment). Both acute phase parameters were elevated (CRP 12.5 mg/dL; ESR 86 mm/h); the pANCA titer was 29.7 U. These features were consistent with a recurrence of pulmonary vasculitis that resolved with MTP-p of 1g for 3 days followed by prednisolone 60 mg/day and an increase of MMF dose (1.5 g/day). The BVAS/WG score was 5.

After three months, the respiratory insufficiency recurred with constitutional features. Chest radiograph disclosed moderate infiltrates. The ESR was 75 mm/h and the CRP was 2.3 mg/dL. The creatinine level rose again to 2.9 mg/dL and pANCA titer was 33 U. A screening for an infection was negative. The BVAS/WG score was 5. A new course of MTP-p followed by OCS was administrated and the MMF dosage was further increased to 2 g/day with clinical improvement. One month later, the



Figure 1. Chest imaging at hospital admission showing extensive diffuse bilateral alveolar infiltrates. **A.** Chest X-ray. **B.** Thoracic CT scan.

patient was asymptomatic. A value of 1 was recorded for the BVAS/WG score; however, he had developed corticosteroid-induced diabetes mellitus and premature cataract. OCS were tapered down while he was maintained on MMF 2g/day and TMP/SMZ prophylaxis.

Three months later, the patient had a cutaneous infection due to *Staphylococcus hominis* that was rapidly controlled with antibiotics.

Since then the patient initiated a sustained complete clinical remission with no signs or symptoms suggestive of active vasculitis (BVAS/WG=0). Six months later, the OCS were discontinued and the patient was maintained on MMF 2g/day and

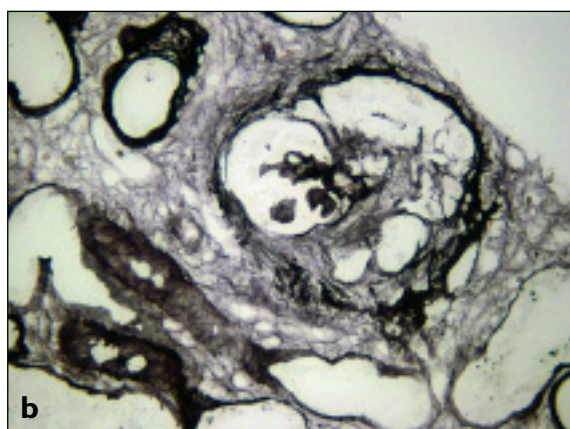
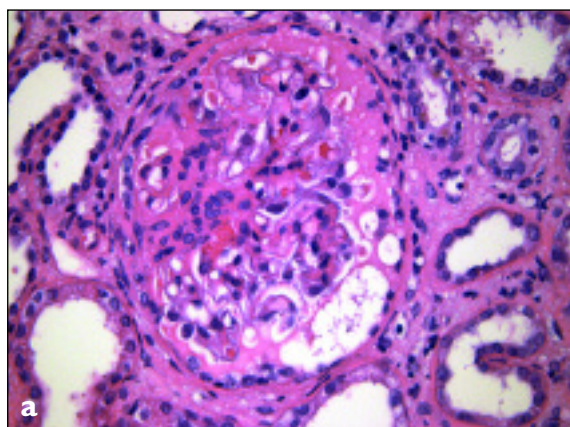


Figure 2. Renal biopsy **A.** Diffuse endo-extracapillary proliferative glomerulonephritis (H/E x400). **B.** Specimen showing ischemia and granuloma (MAR x400).

TMP/SMZ prophylaxis. Seven months later, the patient started a gradual MMF tapering, being its dosage 500 mg/day after six months.

The clinical course of the patient, the therapy as well as some objective parameters that were monitored on follow-up are illustrated in Figure 3.

Discussion

Before CYC, patients with severe WG had a mortality rate of 80% within the first year after the diagnosis.¹ The combined treatment with corticosteroids resulted in marked improvement or partial remission (PR) in 91% of patients and complete remission (CR) in 75% of patients.^{2,3} Unfortunately, CYC exposes patients to severe life-threatening side-effects.³

MMF is an immunosuppressive drug used in

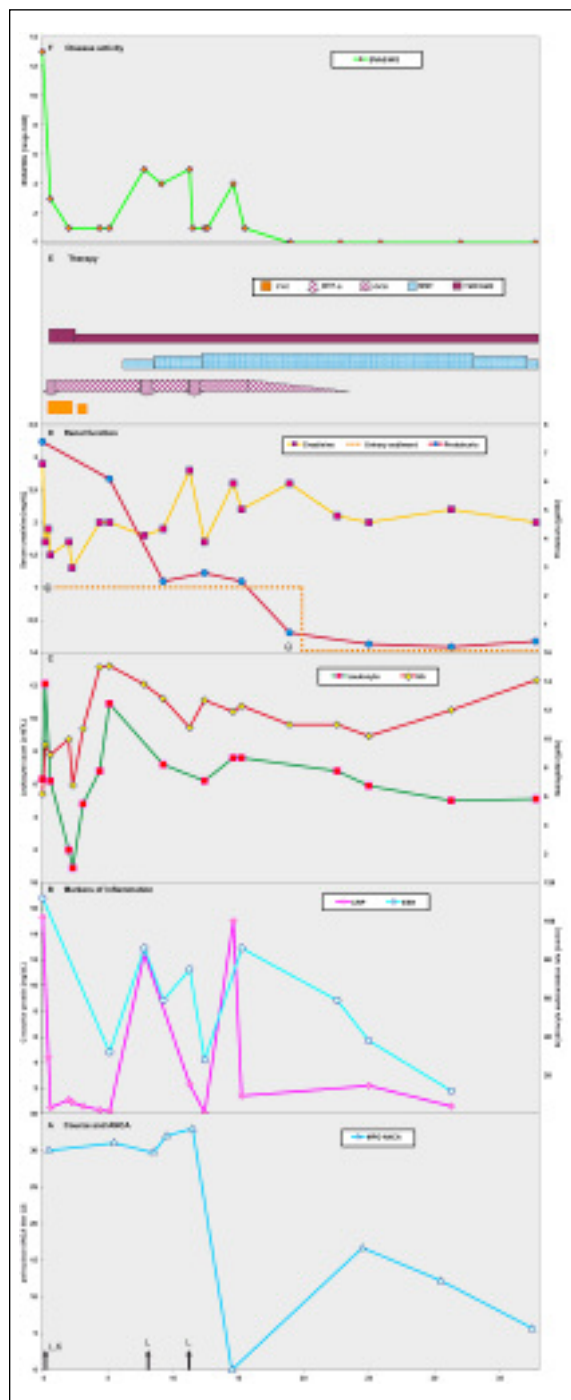


Figure 3. Disease evolution and therapy: The initial presentation of the patient at our institution in January 2004 is indicated by the 0 in the time-axis (in months). **A.** Titres of pANCA. Also shown are the sites of major-organ active disease as indicated by arrows (L- lung involvement, K- kidney involvement). **B.** Acute-phase response parameters ESR and CRP. **C.** Serum Leukocyte count and Hemoglobin concentration. **D.** Renal function evaluation, indicated by serum creatinine, urine sediment and proteinuria. **E.** Chart diagram of the treatment of the patient. **F.** Disease activity, measured by the BVAS/WG score.⁸

transplant medicine with rather low toxicity due to its lymphocyte-selective mode of action and therefore representing an attractive drug for the treatment of autoimmune disorders with pathogenic autoantibodies, such as ANCA-associated small vessel vasculitis (AASVV).

A 52-weeks pilot study⁴ assessed the effectiveness of MMF in inducing remission in subjects resistant to CYC. Twelve AASVV subjects were enrolled, including 7 with WG (3 CYC-resistant and 4 with relapses). The response to MMF varied in the study group. Although transient CR and favourable long-term response could be induced in 6 of 10 evaluable subjects, only a minority (n=3) achieved a long-lasting remission. Another study addressed the efficacy of MMF as alternative to CYC for induction of remission in 32 patients with active AASVV (29 WG and 3 MPA) who could not be treated with CYC (all except 1 patient had already been treated for previous relapse episodes).⁵ CR was achieved in 25 patients (78%), PR in 6 (19%) after 2.2 (1-5) months, whereas 1 (3%) patient did not respond. Nineteen patients with initial response relapsed 12 (2-58) months after starting the treatment. The median relapse-free survival on MMF therapy was 16 months, which is comparable to the interval between the previous relapse and the current treated episode of active disease (17 months).

On the other hand, two small trials examined the safety of MMF for maintenance therapy in patients with active WG after achieving remission with CYC and glucocorticoids.^{6,7} In a 50-month study⁶, all the enrolled patients (n=14) had WG, of these, 5 were in the initial phase of their disease and 9 experienced a relapse. Although MMF effectively maintained remission in 8 patients for a median time of 27 months, disease relapse occurred in 6 with a median time from remission to relapse of 10 months (range 1-25 months). The relapse rate was (6/14; 43%). In another 15-month study⁷, only 1 WG out of 11 patients recruited (2 patients with MPA and 9 with WG), relapsed at the 14th month of maintenance therapy, what gives a WG-specific relapse rate of (1/9; 11%). It is worth noting that the authors of this study, successfully prescribed MMF as an induction treatment to replace CYC at week 9 in an intolerant-to-CYC MPA patient.

In the case reported, agents other than MMF were considered as rescue therapy to resume the treatment after the prematurely withdrawal of CYC therapy. One of them, methotrexate (MTX), is con-

traindicated in patients with renal insufficiency⁹, being effective, from the time of diagnosis, only for less severe forms of the disease.¹⁰ Azathioprine (AZA) can be used in the setting of renal insufficiency, however, it has not been found to effectively induce remission of active major organ disease.² Biologic therapies, that target specific immunologic components involved in the pathogenesis of WG disease are being explored, and constitute new options beyond steroids and cytotoxic drugs.¹¹ Our choice was dictated by MMF safety profile, case series reports and our own previous satisfactory experience with this drug in other diseases including lupus nephritis (LN).

Besides the more conventional adverse effects of MMF derived from its use in the setting of WG⁴⁻⁷, a hitherto unknown side effect of this drug has been recently reported.¹² According to this report, the administration of MMF at a dose of 2 g/day in two longstanding relapsing WG patients, caused a severe acute inflammatory syndrome characterized by fever, arthralgias and severe muscle pain, that necessitated interruption of the therapy. This reaction was attributable to the systemic proinflammatory cytokine release, induced by one of its metabolites.

In conclusion, the treatment with MMF was effective and well tolerated. The therapy with MMF was able to reduce to maintain the disease activity at zero. However, to date, there is still not enough published evidence to support the use of MMF in patients with active WG on a large scale. No randomized studies comparing the efficacy of MMF with CYC administered from the diagnosis have been undertaken in AASVV in general and WG in particular. We report on the effective use of this drug in a WG patient who was intolerant to CYC in the acute phase of the disease. In this regard, we advocate an individualized treatment.

Correspondência para:

Alina Osuna
Hospital São Teotónio, Serviço de Medicina 2,
Av. Rei D. Duarte 3504-509 Viseu, Portugal
E-mail: osuna.alina@gmail.com

References:

1. Walton EW. Giant-cell granuloma of the respiratory tract (Wegener's granulomatosis). *Br Med J* 1958;34: 265-270.
2. Fauci AS, Haynes BF, Katz P, Wolff SM. Wegener's granulomatosis: prospective clinical and therapeutic experience with 85 patients for 21 years. *Ann Intern Med* 1983;98:76-85.
3. Hoffman GS, Kerr GS, Leavitt RY et al. AS. Wegener granulomatosis: an analysis of 158 patients. *Ann Intern Med* 1992;116:488-498.
4. Joy MS, Hogan SL, Jennette JC, Falk RJ, Nachman PH. A pilot study using mycophenolate mofetil in relapsing or resistant ANCA small vessel vasculitis. *Nephrol Dial Transplant* 2005;20:2725-2732.
5. Stassen PM, Cohen Tervaert JW, Stegeman CA. Induction of remission in active anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis with mycophenolate mofetil in patients who cannot be treated with cyclophosphamide. *Ann Rheum Dis* 2007;66: 798-802.
6. Langford CA, Talar-Williams C, Sneller MC. Mycophenolate mofetil for remission maintenance in the treatment of Wegener's granulomatosis. *Arthritis Rheum* 2004;51:278-283.
7. Nowack R, Gobel U, Klooker P, Hergesell O, Andrassy K, van del Woude FJ. Mycophenolate mofetil for maintenance therapy of Wegener's granulomatosis and microscopic polyangiitis: a pilot study in 11 patients with renal involvement. *J Am Soc Nephrol* 1999;10:1965-1971.
8. Stone JH, Hoffman GS, Merkel PA et al. A disease-specific activity index for Wegener's granulomatosis: modification of the Birmingham Vasculitis Activity Score. *Arthritis Rheum* 2001;44:912-920.
9. Furst DE. The rational use of methotrexate in rheumatoid arthritis and other rheumatic diseases. *Br J Rheumatol* 1997;36:1196-1204.
10. Sneller MC, Hoffman GS, Talar-Williams C, Kerr GS, Hallahan CW, Fauci AS. An analysis of forty-two Wegener's granulomatosis patients treated with methotrexate and prednisone. *Arthritis Rheum* 1995;38: 608-613.
11. Guillevin L, Pagnoux C. Treatment of refractory and/or severe ANCA-associated systemic necrotizing vasculitis. *IMAJ* 2008;10:89-91.
12. Maes B, Oellerich M, Ceuppens JL et al. A new acute inflammatory syndrome related to the introduction of mycophenolate mofetil in patients with Wegener's granulomatosis. *Nephrol Dial Transplant* 2002;17: 923-926.

ANKYLOSING SPONDYLITIS
AND SPINAL CORD INJURY

Pedro Machado,* Jan Gawronski,* Angela Gall*

Abstract

Ankylosing spondylitis patients are reported to be at greater risk for vertebral fractures and spinal cord injury. We describe the case of a 72-year-old male with a long history of ankylosing spondylitis who sustained a vertebral fracture after minor trauma. The fracture was initially missed on conventional radiographs but was later diagnosed by magnetic resonance imaging, after the development of new neurological symptoms. With this case report the authors outline the factors that increase the incidence of vertebral fractures and spinal cord injury in ankylosing spondylitis patients and discuss prevention strategies to avoid this devastating complication of the disease.

Keywords: Ankylosing Spondylitis; Vertebral Fracture; Spinal Cord Injury; Osteoporosis.

Resumo

Os doentes com espondilite anquilosante apresentam um risco aumentado de fracturas vertebrais e de lesão medular. Os autores descrevem o caso de um doente do sexo masculino, com 72 anos de idade, com espondilite anquilosante avançada, que sofreu uma fractura vertebral após um pequeno traumatismo. A fractura não foi inicialmente diagnosticada nas radiografias convencionais, mas foi mais tarde identificada por ressonância magnética, após o aparecimento de novos sinais neurológicos. Com este caso clínico, os autores salientam os factores que aumentam o risco de fracturas vertebrais e de lesão medular nos doentes com espondilite anquilosante e discutem estratégias de prevenção que permitam evitar esta dramática complicação da doença.

*Spinal Cord Injury Centre, Royal National Orthopaedic Hospital, Stanmore, London, United Kingdom

Palavras-chave: Espondilite Anquilosante; Fractura Vertebral; Lesão Medular; Osteoporose.

Introduction

Ankylosing spondylitis (AS) is a chronic inflammatory disease affecting mainly the axial skeleton and characterized by ossification of the spinal discs, joints, and ligaments, leading to progressive rigidity and altered biomechanical properties of the spine.¹ It can be associated with impaired balance, osteoporosis, and a reduced ability to take protective measures during a fall.^{2,3} As a consequence of these changes this population is at an increased risk of vertebral fractures and spinal cord injury (SCI). The initial skeletal vertebral trauma can often be missed predisposing the patient to a secondary neurological injury. Inadequate awareness of these injuries and inappropriate management, both in the pre-hospital and in the hospital setting can have devastating consequences. Given the higher incidence of SCI and the increased morbidity and mortality rates in patients with AS who suffer a SCI (frequently due to respiratory impairment), it is critical that prevention strategies be developed to avoid this devastating complication of the disease.^{4,5}

Case report

A 72-year-old white male with a long history of AS accidentally fell at home from an upright standing position, landing on his back. On admission to the local hospital, he complained of back pain only. There was no head injury. Spinal and pelvic radiographs revealed typical features of advanced AS with bilateral total hip replacement (Figure 1) without features of an injury or fracture to the vertebral column. Recent right sided rib fracture was found on chest radiograph.

The patient was admitted to hospital for analgesic control of severe spinal pain and mobilisation.

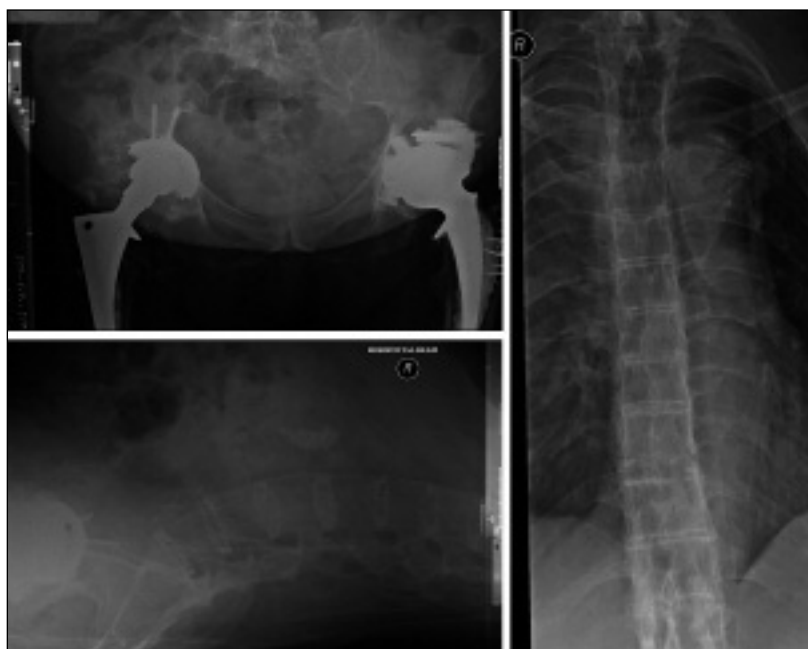


Figure 1. Radiographs of the pelvis and thoracic and lumbar spine showing advanced features of ankylosing spondylitis (ligamentous ossification, squaring of the vertebral bodies, syndesmophytosis and grade IV bilateral sacroiliitis) and bilateral total hip replacement.

Five days after the initial insult, the patient developed loss of sensation from the abdominal wall below, with loss of power, reflexes and tone in both lower limbs and loss of anal sphincter (no voluntary anal contraction and no anal sensation) and bladder function.

Urgent magnetic resonance imaging (MRI) revealed a T10-T11 fracture dislocation with suggestion of cord transection at that level (Figure 2). Whilst an inpatient at the local hospital, he was treated for right sided haemothorax.

The patient was then transferred to our hospital, a regional centre for traumatic spinal cord injury surgery and rehabilitation. Spinal cord injury ASIA classification⁶ on admission was T6 paraplegia ASIA A. He underwent T7 to L1 posterior fusion for T10-T11 fracture dislocation (Figure 3) and had a tracheostomy tube inserted as for management of respiratory impairment and an anticipated period of ventilatory care. The tracheostomy tube was later removed. He was subsequently transferred from intensive care to the Spinal Cord Injury Centre for a period of intensive interdisciplinary rehabilitation to optimize function and reintegration and facilitate a safe discharge home. Due to suboptimal spinal stability at the T10-T11 level, 20 weeks after the first surgery the patient un-

derwent a T10-T11 cage insertion (Figure 4 and 5).

Treatment included analgesics, low-molecular-weight heparin & compression stockings as prophylactic treatment for venous thrombo-embolism, proton-pump-inhibitor, laxatives and adequate nutrition (in the early stages of admission required gastric feeding) and skin care. Dual-energy x-ray absorptiometry (DEXA) testing preformed at the lumbar spine and forearm revealed osteoporotic values according to the World Health Organization thresholds, and calcium, cholecalciferol and bisphosphonates were also prescribed.

Physiotherapy in the acute stages focussed on maintenance of joint range of movement and tissue extensibility whilst in the intensive care unit and maintenance of patent airways whilst intubated (e.g. positioning, suction and shaking). He also required bilateral chest drains for post-operative recurrence of bilateral pleural effusions.

Three weeks after the first surgery the patient was cleared for mobilisation in a thoracic-lumbar-sacral orthosis (TLSO) and hoisted into a wheelchair. On assessment of his musculoskeletal system he had features consistent with chronic AS e.g. limited range of movement of his cervical spine, thoracic hyperkyphosis and limited shoulder and hip range of movement bilaterally. Limited range of

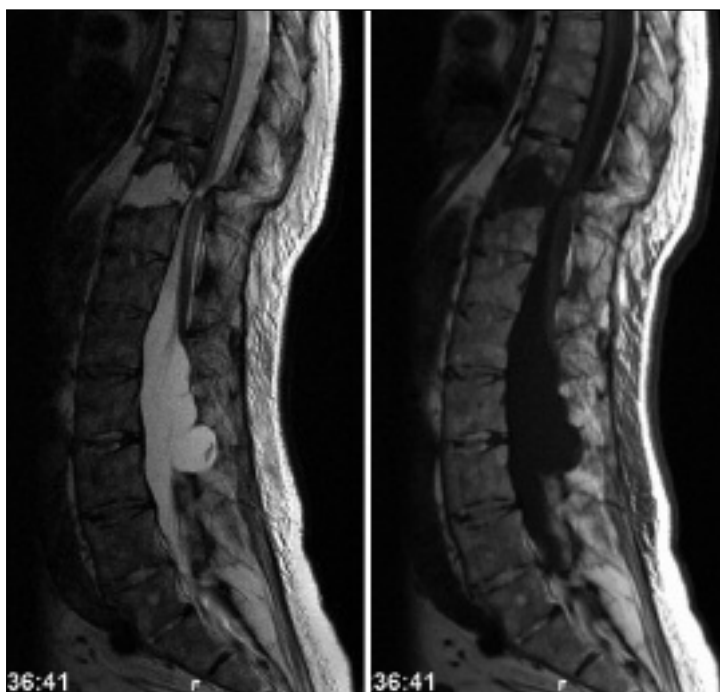


Figure 2. T2 (left) and T1-weighted (right) sagittal MR images of thoracolumbar spine revealing a T10-T11 fracture dislocation with suggestion of cord transaction at that level.

hip flexion caused restriction of sitting position and required the use of a seating system fixed in extension. Sitting tolerance was gradually increased and focus was made on an upper limb exercise programme, function improvement, standing programme, and identification of a suitable wheelchair, cushion, backrest and home equipment to increase functional independence.

ASIA classification⁶ on discharge was T6 paraplegia ASIA A. Urodynamics revealed a well suppressed bladder and long term oxybutynin was recommended. He was able to undertake self-intermittent clean catheterisation. Due to physical restriction imposed by fracture, AS and TLSO, the patient was not able to reliably perform his own bowel care. Skin was intact. There were no documented episodes of autonomic dysreflexia, although given his level of injury he is at risk and therefore has received full education and was advised to be supplied at all times with nifedipine capsules which can be pierced and expressed under the tongue in an emergency. He was taking nutrition orally and there were no swallowing or communication issues. Minimal spasticity was controlled with baclofen. Lung function tests revealed a mild restrictive ventilatory dysfunction not com-

promising his respiratory status. A six week surgical and a three month medical and urology follow-up were scheduled.

Discussion

We describe the case of a 72-year-old man with a long history of AS who developed a complete SCI after a fall. There is data suggesting that patients with AS have an increased rate of SCI.^{4,7,8} Alaranta *et al*⁴ recently determined that the incidence of SCI in patients with AS was 11.4 times higher than in the population at large. The proportion of complete SCI also appears to be higher.^{4,5,8,9} Although our patient had a thoracic lesion, a higher incidence of cervical SCI has been noted in the population with AS.⁴ Patients with AS who sustain a SCI are also older than the general spinal cord-injured population.^{4,7,8,10,11}

The higher incidence of SCI in AS is directly correlated with the increased incidence of vertebral fractures in patients with AS. Cooper *et al*⁷ found an odds ratio of 7.7 for clinically significant vertebral fractures, as compared with the general population, and noted that the cumulative incidence of



Figure 3. Thoracolumbar spine radiograph after T7 to L1 posterior instrumented fusion for T10-L1 fracture. Screws were placed into T7 to T9 bilaterally and then into T11 to L1. Two rods were used.

vertebral fractures appears to peak at 17% in the third decade after diagnosis. Geusens *et al*¹² recently reviewed the risk factors associated with vertebral fractures in the population with AS: sex (men more than women), age, low body mass index, osteoporosis, disease duration, degree of syndesmophytosis, peripheral joint involvement, increased modified Stoke AS Spine Score, increased restriction of spinal movement and increased occiput-to-wall distance. These data fit well in the case we describe.

Fracture risk is associated with bone properties and fall-related risks. Regarding bone properties, the two central features of AS that promote the pathological remodelling of the vertebral column are inflammation and new bone formation. As the spine in the patient with AS fuses through ligamentous ossification and syndesmophytosis, a rigid hyperkyphotic deformity develops. Biomechanically, the fused spine acts as a rigid lever that is incapable of appropriately dissipating the energy of a traumatic event.¹³⁻¹⁵ Although new bone formation is central to the pathogenesis of AS, this pathological entity is also associated with osteoporosis and low bone mineral density.^{12,16} This seemingly paradoxical finding is attributed to an un-

coupling of the bone formation and bone resorption processes. Therefore, although ectopic bone formation occurs within the inflamed vertebral entheses, bone resorption, through increased osteoclast activity, also occurs at an unregulated rate within the vertebra and promotes weakening of the spinal column.¹² The altered spinal biomechanics combined with the brittle quality of the osteoporotic bone in patients with AS greatly increase susceptibility to vertebral column fractures, even after minor, often trivial, trauma.^{2,4,7,17} The case we present clearly illustrates the consequences of these mechanisms.

Regarding falls, they are the most frequent cause of SCI in patients with AS.^{1,3} The aetiology of the injury in our patient was also a fall. The propensity for fall is increased by poor posture, impaired balance and impaired mobility. The poor posture is a result of changed biomechanics in the enclosed spine that leads to loss of normal curvatures and a shifting of the centre of gravity. The rigid, kyphotic spinal deformities as well as a variable degree of peripheral joint arthritis are factors that exacerbate gait unsteadiness and thus increase susceptibility to falls and reduces the ability to take protective measures during a fall.¹ The spinal deformity can

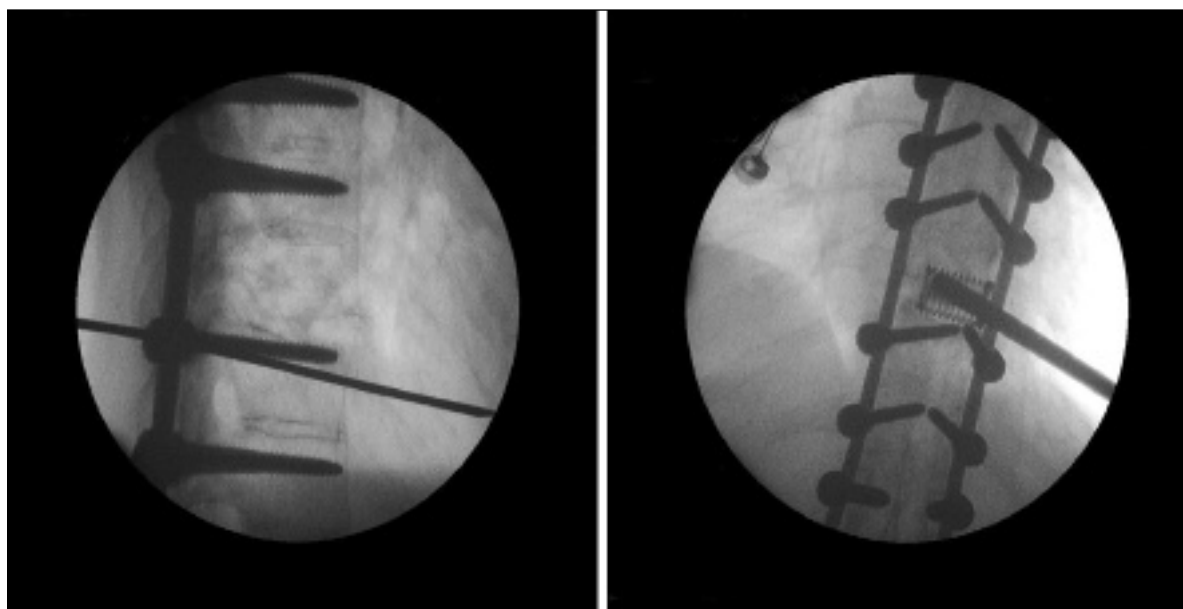


Figure 4. Per-operative image intensifier films showing a cage insertion at the level of T10-T11.

also compromise the vertical field of vision making it difficult for the individual to see what is in front of him/her.³

Other factors contribute to the increased incidence of SCI in patients with AS. As it happened in the case we report, vertebral fractures are often initially missed in patients with AS. This is likely to be related to the usual background of trivial trauma (yielding a low index of suspicion), overlooked pain complaints by attributing axial pain to normal disease activity and also because fractures can be difficult to identify on conventional radiographs due to the distortion of normal anatomy by the ossified spinous ligaments. Moreover, as it also happened in our patient, the neurological findings can be subtle or non-existent on initial presentation with neurological deterioration occurring later. This has been identified by several authors.^{3,18} Therefore, a thorough history and careful physical examination are required to avoid underestimating the severity of the injury and more refined imaging (e.g CT, MRI) should be considered whenever a patient with AS presents with symptoms of new neck or back pain, no matter how minor or trivial the reported mechanism of injury.

Even when fractures are appropriately diagnosed, spinal column fractures in patients with AS are notoriously unstable and this correlates with an increased incidence of SCI. This high level of ins-

tability is directly related to the AS disease process. AS promotes the ossification of spinal ligaments, which then also fracture as part of the injury pattern, further decreasing the structural support available to the spinal column. Any fracture that results usually involves all 3 columns resulting in instability, as in the case we report (Figure 2). Moreover, the greater instability significantly increases the risk of iatrogenic SCI during patient transportation and manoeuvres aimed at reducing fracture dislocation. Accordingly, great care should be used whenever patients with AS and spinal fractures are moved, and reduction manoeuvres, if necessary, should be performed only by experienced individuals.

The incidence of SCI is also increased in the setting of AS because of the greater incidence of spinal epidural hematoma.^{7,19,20} Where an interval occurs between trauma and the onset of neurological signs or worsening of the neurological picture the formation of an epidural haematoma should be suspected and excluded by means of an MRI scan.

The management of SCI in the population with AS is further complicated by an advanced patient age, decreased chest wall expansion and the presence of multiple possible medical comorbidities, namely the extra-articular manifestations of the disease. Physiotherapy can be particularly challenging given the special musculoskeletal features of



Figure 5. Thoracolumbar spine radiograph after osteotomy and re-alignment of the spine with fixation rods from T7-L1 and cage insertion at the level of T10-T11.

the AS patient.

The patient that we describe demonstrates many of the pitfalls that are present all along the treatment pathway. The unique nature of spinal column injuries in AS makes it imperative that it is treated with required caution from the start by the initial response team, by the accident and emergency staff, and by the treating orthopaedic or spinal injury team until definitive management is completed. This would be facilitated if the paramedical personnel and medical staff are aware of the diagnosis. Medical alert bracelets or cards have been proposed as a mean to identifying patients with AS so that appropriate precautions can be instituted by emergency services.³ Other primary prevention strategies have also been proposed as means of avoiding SCI in this susceptible population^{4,5}: encouragement to install activity aids such as handrails beside all staircases and within

bathrooms, use of night lights in bedrooms and bathrooms, avoidance of loose area rugs that present a tripping risk, avoidance of excessive use of alcohol, avoidance of all contact sports or other high-impact physical activities, wearing seat belts at all times while driving and liberal use of car seat headrests. Moreover, DEXA scanning should be considered early in the disease stage, ideally before fractures, and drug treatment for osteoporosis should be considered in any patient with a T-score lower than -2.5.¹² Finally, an early and reliable diagnosis and treatment of AS is another very important and relevant issue. There is a need for an early diagnosis in all patients with AS or undifferentiated spondylarthropathies with axial involvement in order to prevent the pathological changes that increase the susceptibility to fractures and SCI. This is especially relevant given that more effective treatment options are now available.

Correspondence to:

Pedro Machado
 Serviço de Reumatologia dos Hospitais da Universidade
 de Coimbra
 Praceta Mota Pinto
 3000-075 Coimbra, Portugal
 E-mail: pedrommcmachado@gmail.com

References:

1. Bot SD, Caspers M, Van Royen BJ, Toussaint HM, Kingma I. Biomechanical analysis of posture in patients with spinal kyphosis due to ankylosing spondylitis: a pilot study. *Rheumatology (Oxford)* 1999;38:441-443.
2. Cooper C, Carbone L, Michet CJ, Atkinson EJ, O'Fallon WM, Melton LJ, 3rd. Fracture risk in patients with ankylosing spondylitis: a population based study. *J Rheumatol* 1994;21:1877-1882.
3. Thumbikat P, Hariharan RP, Ravichandran G, McClelland MR, Mathew KM. Spinal cord injury in patients with ankylosing spondylitis: a 10-year review. *Spine* 2007;32:2989-2995.
4. Alaranta H, Luoto S, Konttinen YT. Traumatic spinal cord injury as a complication to ankylosing spondylitis. An extended report. *Clin Exp Rheumatol* 2002;20:66-68.
5. Jacobs WB, Fehlings MG. Ankylosing spondylitis and spinal cord injury: origin, incidence, management, and avoidance. *Neurosurg Focus* 2008;24:12.
6. Maynard FM, Jr, Bracken MB, Creasey G et al. International Standards for Neurological and Functional Classification of Spinal Cord Injury. American Spinal Injury Association. *Spinal Cord* 1997;35:266-274.
7. Rowed DW. Management of cervical spinal cord injury in ankylosing spondylitis: the intervertebral disc as a cause of cord compression. *J Neurosurg* 1992;77:241-246.
8. Tico N, Ramon S, Garcia-Ortun F et al. Traumatic spinal cord injury complicating ankylosing spondylitis. *Spinal Cord* 1998;36:349-352.
9. Murray GC, Persellin RH. Cervical fracture complicating ankylosing spondylitis: a report of eight cases and review of the literature. *Am J Med* 1981;70:1033-1041.
10. Apple DE, Jr., Anson C. Spinal cord injury occurring in patients with ankylosing spondylitis: a multicenter study. *Orthopedics* 1995;18:1005-1011.
11. Jackson AB, Dijkers M, Devivo MJ, Początek RB. A demographic profile of new traumatic spinal cord injuries: change and stability over 30 years. *Arch Phys Med Rehabil* 2004;85:1740-1748.
12. Geusens P, Vosse D, van der Linden S. Osteoporosis and vertebral fractures in ankylosing spondylitis. *Curr Opin Rheumatol* 2007;19:335-339.
13. Aufdermaur M. Pathogenesis of square bodies in ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 1989;48:628-631.
14. de Vlam K, Lories RJ, Luyten FP. Mechanisms of pathologic new bone formation. *Curr Rheumatol Rep* 2006;8:332-337.
15. Chavassieux P, Seeman E, Delmas PD. Insights into material and structural basis of bone fragility from diseases associated with fractures: how determinants of the biomechanical properties of bone are compromised by disease. *Endocr Rev* 2007;28:151-164.
16. Karberg K, Zochling J, Sieper J, Felsenberg D, Braun J. Bone loss is detected more frequently in patients with ankylosing spondylitis with syndesmophytes. *J Rheumatol* 2005;32:1290-1298.
17. Olerud C, Frost A, Bring J. Spinal fractures in patients with ankylosing spondylitis. *Eur Spine J* 1996;5:51-55.
18. Finkelstein JA, Chapman JR, Mirza S. Occult vertebral fractures in ankylosing spondylitis. *Spinal Cord* 1999;37:444-447.
19. Foo D, Sarkarati M, Marcelino V. Cervical spinal cord injury complicating ankylosing spondylitis. *Paraplegia* 1985;23:358-363.
20. Garza-Mercado R. Traumatic extradural hematoma of the cervical spine. *Neurosurgery* 1989;24:410-414.

DERMATOMIOSITE JUVENIL ASSOCIADA A ANASARCA: UMA POSSÍVEL NOVA VARIANTE

Carlos EP Lúcio Filho,* Lorena IM Carvalho,* Luciano L Carvalho,*
Maria do Socorro TM Almeida,* José Salomão Budaruiche*

Resumo

A Dermatomiosite juvenil é uma doença autoimune rara caracterizada por inflamação do músculo, pele e outros órgãos. Embora o edema localizado seja um aspecto comum na dermatomiosite juvenil, o edema generalizado tem sido descrito muito raramente. Neste artigo descrevemos um paciente com dermatomiosite juvenil e anasarca e apresentamos uma breve revisão da literatura.

Palavras-chave: Dermatomiosite Juvenil; Anasarca.

Abstract

Juvenile dermatomyositis is a rare autoimmune disease characterized by inflammation of the muscle, skin and other organs. Although localized edema is a common feature of juvenile dermatomyositis, generalized edema has been reported infrequently. We describe a patient with dermatomyositis and anasarca and present a brief review of the literature.

Keywords: Juvenile Dermatomyositis; Anasarca.

Introdução

A Dermatomiosite Juvenil (DMJ) é uma rara patologia do tecido conjuntivo incluída no grupo das miopatias inflamatórias idiopáticas. A sua incidência anual varia de 2,5 a 4,1 por milhão de crianças de 2 a 17 anos, com relação sexo feminino/masculino de 2,3:1.¹

A DMJ caracteriza-se por acometimento multisistêmico, com evidência histológica de infiltrado

perivascular por macrófagos e linfócitos. Afeta primariamente a pele e o tecido muscular, mas pode também acometer o coração, pulmões e o trato gastrointestinal.² Suas manifestações cutâneas são consideradas patognomônicas, a exemplo do sinal de Gottron e o *rash* heliotropo.^{3,4}

Os critérios propostos por Bohan e Peter⁴ fundamentam o diagnóstico, e consistem em quadro cutâneo característico associado à presença de pelo menos três dos seguintes itens: 1) paresia muscular simétrica e proximal, 2) aumento sérico das enzimas musculares, 3) eletroneuromiografia com alterações compatíveis e 4) biópsia muscular com evidência de necrose e inflamação.

A associação entre DMJ e anasarca é extremamente incomum, constando apenas 20 casos relatados na literatura em língua inglesa até o presente momento.⁵⁻⁷

Caso Clínico

Paciente do sexo masculino, 16 anos, no início de Junho de 2007, apresentou quadro de fadiga, seguido de mialgia, artralgia generalizada e paresia progressiva proximal em membros superiores e inferiores. Após duas semanas, surgiram febre, prurido e *rash* cutâneo difuso. Esse quadro manteve-se por sete dias, e sua regressão coincidiu com o surgimento de edema em membros inferiores que evoluiu para anasarca em três dias. Concomitante ao edema generalizado, sobreveio dificuldade à deglutição, com engasgos e regurgitação nasal de líquidos ao alimentar-se, caracterizando uma disfagia esofageana alta. No início de Julho procurou serviço médico local (Figura 1), onde foi internado por 24 dias com hipótese diagnóstica de hipovitaminose B, e medicado com sintomáticos sem melhora.

Foi então encaminhado para o departamento de Clínica Médica do Hospital Getúlio Vargas em Teresina, Piauí, Brasil, no final do mês de Julho. À

*Serviço de Clínica Médica do Hospital Getúlio Vargas – Universidade Federal do Piauí
Teresina – Piauí – Brasil

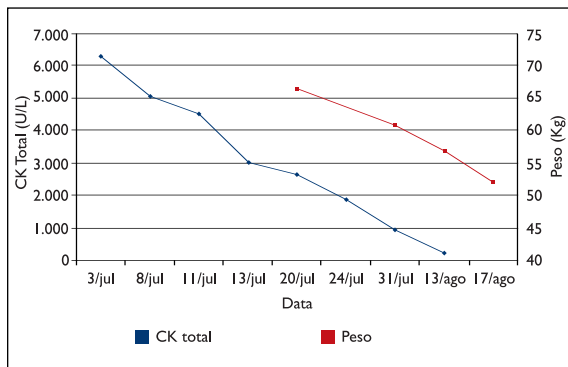


Figura 1. Relação temporal entre creatinoquinase total (CK total) e peso do paciente.

admissão relatava história de dois meses de evolução, e queixava-se principalmente de fraqueza em membros, disfagia e odinofagia. O exame físico acusou anasarca (sinal de Godet presente), paresia simétrica proximal de membros superiores e inferiores (força muscular grau 2)⁸ e reflexos normais. Durante a evolução clínica, o edema generalizado foi cedendo gradualmente, passando a se localizar em regiões periorbital e labial (Figura 2).

Uma semana após a admissão neste serviço, foram visualizadas pápulas de Gottron, inicialmente

te nas mãos (articulações metacarpofalangeanas, interfalangeanas proximais e distais) e, no dia seguinte, na superfície extensora de cotovelos. *Rash* heliotropo (Figura 3) e hemorragia periungueal em ambas as mãos foram constatados sete dias após o aparecimento das pápulas de Gottron.

Os exames laboratoriais da primeira internação apresentaram hemograma, uréia e creatinina sem alterações; aspartato aminotransferase (AST): 1.034U/mL (4-36U/mL), alanina aminotransferase (ALT): 286U/mL (4-32U/mL), desidrogenase láctica (LDH): 1.056U/L (150-360U/L), albumina sérica: 2,23g/dL (3,5-5,5g/dL). Bilirrubina total e frações eram normais. A creatinoquinase (CK) total entre o início e o fim desta primeira internação variou de 6.291U/L a 1.870U/L (até 170U/L) – Figura 1. O exame sumário de urina não mostrou anormalidades. Eletrocardiograma constatou bloqueio incompleto de ramo direito e ecocardiograma evidenciou prolapso de valva mitral.

Em nosso serviço foram solicitados novos exames complementares. Hemograma, sumário de urina e função renal continuavam sem alterações. A CK total continuava bastante elevada, porém em níveis menores que o da internação anterior (Figura 1). A função tireoideana era normal e sorologias para CMV, HIV e hepatites B e C foram negativas. A



Figura 2. Edema de face antes (A) e sete dias depois (B) do tratamento com corticosteróides.

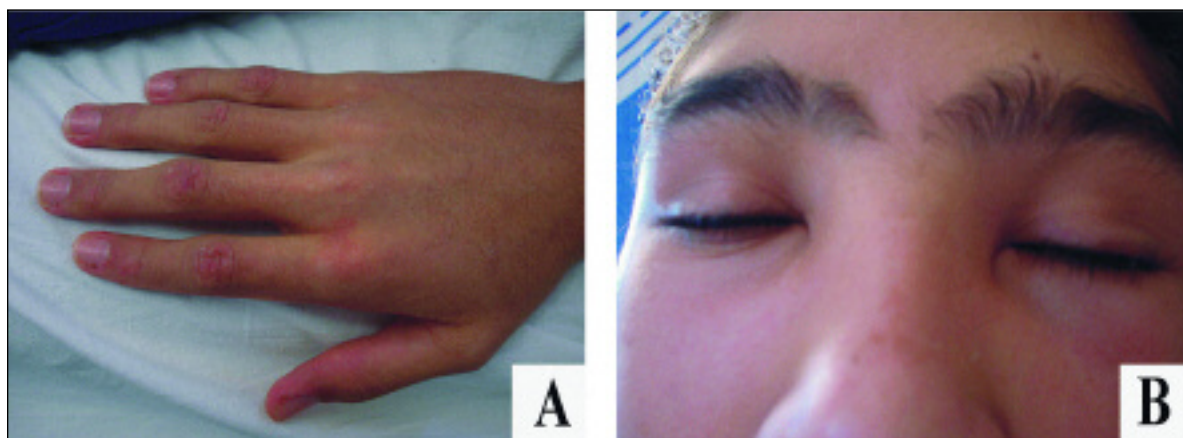


Figura 3. Pápulas de Gottron (A) e *Rash* heliotropo (B).

albumina sérica foi de 3g/dl. Velocidade de hemossedimentação resultou 40 mm na 1ª hora. O FAN teve titulação 1/160 (células Hep2) com padrão pontilhado. Anti-DNA nativo, anti-Sm, anti-RNP, anti-Ro, anti-La e anti-ENA foram não reagentes. Radiografia de tórax era normal. Endoscopia digestiva alta (EDA) evidenciou candidíase esofágica. A eletroneuromiografia revelou potenciais polifásicos pequenos de baixa amplitude e curta duração com velocidade de neurocondução normal. A biópsia do músculo deltóide evidenciou necrose à análise histopatológica.

Diante disso, iniciou-se prednisona oral a 1mg/kg/dia em 10 de Agosto. A candidíase esofágica foi tratada com fluconazol 150mg/dia por 10 dias. Observou-se melhora clínica progressiva do paciente. A avaliação da motricidade após sete dias de tratamento com corticosteróide mostrou força muscular grau 3. Além disso, a odinofagia cedeu após terapêutica anti-fúngica. Os únicos parâmetros que se mantiveram inalterados foram a disfagia esofageana alta e o *rash* cutâneo.

Recebeu alta hospitalar após 19 dias de internação, sendo prescrito metotrexate (10mg/semana) e prednisona (60mg/dia), programando-se redução gradual da dose de corticóide até 20mg/dia.

Discussão

O paciente preencheu os critérios diagnósticos para DMJ,⁴ pois apresentou manifestações cutâneas típicas (pápulas de Gottron, *rash* heliotrópi-

co), paresia simétrica e proximal dos membros, elevação dos níveis de creatinoquinase e eletroneuromiografia compatível com miopatia inflamatória, apesar de a biópsia do músculo deltóide não ter revelado achados específicos da doença.

A grande maioria dos pacientes com anasarca sofre de doenças cardíacas, renais, hepáticas ou nutricionais avançadas. Apesar de o edema localizado ser uma apresentação comum na DMJ, a associação desta com edema generalizado é rara, com poucos relatos publicados na literatura. A exclusão das patologias que poderiam cursar com anasarca indica, neste caso singular, uma correlação intrínseca com a DMJ.⁵⁻⁷ Apesar da predominância do sexo feminino entre os pacientes com miopatia inflamatória,¹ a maior parte daqueles com edema são homens em acordo com o presente caso.^{9,10}

O mecanismo proposto para a ocorrência de edema subcutâneo generalizado associado a miopatia inflamatória idiopática ainda não está claro. Sugere-se o envolvimento de vasculopatia do tecido subcutâneo e muscular subjacente devido ao depósito de imunocomplexos e à ativação do complemento, acarretando em aumento da permeabilidade vascular e conseqüente hipoproteïnemia.^{5-7,9-11}

Em nosso caso, o paciente iniciou o quadro com sintomas gerais (artralgia, mialgias), evoluindo posteriormente com quadro de febre e exantema difuso associado a prurido, culminando com o início do edema. O quadro de febre associado ao exantema difuso ocorre principalmente em casos de iní-

cio agudo associado a debilidade muscular rapidamente progressiva na DMJ.¹²

A anasarca precedeu as manifestações cutâneas específicas (pápulas de Gottron e *rash* heliotropo) em mais de trinta dias e coincidiu com o pico de creatinoquinase total (6291 UI/mL). Essa apresentação precoce do edema no curso clínico da doença foi também observado em outros casos.^{9,10} Conforme observado na Figura 1 o edema foi cedendo de forma gradual com o declínio dos níveis das enzimas musculares (marcadores da inflamação tecidual muscular) e posterior elevação dos níveis de albumina sérica, o que corrobora a teoria acima descrita. A presença de hipoalbuminemia foi observada em três casos relatados na literatura, um dos quais com níveis séricos de albumina inferiores a 2,5g/dL.^{5,7,10}

A literatura mostra que esta variante de DMJ associada a anasarca está relacionada a um quadro clínico mais severo, com envolvimento da musculatura do terço proximal do esôfago e pobre resposta aos corticosteróides orais. Esta manifestação é

verificada em indivíduos com atividade acentuada da doença, e subsequente evolução para o óbito em alguns deles (Quadro I). De fato, o surgimento de disfagia esofageana alta em nosso paciente coincidiu com a progressão para anasarca, marco maior de atividade da doença. Ainda assim, houve resposta positiva à terapia com corticosteróide (60mg/dia). Isso foi comprovado pela melhora do edema facial e da força muscular, cuja avaliação inicial na segunda internação mostrava apenas tônus presente nos membros sem vencer a força da gravidade (grau 2), enquanto na alta hospitalar se observava força muscular ativa contra a gravidade, mas sem vencer a resistência do examinador (grau 3).⁸ Todavia, a disfagia esofageana alta, marcada por dificuldade na deglutição, engasgos e regurgitação nasal de líquidos, permaneceu.

A associação de metotrexate mostrou ser benéfica em pacientes com miopatia inflamatória resistente a corticóides e ainda possibilita a redução da dose de prednisona.¹³ Dessa forma, a associação terapêutica com metotrexate foi necessária em

Quadro I. Aspectos Clínicos de 21 Pacientes com DMJ Associada a Anasarca (Adaptada de Mitchell et al)

Referência	Idade (anos)/ Gênero	Paresia severa	Mialgia	Disfonia	Disfagia	Calcinose	Úlceras cutâneas ou gastrointestinais	Resposta a corticosteróides
Este caso	16 / M	+	+	—	+	NA	—	+
2*	17/M	+, CL	+	+	+	—	+	NA
3	3,6/M	+, função NA	+	+	+	—	+	— (Corticotropina, testosterona)
4‡	Média: 7,5 (2,3-10,6)/ 5M, 4F	+9/9, função	+8/9	NA	+5/9	+4/9	+1/9; NA 8/9	+1/4; NA 5/8 (Corticotropina, cortisona)
5	2,2/1M, 1F	+2/2, 2/2CL	1+, 1NA	NA	NA	+2/2	0/2	NA
6	3,5/F	+, CL	+	NA	NA	—	—	NA
7	6/F	+, CL	+	NA	NA	—	+	NA
8	10/F	+, CL	+	NA	+	+	+	NA
9	7,1/F	+, CL	+	+	+	NA	+	NA
10	7/F	+, CL/CR	+	+	+	—	+	—
11	14/M	+	+	NA	—	—	—	+
12	8/F	+, CL	+	NA	+	—	+	— /×
Total: 21 casos	10M, 11F	21/21‡	19/21‡	4/4‡	12/16‡	7/14‡	8/13‡	3/9‡

LEGENDA: Casos 2-10: Descritos em Mitchell et al; Caso 11: Karabiber et al; Caso 12: Mehndiratta et al.

(+) Presente; (—) Ausente; (NA) Não avaliado; (×) Óbito; CL: Confinado ao leito; CR: Cadeira de rodas; M: Masculino; F: Feminino

‡ Casos positivos / casos avaliados

* Este caso de DMJ era associado a tumor mediastinal

‡ Nessa série, 9 de 26 casos tinham anasarca associada

nosso paciente, devido à permanência de disfagia esofageana alta mesmo após a corticoterapia em altas doses.

Nosso paciente teve também infecção oportunista associada, representada pela esofagite por *Candida sp.*, o que mostra deficiência em sua imunidade, apesar de contagem da série branca estar dentro da normalidade. Foi tratado com fluconazol com boa resposta clínica, detectada pela resolução da odinofagia. Em estudo prospectivo com 156 pacientes com diagnóstico de dermatomiosite ou polimiosite, 11% tiveram infecção oportunista associada, sendo que 3 (1,9%) tiveram acometimento esofageano por *Candida albicans*.¹⁴ Este achado não foi registrado em nenhum dos casos de dermatomiosite associados a anasarca que constam na literatura.^{5-7,9-11}

O edema generalizado é uma rara apresentação clínica da DMJ. O reconhecimento precoce desta associação aliada a indicadores clínicos de doença severa (como acometimento esofageano) é de suma importância, uma vez que identifica pacientes menos propensos à resposta satisfatória à terapia isolada com corticosteróides. Ainda não está claro se essa variante guarda evolução e prognóstico similares a outros casos de DMJ, sendo necessários novos relatos para estabelecer condutas mais precisas.

Correspondência para:

Carlos Eduardo Pinheiro Lúcio Filho
Avenida Marechal Castelo Branco, 670, Apt. 1500, Bairro Ilhotas, CEP: 64001-810
Teresina – Piauí - Brasil
E-mail: kadu_filho@hotmail.com

Referências:

1. Mendez EP, Lipton R, Ramsay-Goldman R et al. US incidence of juvenile dermatomyositis, 1995-1998: results from the National Institute of Arthritis and Musculoskeletal and Skin Diseases Registry. *Arthritis Rheum* 2003;49:300-305.
2. Chiu SK, Yang YH, Wang LC, Chiang BL. Ten-year experience of juvenile dermatomyositis: a retrospective study. *J Microbiol Immunol Infect* 2007;40:68-73.
3. Koler RA, Montemarano A. Dermatomyositis. *American Family Physician* 2001;64: 1565-1572.
4. Bohan A, Peter JB. Polymyositis and dermatomyositis. *N Engl J Med* 1975;292:403-407.
5. Mitchell JP, Dennis GJ, Rider LG. Juvenile dermatomyositis presenting with anasarca: A possible indicator of severe disease activity. *The Journal of Pediatrics* 2001;138:942-945.
6. Karabiber H, Aslan M, Alkan A, Yakinci C. A rare complication of generalized edema in juvenile dermatomyositis: a report of one case. *Brain & Dev* 2004;26: 269-272.
7. Mehndiratta S, Banerjee P. Juvenile Dermatomyositis presenting with Anasarca. *Indian Pediatrics* 2004;41:752-753.
8. Campbell, WW. DeJong - O Exame Neurológico. 6 ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 2007, p 289.
9. Werner de Castro GR, Appenzeler S, Bértolo MB, Costallat LTL. Acute dermatomyositis with subcutaneous generalized edema. *Clin Rheumatol* 2006;25: 898-900.
10. Yoshinaga I, Kawabata D, Yukawa N et al. Severe subcutaneous generalized edema in a patient with dermatomyositis. *Mod Rheumatol* 2007;17:171-173.
11. Gorelik O, Almozno-Sarafin D, Alon I et al. Acute inflammatory myopathy with severe subcutaneous edema, a new variant? Report of two cases and review of the literature. *Rheumatol Int* 2001;20:163-166.
12. Cassidy JT, Petty RE. Juvenile Dermatomyositis. *Textbook of Pediatric Rheumatology*, New York; Churchill Livingstone, 1990:331-375.
13. Choy EHS, Isenberg DA. Treatment of dermatomyositis and polymyositis. *Rheumatology* 2002;41:7-13.
14. Marie I, Hachulla E, Chérin P et al. Opportunistic Infections in Polymyositis and Dermatomyositis. *Arthritis & Rheumatism (Arthritis Care & Research)* 2005;53:155-165.

ARTROPATIA NEUROPÁTICA DOS OMBROS E SIRINGOMIELIA

J. Garcia,* M. J. Saavedra,* P. Monteiro,* J. Silva, A. Malcata*

Mulher de 62 anos, internada por astenia e limitação da mobilidade dos ombros e cotovelos, com agravamento ao longo de vários anos, condicionando grande compromisso das actividades de vida diárias. Referia ainda, desde há 10 anos, artralhas de ritmo mecânico localizadas aos ombros e cotovelos, com diminuição progressiva de intensidade e frequência, sem episódios de tumefacção articular nem rigidez matinal prolongada. Nos antecedentes pessoais destacava-se laminectomia cervical com drenagem de cavitação siringomiélica cervico-dorsal há 15 anos. Ao exame objectivo apresentava acentuada cifoescoliose estrutural, diminuição da expansibilidade torácica e limitação global da mobilidade dos ombros. O exame neurológico evidenciava tetraparésia flácida de predomínio braquial. O estudo analítico não apresentou alterações. Radiologicamente apresentava marcada cifoescoliose dorsal, destruição e fragmentação das cavidades glenóides das omoplatas e cabeças umerais, esclerose subcondral e sub-luxação das articulações gleno-umerais (Figuras 1 e 2).

Foi estabelecido o diagnóstico de Artropatia Neuropática.

A Artropatia Neuropática (Charcot) é uma doença destrutiva crónica e progressiva, associada a perda de sensibilidade articular profunda. As causas mais frequentes são: diabetes mellitus, traumatismos, siringomielia, mielomeningocelo, espinha bífida, *tabes dorsalis* e esclerose múltipla. A fisiopatologia, ainda que não totalmente estabelecida, compreende a perda de sensibilidade proprioceptiva com posterior destruição e desorganização articulares, resultantes de traumatismos repetitivos. Inicialmente pode manifestar-se por artralhas e pela presença de sinais inflamatórios articulares, predominando a impotência funcional, com regressão das queixas algicas, nas fases mais evoluídas da doença. A radiografia simples, ainda que



Figura 1 e 2. Fragmentação e destruição das cavidades glenóides e cabeça umerais, esclerose sub-condral, sub-luxação articular.

*Serviço de Reumatologia dos Hospitais da Universidade de Coimbra

possa ser normal nos estádios mais precoces, pode revelar destruição com fragmentação das superfícies articulares, esclerose sub-condral, corpos livres intra-articulares ou subluxação articular. O restante estudo complementar depende da doença de base. O tratamento médico compreende a analgesia e a terapêutica fisiátrica, podendo haver necessidade de recurso à cirurgia nas situações refratárias.

Correspondência para:

Jorge Garcia
Serviço de Reumatologia
Hospitais da Universidade de Coimbra
Praceta Mota Pinto – 3000-075 Coimbra
E-mail: jorgecantantegarcia@gmail.com

XVI Jornadas Internacionais do Instituto Português de Reumatologia

**Centro de Congressos de Lisboa
11-12 de Dezembro de 2008**

■ **XV Congresso de la Liga Panamericana de Asociaciones de Reumatologia**

Local e Data: PANLAR, Guatemala, 13-16 de Agosto de 2008

■ **12th World Congress on Pain**

Local e Data: Escócia, Glasgow, 17-22 de Agosto de 2008

■ **6th International Congress on Autoimmunity**

Local e Data: Portugal, Porto, 10-14 de Setembro 2008

■ **ASBMR 30th Annual Meeting**

Local e Data: Canadá, Montreal, 12-16 de Setembro de 2008

■ **15th PRES**

Local e Data: Reino Unido, Londres, 14-17 de Setembro de 2008

■ **2008 World Congress on Osteoarthritis**

Local e Data: Itália, Roma, 18-21 de Setembro de 2008

■ **10º Curso EULAR Pós-Graduado**

Local e Data: Krefeld, Alemanha, 29 de Setembro a 3 de Outubro de 2008

■ **2nd Mediterranean Clinical Immunology Meeting**

Local e Data: Turquia, Antalya, 4-7 de Outubro de 2008

Data limite para envio de resumos: 1 de Julho de 2008

■ **ACR/ARHP Annual Scientific Meeting**

Local e Data: EUA, San Francisco, 24-29 de Outubro de 2008

■ **IOF World Congress on Osteoporosis**

Local e Data: Tailândia, Bangucoque, 3-7 de Dezembro de 2008

■ **XVI Jornadas Internacionais do Instituto Português de Reumatologia**

Local e Data: Centro de Congressos de Lisboa, 11-12 de Dezembro de 2008

A Acta Reumatológica Portuguesa publica artigos originais sobre todos os temas da Reumatologia ou com ela relacionados. São também publicados artigos de revisão, casos clínicos, cartas ao editor e outros que se incluam na estrutura editorial da revista (notícias de reuniões de sociedades científicas, por ex.).

A Acta Reumatológica Portuguesa subscreve os requisitos para apresentação de artigos a revistas biomédicas elaboradas pela Comissão Internacional de Editores de Revistas Médicas (*Internacional Committee of Medical Journal Editors*), publicada na íntegra inicialmente em *N Engl J Med* 1991; 324: 424-28 e actualizada em Fevereiro de 2006 e disponível em www.ICMJE.org. A política editorial da Acta Reumatológica Portuguesa segue as Recomendações de Política Editorial (*Editorial Policy Statements*) emitidos pelo Conselho de Editores Científicos (*Council of Science Editors*), disponíveis em www.councilscienceeditors.org/services/draft_approved.cfm.

Os artigos podem ser redigidos em português ou inglês. As opiniões expressas são da exclusiva responsabilidade dos autores.

Os autores devem declarar potenciais conflitos de interesse financeiro.

Os artigos publicados ficarão propriedade da revista, não podendo ser reproduzidos, no todo ou em parte, sem autorização dos editores.

A aceitação dos originais enviados para publicação é sempre condicionada a avaliação pelos consultores editoriais. Nesta avaliação os artigos poderão ser:

- a) aceites sem alterações;
- b) aceites após modificações propostas pelos consultores;
- c) recusados.

Em todos os casos os pareceres dos consultores serão integralmente comunicados aos autores.

Quando são propostas alterações, o autor deverá endereçar uma carta ao editor e a cada um dos revisores respondendo a todas as questões colocadas. Deverá ainda enviar uma versão revista do artigo com as alterações inseridas destacadas com cor diferente.

Instruções aos Autores

Todos os manuscritos que não estejam em conformidade com as instruções que se seguem podem ser enviados para modificações antes de serem revistos pelos consultores.

Todos os trabalhos devem ser enviados por e-mail para arp@spreumatologia.pt. Poderá ser também enviada cópia impressa para:

Editor
Acta Reumatológica Portuguesa

(para o biénio 2007-2008):

para a morada permanente:

R. D. Estefânia, 177 -1º D. – 1000-154 Lisboa

ou para:

Serviço de Reumatologia
Hospital Garcia de Orta
Av. Prof. Torrado da Silva
2801-951 Almada
E-mail: arp@spreumatologia.pt

Os manuscritos devem ser acompanhados de declaração de originalidade e de cedência dos direitos de propriedade do artigo, assinada por todos os autores, conforme minuta publicada em anexo.

O texto deve ser enviado em formato digital (e-mail ou CD), a dois espaços, com tipo 12 e com margens não inferiores a 2,5 cm, em Word for Windows. Todas as páginas devem ser numeradas.

As imagens devem ser fornecidas independentemente do texto em formato JPEG ou TIFF; em alternativa, poderão ser enviados os originais em papel ou *slide*.

Os textos devem ser organizados da seguinte forma:

Página 1

Título; nome dos autores; categoria profissional; serviços ou organismos onde os autores exerçam a sua actividade e onde o trabalho foi executado; subsídios ou bolsas que contribuíram para a realização do trabalho; morada e contactos do autor responsável pela correspondência e contactos com os editores; título breve para rodapé.

Página 2

- a) Título (sem autores)
- b) Resumo

Resumo em português e inglês, que para os artigos originais deve ser estruturado da seguinte forma: Objectivos, Material e Métodos, Resultados, Conclusões. O resumo dos artigos originais não deve exceder as 250 palavras e o dos casos clínicos as 150 palavras.

- c) Palavras-chave

Um máximo de 5 palavras-chave que devem ser apresentadas imediatamente após o resumo.

Página 3 e seguintes

O texto dos artigos originais deve ser apresentado com os seguintes subtítulos: Introdução, Objectivos, Material e Métodos, Resultados, Discussão, Conclusões, Agradecimentos, Bibliografia.

Em se tratando de casos clínicos, os subtítulos serão: Introdução, Caso clínico, Discussão, Bibliografia.

A partir da segunda página, inclusive, todas as páginas devem ter em rodapé o título breve indicado na página título.

O manuscrito não deve ultrapassar as 20 páginas para os artigos originais e revisões e as 6 páginas para os casos clínicos.

Referências: As referências devem ser classificadas e numeradas por ordem de entrada no texto. As abreviatu-

ras usadas na nomeação das revistas devem ser as utilizadas pelo *Index Medicus*.

Nas referências com 6 ou menos autores todos devem ser nomeados. Nas referências com 7 ou mais autores devem ser nomeados os 3 primeiros seguidos de *et al*.

Seguem-se alguns exemplos de como devem constar os vários tipos de referências:

– *Revista*

Nome(s) e iniciais do(s) autor(es). Título do artigo. Nome da revista Ano; Volume: Páginas.

Ex.: Hill J, Bird HA, Hopkins R, Lawton C, Wright V. Survey of satisfaction with care in a rheumatology outpatient clinic. *Ann Rheum Dis* 1992; 51:195-197.

– *Capítulo de livro*

Nome(s) e iniciais do(s) autor(es) do capítulo. Título do capítulo. In: Nome(s) e iniciais do(s) editor(es) médico(s). Título do livro. Cidade: Nome da casa editora, ano de publicação: primeira e última página do capítulo.

Ex.: Stewart AE. Hypercalcemia resulting from medications. In: Favus MJ, ed. *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorder of Mineral Metabolism*. New York: Raven Press, 1993: 177-178.

– *Livro*

Nome(s) e iniciais do(s) autor(es). Título do livro. Cidade: Nome da casa editora, ano de publicação: página(s).

Ex.: Lorig K. *Patient Education. A practical approach*. St. Louis: Mosby-Year Book;1992: 51.

As referências a trabalhos ainda não publicados, comunicações em reuniões, não publicadas em livros de resumos, ou comunicações pessoais devem ser citadas no texto e não como referências formais.

A exactidão e o rigor das referências são da responsabilidade do autor.

Quadros: Os quadros a inserir devem ser assinalados no texto em numeração romana. Cada quadro deverá ser apresentado em folha separada, dactilografado a 2 espaços. Na parte superior devem apresentar um título sucinto mas informativo, de modo a poder ser compreendido sem recurso ao texto. Na parte inferior do quadro deve constar a explicação das abreviaturas utilizadas. Nos quadros devem ser evitados os traços verticais e os traços horizontais devem servir apenas como separadores de títulos e subtítulos.

Figuras: As figuras a inserir devem ser assinaladas no texto em numeração árabe. As legendas das figuras devem ser dactilografadas a dois espaços numa folha separada, depois da bibliografia. As figuras devem ser enviadas em suporte informático com ficheiros separados para cada figura, em formato JPEG ou TIFF; em alternativa, devem ser enviados três originais das figuras, que deverão apresentar uma boa qualidade de desenho ou serem feitas em impressora de alta resolução. As fotografias devem ser em papel brilhante, bem contrastado, com as dimensões 10°x15 cm. Todas as figuras devem apresentar no verso uma etiqueta autocolante com o número da figura, o nome do 1º autor, o título breve do artigo e a indicação da parte superior da figura.

Modificações e revisões: No caso da aceitação do ar-

tigo ser condicionada a modificações, estas deverão ser feitas pelos autores no prazo de quinze dias.

As provas tipográficas serão, sempre que possível, enviadas aos autores contendo a indicação do prazo para revisão consoante as necessidades editoriais da revista.

Editoriais: A maioria dos editoriais será solicitada pelo Editor. Os editoriais serão comentários sobre tópicos actuais ou sobre artigos publicados na revista. O texto dos editoriais não deve exceder as 1.200 palavras, um máximo de 15 referências e não deve conter quadros ou figuras.

Artigos de revisão: Estes artigos serão habitualmente encomendados pelo Editor. No entanto, os autores interessados em apresentar um artigo de revisão podem contactar com o Editor para discussão dos tópicos a apresentar.

Cartas ao Editor: As cartas ao editor devem constituir um comentário crítico a um artigo da revista ou uma pequena nota sobre um tema ou caso clínico. Não devem exceder as 600 palavras, uma figura ou quadro, e um máximo de 10 referências bibliográficas.

Separatas: Caso desejem separatas (até ao nº de 10) o 1º autor pode solicitá-las. Um maior número ficará a expensas do autor, aquando da revisão tipográfica.

Minuta da carta a enviar ao Editor

Enviar este documento com o manuscrito para:

Editor

Acta Reumatológica Portuguesa

O(s) autor(es) certifica(m) que o manuscrito intitulado: _____

é original, que todas as afirmações apresentadas como factos são baseados na investigação do(s) autor(es), que o manuscrito, quer em parte quer no todo, não infringe nenhum *copyright* e não viola nenhum direito da privacidade, que não foi publicado em parte ou no todo e que não foi submetido para publicação, no todo ou em parte, noutra revista, e que os autores têm o direito ao *copyright*.

Todos os autores declaram ainda que participaram no trabalho, se responsabilizam por ele e que não existe, da parte de qualquer dos autores conflito de interesses nas afirmações proferidas no trabalho.

Os autores, ao submeterem o trabalho para publicação, transferem para a Acta Reumatológica Portuguesa todos os direitos a interesses do *copyright* do artigo.

Todos os autores devem assinar

Data: _____

Nome (maiúsculas): _____

Assinatura: _____

Acta Reumatológica Portuguesa publishes original articles, reviews and case reports on all subjects related to Rheumatology.

Acta Reumatológica Portuguesa subscribes the requirements for the acceptance of manuscripts in biomedical journals proposed by the International Committee of Medical Journal Editors, published initially in *N Engl J Med* 1991; 324: 424-28, updated in February 2006 and available in www.ICMJE.org. The editorial policy of Acta Reumatológica Portuguesa follows the Editorial Policy Statements published by the Council of Science Editors, available in www.councilscienceeditors.org/services/draft_approved.cfm.

The articles can be written in Portuguese or in English.

Written opinions are of the exclusive responsibility of the author. Published articles will remain property of the journal and cannot be reproduced, as a whole or as a part, without the authorization of the editor.

Authors have to disclose financial conflicts of interest.

The acceptance of articles is subjected to the evaluation of the editorial board. Articles may be:

- a) accepted without changes;
- b) accepted after modifications suggested by the board;
- c) refused.

All the comments made by the reviewers will be sent to the author.

When changes are proposed, the author should send reply letters to the editor and to each of the reviewers answering to all the questions raised. The author should also send a reviewed version of the manuscript with the changes highlighted in a different colour.

Instructions to authors

Manuscripts not in accordance with the instructions may be sent for modification before review by the editorial board.

All manuscripts must be sent by e-mail to arp@spreumatologia.pt. In addition they can also be sent to:

Editor
Acta Reumatológica Portuguesa

(for 2007-2008):

to the permanent address:

R. D. Estefânia, 177 - 1º D
1000-154 Lisboa - Portugal

or to:

Serviço de Reumatologia
Hospital Garcia de Orta
Av. Prof. Torrado da Silva
2801-951 Almada
E-mail: arp@spreumatologia.pt

Manuscripts must be accompanied by a submittal letter, signed by all authors, stating the name of the article, that it is an original work, that the authors held the copyright of the manuscript, that it does not represent any conflict of interest, and that they transfer the copyright to the journal (see form below).

Text should be sent in digital support (e-mail or CD), typed double-spaced, type 12, with 1-inch margins, in Word for Windows. All pages must be sequentially numbered.

Images should be sent independently from the text in JPEG or TIFF file. Alternatively, they can be sent as printed proof or slide.

Manuscripts should be organized as explained below:

Page 1

Title; authors's names and degrees; institutions represented; source of grants support; address and telephone number of the author responsible for communications with the editor and reprints; sort title for footnote.

Page 2

- a) Title (without authors)
- b) Abstract

Abstract in portuguese and in english structured as follows for the original articles: Objectives; Material and Methods; Results; Conclusions. The abstract should not exceed 250 words for original articles and 150 words for case reports.

- c) Keywords

A maximum of 5 keywords should be presented after the abstract.

Page 3 and following pages

The text of original papers should be presented with the following subtitles: Introduction, Objectives, Material and Methods, Results, Conclusions, Acknowledgements, References. Subtitles for case reports should be: Introduction, Case report, Discussion, References.

From the second page on, all pages should have a short title on footnote.

Manuscripts should not exceed 20 pages for original articles and reviews and 6 pages for case reports.

References: References should be cited by the numerical system and listed, in the order cited in the text. Journal titles are abbreviated in accordance with the style of Index Medicus.

List all authors when 6 or less; when 7 or more list only first 3 and add *et al.*

References of unpublished work, presentations or personal observations should be inserted in the text (in parenthesis).

Authors are responsible for the accuracy of the references.

Examples:

– *Journal article*

Name(s) and initials of author(s). Article title. Journal

name Year; Volume or number: Page(s).

Ex: Hill J, Bird HA, Hopkins R, Lawton C, Wright V. Survey of satisfaction with care in a rheumatology outpatient clinic: *Ann Rheum Dis* 1992; 51: 195-197.

– *Chapter in Book*

Name(s) and initials of author(s) of chapter. Chapter title. In: Name(s) and initials of editor(s). Book title. City: Name of publisher, year of publication: pages.

Ex: Stewart AE. Hypercalcemia resulting from medications. In: Favus MD, ed. *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. New York: Raven Press, 1991: 177-178.

– *Book*

Name(s) and initials of author(s). Book title. City: Name of publisher, year of publication: page(s).

Ex: Lorig K. *Patient Education. A practical approach*. St Louis: Mosby-Year Book, 1992: 51.

Tables: Tables should be cited in the text with Roman numerals. Each table should be double typed on a separate sheet, have a title and contain no vertical rulers. Horizontal lines should be used only as separators between titles and subtitles. Explain all abbreviations at the bottom.

Figures: Cite each figure in the text in consecutive order using Arabic numerals. Legends should be listed on a separate sheet, double typed. Send the figures in separate files to each figure in the format JPEG or TIFF; in alternative three copies of each figure should be send. Figures should be professional drawn and photographed. Photographs should be 10x15 cm and on the back should be labelled with the number, article title, first author name, and have top indicated.

Modifications and proofreading: Articles accepted subject to modifications, will be sent to authors that will have 15 days to modify them according to suggestions. Contributors will receive page proofs and are asked to proofread them for printers' errors.

Editorials: Editorials will be requested by the editor and will be comments on important issues or on articles published in the journal. Editorials should not exceed 1200 words, with a maximum of 15 references and no tables or figures.

Review articles: Review articles will be commissioned by the editor. However, authors interested in presenting a review article are welcomed to contact the editor.

Letters: Letters to the editor must be a comment on a journal article or a short clinical study or case report. It cannot exceed 600 words, a maximum of 10 references and a table or figure.

Offprints: Authors will be sent, by their request, 10 copies of the Journal issue. Offprints may be charged to the authors upon request during the proofreading.

Letter draft:

Send with manuscript to The Editor:

The authors certify that the manuscript entitled _____ is original, all data are based on their own research and that the manuscript does not violate copyright or privacy regulations. They further state that the manuscript hasn't been partly or totally published or submitted to publication elsewhere.

The authors declare that they hold total copyright for this paper and that they assume collective responsibility for it's contents and also that any conflict of interest is acknowledged.

And submitting this paper, the authors transfer copyrights interests to Acta Reumatológica Portuguesa.

All authors must sign.

Name (capitals): _____

Date: _____

Signature: _____