



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

Prevalência e importância clínica dos anticorpos
anti-P ribossomal e da proteína S100 β no lúpus
eritematoso sistêmico juvenil

Henrique Aldar

Campinas, 2011



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

Prevalência e importância clínica dos anticorpos
anti-P ribossomal e da proteína S100 β no lúpus
eritematoso sistêmico juvenil

Henrique Aldar

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Clínica Médica, da
Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas, para
obtenção do Título de Mestre.

Linha de pesquisa: Doenças dos sistemas
imune e hematológico.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Simone
Appenzeller

Campinas, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROSANA EVANGELISTA PODEROSO – CRB8/6652
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

AI21p Aldar, Henrique, 1986 -
Prevalência e importância clínica dos anticorpos anti-P ribossomal e da proteína S100 β no lúpus eritematoso sistêmico juvenil. / Henrique Aldar. – Campinas, SP : [s.n.], 2011.

Orientador : Simone Appenzeller
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Ansiedade. 2. Manifestações cognitivas. 3. Lúpus eritematoso sistêmico neuropsiquiátrico. I. Appenzeller, Simone. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Prevalence and clinical significance of antiribosomal P antibody and S100 β protein in childhood-onset systemic lupus erythematosus

Palavra-chave em inglês:

Anxiety

Cognitive manifestations

Neuropsychiatric systemic lupus erythematosus

Área de Concentração: Ciências Básicas

Titulação: Mestre em Clínica Médica

Banca examinadora:

Simone Appenzeller [Orientador]

Ibsen Bellini Coimbra

Jozélio Freire de Carvalho

Data da defesa: 12-12-2011

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Henrique Aldar

Orientador: Profa. Dra. Simone Appenzeller

Membros:

1. Prof. Dr. Jozélio Freire de Carvalho

Jozélio Freire de Carvalho

2. Prof. Dr. Ibsen Bellini Coimbra

Ibsen Bellini Coimbra

3. Profa. Dra. Simone Appenzeller

Simone Appenzeller

Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 12/12/2011

“É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar. É melhor tentar, ainda que em vão, que sentar-se fazendo nada até o final. Eu prefiro na chuva caminhar que em dias tristes em casa me esconder. Prefiro ser feliz embora louco, que em conformidade viver”.

(Martin Luther King)

Agradecimentos

Agradeço à minha família, pelo amor ilimitado e apoio incondicional nesta e em todas as etapas da minha vida.

À minha namorada pela paciência, compreensão e carinho ao longo destes últimos dois anos.

À Prof^a. Dr^a. Simone Appenzeller pela orientação neste mestrado, sempre dedicada e se desdobrando para extrair o máximo de nós alunos.

Aos novos amigos, que enriqueceram a experiência “extracurricular” em Campinas.

Aos alunos e funcionários companheiros de laboratório e ambulatório, cúmplices do dia a dia, que têm papel fundamental na conclusão deste trabalho.

Aos pacientes, seus familiares e indivíduos saudáveis que aceitaram participar desta pesquisa.

Abreviaturas

LESJ – Lúpus Eritematoso Sistêmico Juvenil

Anti-P – Anticorpos Anti-P Ribossomal

NSPA - Antígenos P da superfície neuronal

S100 β – Proteína S100 β

SLE – Systemic Lupus Erythematosus

SLEDAI - Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index

SDI - Lupus International Collaborating Clinics / American College of Rheumatology
Damage Index

cSLE – Childhood-onset Systemic Lupus Erythematosus

LES – Lúpus Eritematoso Sistêmico

ACR – American College of Rheumatology

ECG - Eletrocardiograma

Hb - Hemoglobina

EUA – Estados Unidos da América

SNC – Sistema Nervoso Central

OMS – Organização Mundial de Saúde

VHS – Velocidade de Hemossedimentação

PCR – Proteína C Reativa

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

FAN – Fator Antinuclear

Anti-dsDNA – Anticorpos anti DNA dupla hélice

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

ENA – Antígenos Celulares Extraíveis

Anti-Sm – Anticorpos anti-Smith

RNP - Ribonucleoproteínas

NP - Neuropsiquiátrico

SNP – Sistema Nervoso Periférico

SNA – Sistema Nervoso Autônomo

HAS – Hipertensão Arterial Sistêmica

DM – Diabetes Mellitos

NMDA – Anticorpo anti-N-metil-D-aspartato

LCR- Líquido Cefalorraquidiano

NPLES- Lupus Eritematoso Sistêmico Neuropsiquiátrico

AECA – Anticorpos anti-endoteliais

IL-6 – Interleucina 6

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral α

mRNA – Ácido Ribonucleico Mensageiro

CEP/FCM – Comitê de Ética em Pesquisa / Faculdade de Ciências Médicas

WISC-III - Wechsler Intelligence Scale for Children

WAIS-II - Wechsler Adult Intelligence Scale

BDI – Inventário de Depressão de Beck

BAI – Inventário de Ansiedade de Beck

CDI – Inventário de Depressão de Crianças

aCL – Anticorpos Anticardiolipina

LA – Anticoagulante Lúpico

ELISA – Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay

HRP – *Horseshoe* Peroxidase

TMB - Tetrametilbenzina

DO – Absorbância

DP – Desvio Padrão

IQR – Diferença Inter-quartis

Tabelas

Tabela 1. Manifestações neuropsiquiátricas no LES.	17
Tabela 2. LESJ: Dados demográficos de acordo com a presença do anticorpo anti-P ribossomal.	42
Tabela 3. LESJ: Manifestações clínicas de acordo com a presença do anticorpo anti-P ribossomal.	42
Tabela 4. LESJ: Manifestações laboratoriais de acordo com a presença do anticorpo anti-P ribossomal.	43
Tabela 5. LESJ: Manifestações neuropsiquiátricas de acordo com a presença do anticorpo anti-P ribossomal.	44
Tabela 6. LESJ: Drogas em uso de acordo com a presença do anticorpo anti-P ribossomal.	45
Tabela 7 LESJ: Níveis de proteína S100 β em relação à presença de atividade da doença e ao dano cumulativo.	47
Tabela 8. LESJ: Níveis de proteína S100 β em relação às manifestações clínicas.	47
Tabela 9. LESJ: Níveis de proteína S100 β em relação às manifestações laboratoriais.	48

Tabela 10. LESJ: Níveis de proteína S100 β em relação aos autoanticorpos._____49

Tabela 11. LESJ: Níveis de proteína S100 β em relação às manifestações neuropsiquiátricas._____50

Tabela 12. LESJ: Níveis de proteína S100 β em relação ao tratamento._____51

Sumário

Resumo	12
1. Introdução	14
1.1 Definição	14
1.2 Epidemiologia do LES	14
1.3 Critérios classificatórios do LES	15
1.4 Manifestações neuropsiquiátricas	15
1.4.1 Classificação	16
1.4.2 Prevalência	17
1.4.3 Fisiopatogenia	18
1.5 Anticorpos anti-P ribossomal	21
1.6 Proteína S100 β	27
2. Justificativa	29
3. Hipóteses	30
4. Objetivos	31
5. Materiais e Métodos	32
5.1 Delineamento de Estudo	32
5.2 Seleção de Indivíduos Participantes do Estudo	32
5.2.1 Pacientes	32
5.2.2 Familiares	32
5.2.3 Controles	33
5.3 Termo de Consentimento	33

5.4 Características Demográficas, Clínicas e Laboratoriais dos Pacientes com LESJ _____	33
5.4.1 Características Demográficas _____	33
5.4.2 Características clínicas, laboratoriais, neuropsiquiátricas, avaliação da atividade e do dano da doença e tratamento _____	34
5.4.2.1 Características clínicas _____	34
5.4.2.2 Avaliação neuropsiquiátrica _____	35
5.4.2.3 Características laboratoriais _____	36
5.4.2.4 Atividade da doença _____	37
5.4.2.5 Dano cumulativo da doença _____	37
5.4.2.6 Tratamento _____	37
5.5 Investigação Laboratorial _____	38
5.5.1 Técnica de ELISA _____	38
5.5.1.1 Lavagem e incubação _____	38
5.5.1.2 Controle de qualidade _____	39
5.6 Análise estatística _____	40
6. Resultados _____	41
6.1 Capítulo 1: Prevalência e importância clínica dos anticorpos anti-P ribossomal no LESJ. _____	41
6.1.1 Dados demográficos _____	41
6.1.2 Características clínicas, laboratoriais e de tratamento _____	41
6.1.3 Prevalência e relevância clínica dos anticorpos anti-P ribossomal _____	45
6.2 Capítulo 2: Níveis elevados de S100 β estão associados com a presença de distúrbio cognitivo no LESJ. _____	46

6.2.1 Dados demográficos	46
6.2.2 Características clínicas, laboratoriais e de tratamento	46
6.2.3 Relevância clínica de S100 β	51
7. Discussão	53
7.1 Anticorpos anti-P ribossomal	53
7.2 Proteína S100 β	57
8. Conclusões	59
9. Abstract	60
10. Referências bibliográficas	62
11. Apêndices	96
11.1 Apêndice 1	96
11.2 Apêndice 2	100
11.3 Apêndice 3	104

Resumo

O Lúpus Eritematoso Sistêmico Juvenil (LESJ) é uma doença inflamatória crônica, de etiologia desconhecida e natureza autoimune com início até os 16 anos de idade. O comprometimento do sistema nervoso central (SNC) é difícil de ser avaliado no LESJ. Os anticorpos anti-P ribossomal são autoanticorpos dirigidos contra epítomos de fosfoproteínas do complexo ribonucleoproteico ribossomal e com maior prevalência em pacientes com até 18 anos de idade. A proteína S100 β tem baixo peso molecular, sendo composta de 91 aminoácidos e localizada principalmente nas células da neuroglia, células de Schwann e na maioria dos nervos sensoriais do tronco cerebral.

Os objetivos deste trabalho foram determinar a associação entre anticorpos anti-P ribossomal e a proteína S100 β com manifestações clínicas e laboratoriais no LESJ; avaliar a prevalência dos anticorpos anti-P ribossomal em pacientes com LESJ, familiares de primeiro grau e indivíduos controles saudáveis; e avaliar os níveis de proteína S100 β em pacientes com LESJ e indivíduos controles saudáveis.

Foram selecionados pacientes consecutivos com LESJ acompanhados na Reumatologia Pediátrica da Universidade Estadual de Campinas entre 2009/2010. Familiares aparentados em primeiro grau com os pacientes também foram incluídos. Os indivíduos do grupo controle foram pareados por idade, sexo e antecedentes demográficos. Manifestações clínicas, laboratoriais, atividade da doença [SLE Disease Activity Index (SLEDAI)], dano cumulativo [Lupus International Collaborating Clinics / American College of Rheumatology Damage Index (SDI)] e medicação em uso foram avaliados.

Incluímos 50 pacientes com LESJ (média de idade de $16,82 \pm 3,46$ anos), 35 familiares (média de idade de $38,73 \pm 3,89$ anos), e 20 controles saudáveis (média de idade de 18,3

$\pm 4,97$ anos). Observamos os anticorpos anti-P ribossomal em 13 (26%) dos pacientes com LESJ, e em nenhum familiar ($p < 0,01$) ou controle ($p < 0,01$). A presença dos anticorpos anti-P ribossomal esteve associada à presença de ansiedade no LESJ ($p < 0,002$). Pacientes com distúrbio cognitivo (mediana=38,08) apresentaram níveis de S100 β significativamente maiores quando comparados aos pacientes sem distúrbio cognitivo (mediana=16,12; $p=0,01$) e indivíduos controles (mediana=23,62; $p < 0,05$). Nenhuma outra manifestação clínica, laboratorial, e de tratamento esteve associada com o anticorpo anti-P ribossomal ou com a proteína S100 β no LESJ.

A partir destes dados concluímos que os anticorpos anti-P ribossomal são frequentemente observados em pacientes com LESJ e estiveram associados com a presença de ansiedade neste grupo de pacientes; e que a presença de distúrbio cognitivo esteve associada com níveis elevados de S100 β , indicando a presença de lesão neuronal nestes pacientes.

Abstract

Childhood-onset systemic lupus erythematosus (cSLE) is a chronic inflammatory disease of unknown etiology and autoimmune nature, with disease onset until 16 years of age. It is difficult to assess the central nervous system involvement in cSLE. The antiribosomal P antibodies are autoantibodies directed against epitopes of ribosomal phosphoproteins from the ribonucleoprotein complex and more frequently observed in patients with up to 18 years old. The S100 β protein has a low molecular weight, being composed of 91 amino acids and mainly located in the cells of the neuroglia, Schwann cells and sensory nerves in most of the brainstem.

Our objectives were to determine the association between antiribosomal P antibodies and S100 β protein with clinical and laboratory manifestations in cSLE; to assess the prevalence of antiribosomal P antibodies in patients with cSLE, first-degree relatives and healthy control subjects; and to evaluate S100 β protein levels in cSLE patients and healthy control subjects.

Consecutive cSLE patients followed in Pediatric Rheumatology at the University of Campinas between 2009/2010 were selected for this study. First-degree relatives were also included in this work. The control group were matched for age, gender and demographic background. Clinical, laboratory, disease activity [SLE Disease Activity Index (SLEDAI)], cumulative damage [Systemic Lupus International Collaborating Clinics /American College of Rheumatology Damage Index (SDI)] and medication in use were assessed.

Fifty cSLE patients, (mean age of 16.82 ± 3.46 years), 35 relatives (mean age of 38.73 ± 3.89 years) and 20 healthy controls (mean age 18.3 ± 4.97 years) were

selected. Thirteen (26%) cSLE patients presented the antiribosomal P antibodies, no first-degree relative ($p < 0.01$) or control ($p < 0.01$) presented antiribosomal P antibodies. Antiribosomal P antibodies were associated to anxiety in this cohort of cSLE patients ($p < 0.02$). Patients with cognitive impairment (median = 38.08) had significantly higher levels of S100 β compared to patients without cognitive impairment (median = 16.12, $p = 0.001$) and controls (median = 23.62, $p < 0.05$). No other clinical, laboratory, and treatment were associated with the antiribosomal P antibodies or S100 β protein in cSLE.

These data shows that the antiribosomal P antibodies are often observed in cSLE patients and that it was associated with the presence of anxiety in this group of patients. The presence of cognitive impairment was associated with elevated levels of S100 β , suggesting neuronal damage in these patients.

1. Introdução

1.1 Definição

O Lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença do tecido conjuntivo com manifestações clínicas diversas, caracterizada por períodos de remissão e exacerbação, com participação intensa do sistema imunológico (Dubois & Tuffanelli, 1964; West, 1994; Ruiz-Irastorza, 2001; Rahman & Isenberg, 2008; O'Neill, 2010).

1.2 Epidemiologia

A prevalência de LES é de aproximadamente 0,1% na população geral (Siegel & Lee, 1973; Petri, 2002). Quanto às diferentes raças, observa-se a frequência de 1 para cada 250 mulheres negras nos Estados Unidos da América; 22,4 para cada 100.000 asiáticos e 10,3 para cada 100.000 caucasianos (Fessel, 1974; Hopkinson, 1994; Johnson, 1995; Alarcon, 2001; Petri, 2002; O'Neill, 2010). Apresenta-se, entretanto, como uma rara doença entre os negros africanos (Molina, 1997; Molokhia, 2001). No Brasil observa-se uma frequência maior entre os caucasóides, principalmente na região sudeste do país (Chahade, 1995). Em estudo realizado em Natal no Rio Grande do Norte, observou-se uma incidência de LES na população de 8,7/100.000/ano (Vilar, 2002).

Apesar de surgir geralmente na segunda e terceira década de vida, o LES pode se manifestar em qualquer idade, predominantemente no sexo feminino (Dubois e Tuffanelli, 1964; Siegel e Lee, 1973; Petri, 2002). Aproximadamente 15% a 20% dos diagnósticos são feitos na infância (Urowitz, 1967; Hashimoto, 1987; Pande, 1993; Cervera, 1993; Costallat & Coimbra, 1994; Tucker, 1995; Font, 1998; Rood, 1999;

Carreño, 1999; Klein-Gitelman, 2002; Mok, 2005; Gómez, 2006; Tucker, 2008; Ramirez Gomez, 2008; Hoffman, 2009; Feng, 2010; Livingston, 2011). Nas crianças, a relação entre sexo feminino e masculino é de 1,4 a 5,8:1; nos adultos varia de 8:1 a 13:1; nos indivíduos de idade mais avançada, esta relação é de 2:1 (Urowitz, 1967; Hashimoto, 1987; Pande, 1993; Cervera, 1993; Costallat & Coimbra, 1994; Tucker, 1995; Press, 1996; Font, 1998; Reichlin, 1999; Rood, 1999; Marini, 1999; Carreño, 1999; Huemer, 2001; Costallat, 2002; Klein-Gitelman, 2002; Huang, 2004; Mok, 2005; Gómez, 2006; Tucker, 2008; Ramirez Gomez, 2008; Hoffman, 2009; Feng, 2010; Livingston, 2011; Pineles, 2011).

1.3 Critérios classificatórios do LES

Não existem critérios definitivos para o diagnóstico do LES. O Colégio Americano de Reumatologia (ACR) definiu critérios classificatórios de LES, segundo os quais são necessários no mínimo quatro critérios clínicos e/ou laboratoriais entre onze (Tan, 1982), após cuidadosa investigação e exclusão de doenças infecciosas e neoplásicas, entre outras. Estes critérios foram revisados em 1997, e o item “presença de células LE”, constante do critério “alterações imunológicas”, foi excluído, e o teste falso positivo para sífilis foi substituído pela presença de anticorpos antifosfolípedes (Hochberg, 1997).

1.4 Manifestações neuropsiquiátricas

As manifestações neuropsiquiátricas (NP) no LES são complexas e podem ser definidas como manifestações neurológicas do sistema nervoso central (SNC), periférico (SNP) e autonômico (SNA) e de síndromes psiquiátricas observadas em pacientes com LES (ACR, 1999; Hanly, 2005; Hanly & Harrison, 2005; Postal, 2011).

Podem ser causadas diretamente pela atividade do LES ou serem secundárias a comorbidades como hipertensão arterial sistêmica (HAS), diabetes mellitus (DM), uremia e infecção (Hanly, 2004; Hanly, 2005; Hanly & Harrison, 2005; Postal, 2011). Poderiam ocorrer também ou ainda serem doenças primariamente distintas e concomitantes em pacientes com LES, sendo consideradas associações fortuitas. Por definição, para serem consideradas primariamente decorrentes do LES, outras possíveis causas necessitam ser cuidadosamente excluídas (Hanly, 2005; Hanly & Harrison, 2005; Postal, 2011). As manifestações NP secundárias correspondem a aproximadamente 40% das manifestações NP observadas em pacientes com LES (Hanly, 2004).

1.4.1 Classificação

Desde as primeiras descrições das manifestações NP (Daly, 1945; Clark & Bailey, 1956; Dubois & Tuffanelli, 1964; Johnson & Richardson, 1968; Klippel & Zvaifler, 1975; Sergent, 1975; Feinglass, 1976; Ellis & Verity, 1979; Kaell, 1986; Pistiner, 1991) observou-se que muitas destas não eram contempladas pelos critérios classificatórios originais descritos (Tan, 1982). A falta de padronização fez surgir diferentes critérios e definições destas manifestações (Kassan & Lockshin, 1979; How, 1985; Singer & Denburg, 1990; West, 1994; Hanly, 1998) e assim, obteve-se resultados diversos e de difícil comparação. Em 1999, o ACR elaborou um consenso para a terminologia e definição das síndromes NP que ocorrem no LES (ACR, 1999), com a participação de reumatologistas, neurologistas, psiquiatras, entre outros, e definiu 19 síndromes mais prevalentes (Tabela 1). Estes critérios foram posteriormente validados apresentando uma sensibilidade de 91% e especificidade de 46% (Ainiala, 2001). A baixa especificidade se deu devido à presença de ansiedade, cefaléia, depressão leve,

distúrbio cognitivo leve e polineuropatia não confirmada por eletroneuromiografia (Ainiala, 2001). Quando estas manifestações foram excluídas, observou-se uma especificidade de 93% (Ainiala, 2001).

Tabela 1. Manifestações neuropsiquiátricas no LES.

Manifestações do SNC	Manifestações do SNP
Cefaléia	Desordem autonômica
Convulsão	Miastenia grave
Desordens de ansiedade	Mononeuropatia
Desordens do humor	Neuropatia craniana
Desordens de movimento	Plexopatia
Distúrbio cognitivo	Polineuropatia
Doença cerebrovascular	Polirradiculopatia inflamatória desmielinizante aguda
Estado confusional agudo	
Meningite asséptica	
Mielopatia	
Psicose	
Síndromes desmielinizantes	

1.4.2 Prevalência

O envolvimento do SNC no LES é difícil de ser avaliado e pode se apresentar focal ou difusamente (Figura 1), não existindo padrão ouro para o seu diagnóstico (Carreno, 1999; Muscal, 2010; Postal, 2011; Hanly, 2011).

Estima-se uma prevalência de manifestações NP no LESJ entre 22% a 95% (Yancey, 1981; Steinlin, 1995; Loh, 2000; Sibbit, 2002; Olfat, 2004; Harel, 2006; Yu, 2006; Brunner, 2007; Hiraki, 2008; Muscal, 2009; Muscal, 2010; Levy,

2009). Estudos retrospectivos têm descrito uma prevalência de manifestações NP de 25% a 50% e as manifestações mais frequentemente descritas foram: convulsão, cefaléia, desordens de humor e distúrbio cognitivo (Yancey, 1981; Steinlin, 1995; Olfat, 2004; Harel, 2006; Yu, 2006; Muscal, 2009; Muscal, 2010; Levy, 2009). Em estudos prospectivos observou-se uma prevalência de manifestações NP variando de 27% a 95%, sendo cefaléia, desordens de humor, distúrbio cognitivo e convulsão as manifestações mais frequentemente observadas (Loh, 2000; Sibbit, 2002; Brunner, 2007; Hiraki, 2008; Muscal, 2009). Estudos prospectivos demonstraram uma presença mais elevada de ansiedade quando comparados com estudos retrospectivos (Sibbit, 2002).

Além das dificuldades encontradas para o diagnóstico do envolvimento NP em pacientes adultos, o diagnóstico deste comprometimento em crianças apresenta uma maior complexidade (Carreno, 1999; Muscal, 2010). A mudança de comportamento associada à idade, diferença de potencial imunológico, diferença estrutural cerebral associada ao desenvolvimento e a não existência de uma bateria de testes clínicos ou de investigação neuropsicológica validados dificulta ainda mais a avaliação do envolvimento do SNC no LESJ (Carreno, 1999; Muscal, 2010).

1.4.3 Fisiopatogenia

A fisiopatogenia das manifestações NP no LES é multifatorial e envolve a produção de auto-anticorpos, citocinas pró-inflamatórias e aterosclerose (Hanly, 2001; Hanly & Harrison, 2005; Hanly, 2005; Postal, 2011). Estudos histopatológicos “post-mortem” no LES revelaram a presença predominantemente de microinfartos multifocais, atrofia cortical, isquemia, hemorragia e desmielinização,

sendo vasculite raramente encontrada (Johnson & Richardson, 1968; Ellis & Verity, 1979; Devinsky, 1988; Hanly, 1992; Scolding, 2002; Arinuma, 2011).

Autoanticorpos dirigidos contra neurônios, ribossomos ou proteínas fosfolípedes têm sido associados com manifestações do SNC e podem ser produzidos no SNC ou atravessarem a barreira hemato-encefálica (Devinsky, 1988; Karpiak, 1976; Costallat, 1990; DeGiorgio, 2001). Déficits de memória, convulsões e alterações neurológicas têm sido atribuídos a anticorpos antineuronais em modelos animais (Kobiler, 1976; Morris, 1986). No LES, tem se mostrado aumentada a presença de auto-anticorpos em pacientes com manifestações NP, embora nenhuma manifestação clínica ou especificidade diagnóstica possa ser identificada (Hanly, 2005).

Os anticorpos anti-receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), NR2a e NR2b têm sido observados em pacientes com manifestações NP (Figura 1). Embora anticorpos anti-NR2 têm sido estudados em pacientes com LES, apenas anticorpos Anti-NR2 no líquido cefalorraquidiano (LCR), e não no soro, estão associados com manifestações NP difusas no LES (Arinuma, 2008). Os anticorpos anti-receptores NMDA no LCR acometem o SNC independente de eventos trombóticos ou vasculite (DeGiorgio, 2001). Estes anticorpos no LCR foram associados com manifestações NP em geral (Yoshio, 2006) e manifestações NP difusas (Arinuma, 2008); já no soro, foram descritas associações com distúrbio cognitivo (Omdal, 2005), depressão (Omdal, 2005), déficit de memória recente e de aprendizado (Omdal, 2005), embora outros estudos não confirmem estes achados (Ganor, 2005; Steup-Beekman, 2007; Hanly, 2008; Kozora, 2010).

Anticorpos antifosfolípedes estão associados predominantemente com manifestações focais no LES (Figura 1), como isquemia cerebral transitória ou acidente vascular cerebral. Porém foram descritas associações com outras manifestações como

convulsão, coréia, mielite transversa, trombose venosa cerebral e distúrbio cognitivo (Love, 1990; Menon, 1999; Chapman, 1999; Afeltra, 2003; Appenzeller, 2005; Zandman-Goddard, 2007).

Dois estudos investigaram o papel de anticorpos antiendoteliais (AECA) no envolvimento do SNC no LES e encontraram maior prevalência e concentração destes anticorpos em pacientes com manifestações NP (Song, 2000; Conti, 2004).

O papel dos anticorpos anti-P ribossomal e da proteína S100 β no comprometimento do SNC no LES será descrito adiante (Figura 1).

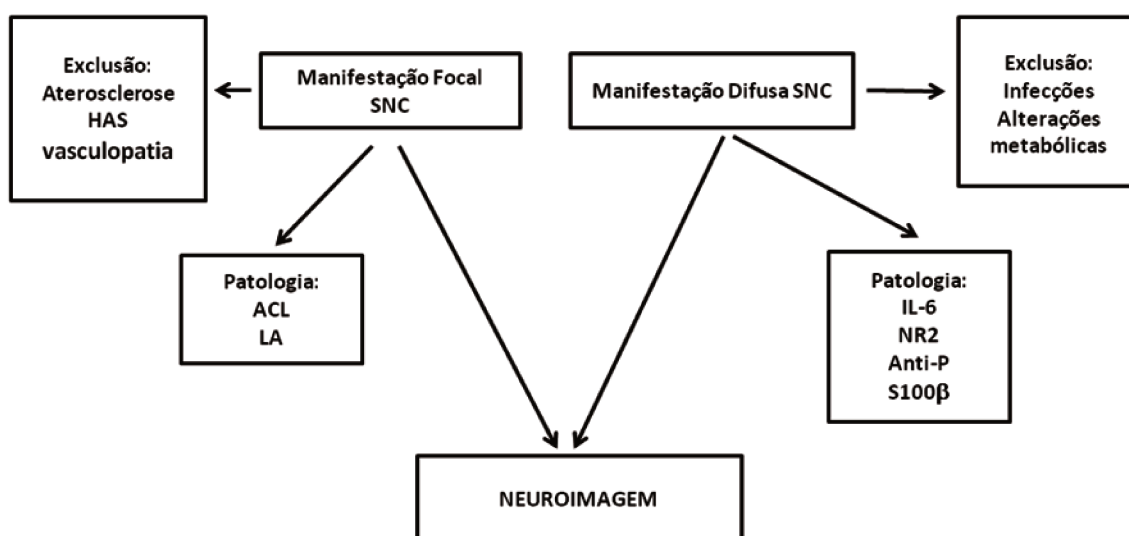
Vários estudos analisaram o papel do processo inflamatório nas manifestações do SNC no LES. Aumento de interleucinas (Hirohata, 1990; Jara, 1998; Trysberg, 2000), fator de necrose tumoral (Shiozawa, 1992) e metaloproteinase (Faber-Elmann, 2002; Ainiala, 2004) no LCR foram observados em pacientes com manifestações do SNC e associados a presença de manifestações clínicas específicas (leve pleocitose, albumina intratecal, depressão) e achados de ressonância magnética (Trysberg, 2000; Faber-Elmann, 2002). Um estudo multicêntrico retrospectivo recente demonstrou que níveis elevados de interleucina 6 (IL-6) (Figura 1) no LCR pode ser útil no diagnóstico de psicose primária no LES, embora seja necessário a exclusão de processos infecciosos e isquêmicos (Hirohata, 2009).

Processos inflamatórios crônicos, fatores imunológicos (incluindo anticorpos antifosfolípedes) (Ross, 1999; Harats, 1999; George, 2000), dislipoproteinemia (Borba, 1994; Borba, 2000), nefrite (Baigent, 1999) e tratamento com corticoesteróides (Bruce, 2000) são fatores de risco não tradicionais associados a aterosclerose no LES (Jennekens, 2002). A aterosclerose ocorre em uma idade mais precoce e está associada a eventos cardiovasculares, como acidente vascular cerebral (Jennekens, 2002).

Por isso os três mecanismos auto-imunes primários (autoanticorpos, inflamação e aterosclerose) envolvidos em manifestações do SNC de pacientes com LES parecem ter uma via final comum: o envolvimento microvascular cerebral (Hanly, 2005; Hanly & Harrison, 2005; Postal 2011; Hanly, 2011). Os estudos de neuroimagem enfatizam a importância do comprometimento da microvasculatura cerebral nas manifestações NP do LES (Graham, 2003; Appenzeller, 2005; Appenzeller, 2008; Postal, 2011).

A exclusão de pacientes com acometimento do SNC que não decorrente do LES, além da análise de manifestações individuais podem fornecer uma população clínica mais homogênea favorecendo a elucidação do mecanismo patológico envolvido em manifestações do SNC no LES.

Figura 1. Patogênese do envolvimento do SNC no LES.



1.5 Anticorpos anti-P ribossomal

Os anticorpos anti-P ribossomal são autoanticorpos dirigidos contra um epítipo comum de três fosfoproteínas, denominadas P0 (38kd), P1 (19kd) e P2 (17kd). Estas fosfoproteínas podem ser encontradas no meio intracelular, fazendo parte do componente 60S dos ribossomos de células eucarióticas (Elkon, 1985; Elkon, 1986). As proteínas P também podem ser encontradas livres no citosol e, no caso da proteína P0, na superfície da membrana celular (Koren, 1992; Koscec, 1997; Sun, 2001). Somente as

formas livres das proteínas P e a P0 encontrada na superfície da membrana celular estão associadas com a apresentação do epítopo aos anticorpos anti-P ribossomal. No entanto, foi identificada uma proteína denominada p331, com peso molecular de 331kd e localizada na superfície celular que mimetisa a proteína P0 e que pode se ligar aos anticorpos anti-P ribossomal (Reichlin, 2003). Também foi demonstrado que os anticorpos anti-P ribossomal se ligam a antígenos em superfícies neuronais com a mesma sequência terminal dos antígenos da proteína P ribossomal (Matus, 2007). Estes antígenos são encontrados em regiões cerebrais específicas (Matus, 2007).

As proteínas P localizadas intracelularmente são normalmente inacessíveis aos autoanticorpos circulantes. Entretanto, um estudo com hepatócitos em cultura demonstrou que os anticorpos anti-P ribossomal podem, de alguma forma, penetrar em células vivas e provocar efeitos deletérios (Koscec, 1997). Desta forma, os anticorpos anti-P ribossomal teriam um potencial deletério generalizado podendo acarretar em disfunção de vários tipos celulares (Reichlin, 2003; Reichlin, 2006).

Uma vez ligados à membrana celular os anticorpos anti-P ribossomal promovem a ativação da caspase-3 e o aumento de influxo de cálcio que leva a apoptose celular (Mahler, 2003; Matus, 2007).

O primeiro estudo a respeito dos anticorpos anti-P ribossomal data de 1967, quando Schur e colaboradores descreveram precipitações de anticorpos em ribossomos em pacientes com LES (Schur, 1967). Nefrite foi observada em todos os 11 pacientes com anticorpos antiribossomal neste estudo, e 7 dos 11 pacientes faleceram durante os primeiros 2 anos de seguimento (Schur, 1967). Posteriormente estas precipitações de anticorpos em ribossomos foram identificadas como sendo anticorpos anti-P ribossomal (Meroni, 1984).

A primeira descrição de associação entre a presença dos anticorpos anti-P ribossomal e manifestações NP no LES foi realizada por Bonfa e colaboradores (Bonfa, 1986). Neste estudo foi demonstrada uma associação entre os anticorpos anti-P ribossomal e a presença de psicose (Bonfa, 1986). Posteriormente, Bonfa e colaboradores, além de confirmarem a associação entre a presença de anticorpos anti-P ribossomal e psicose, observaram que os níveis de anticorpos anti-P ribossomal aumentaram de 5 a 30 vezes durante a fase ativa de psicose (Bonfa, 1987). Esta associação entre anticorpos anti-P ribossomal e psicose foi confirmada em outras coortes (Nojima, 1992; Press, 1996; Chan, 1998; Isshi, 1998; Kao, 1999; Tzioufas, 2000; Mahler, 2006; Hirohata, 2007; Shoenfeld, 2007; Abdel-Nasser, 2008; Hanly, 2008; Briani, 2009; Olesinska, 2010; Hanly, 2011), porém vários outros autores não confirmaram esta associação (Derksen, 1990; Teh, 1992; Van Dam, 1991; Gerli, 2002; Conti, 2004; Nery, 2007; Fragoso-Loyo, 2008; Haddouk, 2009; Mahler, 2010). Esta discrepância pode ser devido a diferentes métodos de dosagem dos anticorpos anti-P ribossomal, diferentes etnias estudadas, atividade da doença, tempo entre a manifestação clínica e a dosagem do anticorpo e diferentes definições utilizadas para diagnóstico de manifestações NP (Eber, 2005). Estudos multicêntricos observaram a associação entre os anticorpos anti-P ribossomal e manifestações NP focais e difusas, incluindo psicose (Mahler, 2006, Hanly, 2008; Hanly, 2011).

Também foi descrito a associação entre os anticorpos anti-P ribossomal e a presença de transtornos do humor (depressão) (Schneebaum, 1991; Kao, 1999; Shoenfeld, 2007; Abdel-Nasser, 2008;), porém não confirmado em outros estudos (Conti, 2004; Nery, 2007; Fragoso-Loyo, 2008). Até o presente momento não foi observado uma associação entre a presença de anticorpos anti-P ribossomal e ansiedade (Nery, 2007).

Outras manifestações NP têm sido associadas à presença dos anticorpos anti-P ribossomal, como convulsão (Chan, 1998; Tzioufas, 2000) e manifestações NP difusas em geral (Tzioufas, 2000; Hirohata, 2007; Hanly, 2008).

O potencial patogênico dos anticorpos anti-P ribossomal no SNC foi estudado através da injeção intraventricular destes anticorpos em camundongos (Katzav, 2007). Os animais desenvolveram comportamento depressivo, no entanto, este comportamento não esteve acompanhado de distúrbios motores, cognitivos ou déficits de coordenação (Katzav, 2007). A análise histológica do cérebro destes animais demonstrou a presença de anticorpos anti-P ribossomal nos neurônios do hipocampo, das camadas neocorticais II, V e VI, da amígdala, do córtex cingulado e do córtex piriforme (Katzav, 2007). Estas regiões fazem parte do sistema límbico e estão associadas com o humor (distúrbios de humor) (Strous, 2006; Katzav, 2007), e sugerem que os anticorpos anti-P ribossomal podem estar associados a uma ampla gama de disfunções do SNC (Moscavitch, 2009). O papel direto dos anticorpos anti-P ribossomal na indução da depressão foi reforçado pela reversão dos efeitos após a administração de anticorpos monoclonais específicos anti-idiotípicos e terapia antidepressiva de longo prazo (Blank, 2007).

Os anticorpos anti-P ribossomal são detectados predominantemente em pacientes durante a atividade da doença (Bonfa, 1987; Sato, 1991; Chindalore, 1998; Reichlin, 1999; Frampton, 2000; Tzioufas, 2000; Sugisaki, 2002; Ersvaer, 2004; Agmon-Levin, 2009; Haddouk, 2009; Hanly, 2010; Olesinska, 2010; Quintana, 2010; Mahler, 2010), flutuando ao longo da doença (Bonfa, 1987; Press, 1996; Chindalore, 1998, Reichlin, 1999; Frampton, 2000; Sugisaki, 2002; Agmon-Levin, 2009; Mahler, 2010).

A associação de anticorpos anti-P ribossomal com outras manifestações sistêmicas também foi descrita (Hulsey, 1995; Isenberg, 1997; Chindalore, 1998; Reichlin, 1999; Frampton, 2000; Gerli, 2002; Hoffman, 2004; Ohira, 2004; Mahler, 2006; Nascimento, 2006; Hoffman, 2009; Briani, 2009; Haddouk, 2009; Miljic, 2009; Macedo, 2010; Quintana, 2010; Shinjo, 2010; Olesinska, 2010; Mahler, 2010).

Vários trabalhos estudaram a associação entre a presença dos anticorpos anti-P ribossomal e hepatite autoimune (Hulsey, 1995; Yoshio, 1998; Massardo, 2002; Ohira, 2004). Em células de cultura foi demonstrado que os anticorpos anti-P ribossomal envolvem e penetram nas células HepG2 vivas interferindo com a síntese de proteínas intracelulares (Koscec, 1997). O envolvimento e a penetração dos anticorpos anti-P ribossomal é propriedade do fragmento F(ab1)₂, não dependendo dos fragmentos Fc ou de seus receptores cognatos (Koscec, 1997).

A presença de anticorpos anti-P ribossomal foi associada com a presença de nefrite no LES (Chindalore, 1998; Reichlin, 1999; Nascimento, 2006; Mahler, 2006; Olesinska, 2010; Quintana, 2010), especificamente a nefrite membranosa (Nascimento, 2006). Também foi observado um curso mais brando da nefrite na presença do anticorpo anti-P ribossomal, com menor perda de função renal e maior sobrevida renal (Macedo, 2010).

Outra associação descrita refere-se aos anticorpos anti-P ribossomal e anti-dsDNA (Hulsey, 1995; Sun, 1995; Chindalore, 1998; Reichlin, 1998; Reichlin, 1999; Takeda, 1999; Tzioufas, 2000; Caponi, 2002; Frampton, 2000; Nascimento, 2006; Olesinska, 2010; Quintana, 2010). Um dado que sugere um papel imunopatogênico para os anticorpos anti-P ribossomal é a sua semelhança ao anti-dsDNA. Ambos envolvem e penetram em células de cultura e depositam-se no sítio de dano celular (Reichlin, 1998).

Também foi observado a associação entre a presença de anticorpos anti-P ribossomal e linfopenia (Hoffman, 2004; García-Valladares, 2006), alopecia (Hoffman, 2004), anemia hemolítica (Hoffman, 2004), artrite (Isenberg, 1997; Haddouk, 2009), hipocomplementemia (Tzioufas, 2000; Olesinska, 2010; Mahler, 2010), anticorpos antifosfolípedes (Ghirardello, 2000; Tzioufas, 2000; Gerli, 2002; Haddouk, 2009; Briani, 2009), anticorpos anti-endotélio (Frampton, 2000), rash malar (Gerli, 2002; Mahler, 2006; Olesinska, 2010), rash discoide (Gerli, 2002), fotossensibilidade (Gerli, 2002), anti-U1-RNP (Reichlin, 1999), anti-Sm (Reichlin, 1999), vasculite (Shinjo, 2010) e inversamente associados a serosite (Mahler, 2006). Em um único caso descrito, foi observada a associação de anticorpos anti-P ribossomal com linfoma não-Hodgkin (Miljic, 2009).

Os anticorpos anti-P ribossomal são mais frequentemente observados em pacientes com o início da doença em idade mais jovem (Reichlin, 1999; Gerli, 2002; Abdel-Nasser, 2008; Briani, 2009; Hoffman, 2009; Mahler, 2010), porém existem apenas dois estudos que compararam a prevalência de anticorpos anti-P ribossomal no LESJ e no LES de início na idade adulta (Reichlin, 1999; Hoffman, 2009). Estes estudos demonstraram maior frequência de anticorpos anti-P ribossomal no LESJ (Reichlin, 1999; Hoffman, 2009).

Os anticorpos anti-P ribossomal não são exclusivos no LES, podendo ser observados também em pacientes com esclerose sistêmica, síndrome de Sjogren e dermatomiosite (Muro, 2009). Em indivíduos saudáveis também tem sido observada a presença de anticorpos anti-P ribossomal (Press, 1996; Agmon-Levin, 2009; Moscovitch, 2009). Estudos purificaram soro de indivíduos saudáveis e os dados obtidos sugerem que os anticorpos anti-P ribossomal estão presentes de forma mascarada na população saudável (Stafford, 1995; Anderson, 1998; Pan, 1998).

1.6 Proteína S100 β

A proteína S100 β é uma proteína glial de baixo peso molecular (aproximadamente 10kDa) que pertence a uma família multigênica de proteínas (proteínas S100) que se ligam ao cálcio (Moore, 1965; Allore, 1990; Bianchi, 1993; Nowotny, 2003; Steiner, 2007). Várias combinações de subunidades (α e β) fazem parte da família de proteínas S100, as quais divergem entre formatos heterodímeros e homodímeros. A proteína S100 β que compreende as formas β - β e α - β , é altamente específica para tecido nervoso e é encontrada em abundância no compartimento da astroglia cerebral (Donato R, 2001). A proteína S100 β é liberada no LCR devido a dano estrutural às células neuronais por hipóxia e/ou privação de glicose (Gerlach, 2006). Após perda da integridade da barreira hemato-encefálica a proteína S100 β passa para a circulação sistêmica e pode ser encontrada no soro (Gerlach, 2006). A concentração de proteína S100 β é 40 vezes maior no LCR do que no soro (Donato, 2001). Em concentrações nanomolares, a proteína S100 β é trofica aos neurônios e tem um papel de reparo, mas em concentrações micromolares está associada à inflamação e apoptose neuronal (Van Eldik, 2003).

A proteína S100 β é considerada um bom biomarcador para identificar dano cerebral, já que não é afetada por hemólise e é liberada no soro até 24 horas após a lesão neuronal (Kanner, 2003; Jauch, 2006).

Estudos têm demonstrado elevadas concentrações da proteína S100 β no soro após acidente vascular cerebral (Persson, 1987; Abraha, 1997; Buttner, 1961; Elting, 2000; Wunderlich, 2004; Jauch, 2006; Foerch, 2003; Foerch, 2005), porém é pouco específica, uma vez que aumentos ocorrem na presença de neoplasias e após traumas cerebrais, entre outros (Donato, 2001).

No LES com manifestações NP foram demonstrados níveis séricos elevados da proteína S100 β quando comparados a pacientes sem manifestações NP (Schenatto, 2006; Yang, 2008), independente da presença de atividade da doença (Portela, 2002). Os resultados também sugerem que os níveis elevados da proteína S100 β podem ser úteis para o diagnóstico de manifestações NP, particularmente nas formas agudas no LES (Portela, 2002; Schenatto, 2006; Yang, 2008). Na evolução, após tratamento adequado, observou-se queda dos níveis de proteína S100 β tanto no LCR como no soro (Yang, 2008, Fragoso-Loyo, 2010). Em estudo publicado em 2010, Fragoso-Loyo e colaboradores não observaram associação entre níveis elevados de proteína S100 β e manifestações NP no LES, porém incluíram somente pacientes que necessitaram internação e não avaliaram a presença de manifestações NP de forma sistemática (Fragoso-Loyo, 2010).

2. JUSTIFICATIVA

Existem poucos estudos de prevalência dos anticorpos anti-P ribossomal no LESJ e não há estudos com a proteína S100 β nesta doença. A maior frequência de manifestações neuropsiquiátricas no LESJ justifica o estudo dos anticorpos anti-P ribossomal e da proteína S100 β nesta doença, além do fato de que a proteína S100 β indica a presença de lesão neuronal causada por anticorpos anti-P ribossomal.

3. HIPÓTESES

Os anticorpos anti-P ribossomal e a proteína S100 β são mais prevalentes em pacientes com LESJ em relação aos familiares e controles.

Os anticorpos anti-P ribossomal são mais prevalentes nos familiares em relação aos controles.

Os anticorpos anti-P ribossomal e a proteína S100 β podem determinar subgrupos de pacientes, de acordo com as manifestações clínicas, laboratoriais e especialmente, neuropsiquiátricas.

4. Objetivos

4.1 Objetivo geral

- 4.1.1 Determinar a prevalência e importância clínica dos anticorpos anti-P ribossomal e da proteína S100 β no LESJ.

4.2 Objetivos específicos

- 4.2.1 Avaliar a prevalência dos anticorpos anti-P ribossomal em:
- Pacientes com LESJ
 - Familiares em 1º grau
 - Indivíduos saudáveis
- 4.2.2 Determinar a associação entre anticorpos anti-P ribossomal e:
- Manifestações clínicas/laboratoriais
 - Manifestações neuropsiquiátricas
- 4.2.3 Avaliar os níveis da proteína S100 β em:
- Pacientes com LESJ
 - Indivíduos saudáveis
- 4.2.4 Determinar a associação entre a proteína S100 β com:
- Manifestações clínicas/laboratoriais
 - Manifestações neuropsiquiátricas

5. Materiais e Métodos

5.1 Delineamento do estudo

Foi realizado um estudo transversal com grupo controle.

5.2 Seleção de indivíduos participantes do estudo

5.2.1 Pacientes

Foram selecionados pacientes com diagnóstico de LES (Hochberg, 1997), seguidos no Ambulatório de Reumatologia Pediátrica entre novembro de 2009 e dezembro de 2010.

Critérios de inclusão

1. Apresentar quatro ou mais critérios classificatórios propostos pelo ACR (Hochberg, 1997).
2. Ter início da doença antes dos 16 anos de idade.

Critérios de exclusão

1. Pacientes que não apresentaram diagnóstico de LES definitivo.
2. Pacientes que não concordaram em participar da pesquisa.

5.2.2 Familiares

Para o estudo dos anticorpos anti-P ribossomal foi também incluído um grupo controle composto por familiares.

Critério de inclusão

1. Parentesco em 1º grau com os pacientes.

Critérios de exclusão

1. Histórico pessoal de doenças crônicas
2. Histórico pessoal de doenças reumáticas.
3. Não concordaram em participar da pesquisa.

5.2.3 Controles

O grupo controle foi composto por voluntários sadios sem histórico de doença crônica, pareados por idade e sexo com os pacientes.

Critério de inclusão

1. Idade e sexo similar dos pacientes.

Critérios de exclusão

1. Histórico pessoal e/ou familiar de doenças crônicas.
2. Histórico pessoal e/ou familiar de doenças reumáticas.
3. Não concordaram em participar da pesquisa.

5.3 Termo de consentimento

Todos os participantes (ou seus responsáveis) incluídos neste estudo assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP/FCM), constante do projeto N° 697/2009.

5.4 Características demográficas, clínicas e laboratoriais dos pacientes com LESJ

5.4.1 Características demográficas

As características demográficas analisadas neste estudo foram idade de início da doença [definida como a idade (anos) na qual os primeiros sintomas relacionados ao LES foram observados], idade ao diagnóstico [definida como a idade (anos) em que o

paciente apresentou quatro ou mais critérios classificatórios para LES] (Hochberg, 1997) e tempo de acompanhamento [definido como tempo (anos) decorrido entre o diagnóstico e a inclusão no estudo].

5.4.2 Características clínicas, neuropsiquiátricas, laboratoriais, avaliação da atividade e do dano da doença e tratamento

5.4.2.1 Características clínicas

As características clínicas foram avaliadas na data da inclusão no estudo.

Foram analisadas as seguintes manifestações clínicas: presença de adinamia; emagrecimento (> 4 kg); febre ($\geq 37,8^{\circ}$ C); artrite (não erosiva em duas ou mais articulações periféricas, vista pelo médico); necrose asséptica (documentada por radiografia simples, cintilografia ou ressonância magnética); deformidades articulares (geralmente redutíveis, vistas pelo médico); eritema malar (eritema fixo sobre as eminências malares e/ou pregas naso-labiais); lesões discóides (placas eritematosas com descamação podendo ocorrer atrofia nas lesões antigas); alopecia; úlcera oral e/ou nasal (ulceração oral e/ou em nasofaringe, geralmente dolorosa, observadas por médico); fotossensibilidade (“rash” cutâneo resultado da exposição à luz solar, relatado na história clínica ou observada por médico); nefrite [definida pela presença de proteinúria maior que 0,5 g/l em 24 horas, presença de sedimento urinário ativo (hematúria dismórfica, leucocitúria na ausência de infecção urinária e/ou cilindros hemáticos) ou alterações histopatológicas quando compatíveis com nefrite lúpica, segundo critérios da Organização Mundial de Saúde] (Weening, 2004); HAS (níveis pressóricos maiores que recomendados para a idade); síndrome nefrótica (proteinúria maior que 3 g/l em 24 horas); serosite (presença de pleurite, pericardite ou ambas documentada no exame clínico e por imagem); outras manifestações pulmonares como hipertensão pulmonar,

pneumonite e hemorragia pulmonar; outras manifestações cardíacas como miocardite, endocardite própria do LES e infarto do miocárdio; miopatia (revelada por fraqueza muscular, alterações enzimáticas, alterações da biópsia muscular e /ou da eletromiografia).

Foi também considerado o envolvimento intestinal, hepático, e do sistema retículo-endotelial, presença de tromboembolismo pulmonar, alterações oculares e a presença do fenômeno de Raynaud.

5.4.2.2 Avaliação neuropsiquiátrica

As manifestações neuropsiquiátricas foram analisadas segundo as definições do ACR (ACR, 1999) e divididas em presente ou ausente na data de inclusão do estudo.

Todos os participantes da pesquisa foram submetidos a testes neuropsicológicos realizados por psicólogos habilitados. Indivíduos com 16 anos de idade ou menos foram avaliados pelo *Wechsler Intelligence Scale for Children (WISC-III)* (Wechsler, 1991; Alchieri, 2003). Indivíduos com mais de 16 anos de idade foram avaliados pelo *Wechsler Adult Intelligence Scale (WAIS-III)* (Wechsler, 1997; Alchieri, 2003). A Figura Complexa de Rey (Figura A) foi aplicada a todos os participantes independentemente da faixa etária (Machulda, 2007; Knight, 2003; Alchieri, 2003).

Os resultados individuais dos testes cognitivos foram comparados com dados normativos obtidos do grupo controle (Mikdashi, 2007). Indivíduos com testes com desvio padrão ≤ -2 foram considerados alterados. A gravidade do distúrbio cognitivo foi classificada como leve na presença de déficit em até 3 dimensões, como moderada na presença de déficit em 3-4 dimensões e como severa na presença de déficit em 5 ou mais dimensões (Mikdashi, 2007).

O Inventário de Ansiedade de Beck (BAI) (Beck, 1988; Cunha, 2001) foi aplicado a todos os indivíduos participantes da pesquisa no dia da inclusão do estudo. O Inventário de Depressão de Beck (BDI) (Beck, 1961; Cunha, 2001) foi aplicado para indivíduos com 16 ou mais anos de idade. Para indivíduos com menos de 16 anos de idade foi aplicado o Inventário de Depressão de Crianças (CDI) (Kovacs, 1985; Cunha, 2001).

Estas escalas consistem em 21 itens, cada um descrevendo um sintoma comum de ansiedade/depressão. Foram excluídas causas secundárias para garantir que os sintomas de ansiedade e depressão fossem primários ao LES. O participante ranqueou o quanto ele ou ela tem sido incomodado por cada sintoma no último mês em uma escala variando de 0 a 3. Os itens foram somados. A pontuação total pode variar de 0 a 63 pontos. Os limiares utilizados para o BDI e CDI foram: 0 a 13 sem depressão ou depressão mínima; de 14 a 19 depressão leve; de 20 a 28 depressão moderada; e de 29 a 63 depressão grave (Beck, 1961; Kovacs, 1985; Cunha, 2001). Para o BAI, os limiares utilizados foram: de 0 a 7 sem ansiedade ou nível mínimo de ansiedade; de 8 a 15 ansiedade leve; de 16 a 25 ansiedade moderada; e de 26 a 63 ansiedade grave (Beck, 1961; Beck, 1988; Cunha, 2001; Lindsay, 2007).

5.4.2.3 Características laboratoriais

As características laboratoriais foram avaliadas na data da inclusão no estudo.

O Fator Antinuclear (FAN) foi determinado por imunofluorescência indireta utilizando a linhagem celular humana HEp-2 como substrato (VIRGO® ANA/Hep-2 IgG), e considerado como positivo se maior que 1:40. Anticorpos anti-dsDNA foram determinados por imunofluorescência indireta utilizando *Crythidia luciliae* como substrato (VIRGO® Anti-nDNA IgG) e considerado positivo se maior que 1:10.

Anticorpos contra antígenos extraídos do núcleo (ENA), incluindo Ro (SSA), La (SSB) e Sm foram detectados por um método padronizado de ELISA (ORG 506 ENAscreen-ORGENTEC Diagnostika GmbH) e considerados positivos se ≥ 1 . Anticorpos anticardiolipina (aCL) dos isotipos IgG e IgM foram dosados por técnica de ELISA (Harris, 1987). O anticoagulante lúpico (LA) foi detectado por ensaios de coagulação em plasma livre de plaquetas obtido por dupla centrifugação, seguindo as recomendações do subcomitê em LA do Comitê Científico de Padronização da Sociedade Internacional de Trombose e Homeostase (Brandt, 1995).

5.4.2.4 Atividade da doença

A atividade da doença foi avaliada pelo *Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index* (SLEDAI) (Bombardier, 1992) na data de inclusão do estudo. O SLEDAI consiste em 24 itens e a pontuação pode variar de 0 a 105 pontos. O LES foi considerado ativo se a pontuação foi maior ou igual a 3 (Yee, 2011).

5.4.2.5 Dano cumulativo da doença

O dano cumulativo da doença foi avaliado pelo *Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology – Damage Index* (SLICC/ACR-DI; SDI) (Gladman, 1997) na data de inclusão do estudo. O SDI consiste em 38 itens e a pontuação pode variar de 0 a 47 pontos. Foi considerada a presença de dano se a pontuação apresentou-se igual ou maior que 1.

5.4.2.6 Tratamento

Para avaliar se a presença dos anticorpos anti-P ribossomal e os níveis da proteína S100 β são influenciados pela medicação em uso, foram analisadas as

medicações na data da inclusão do estudo. As medicações consideradas foram prednisona (presença ou ausência e dose diária), hidroxiquina (presença ou ausência e dose diária) e outras drogas imunossupressoras [azatioprina, ciclofosfamida, ciclosporina, metotrexato e micofenolato sódico ou mofetil (presença ou ausência e dose diária)].

5.5 Investigação laboratorial

Foram coletados 10 ml de sangue periférico de cada participante da pesquisa na data da inclusão do estudo. Estas amostras permaneceram 30 minutos em temperatura ambiente até coagular, sendo em seguida centrifugadas a 3000 rpm por 15 minutos. Após centrifugação, o soro foi imediatamente separado do precipitado de células vermelhas e aliquoteado em tubos de Eppendorf, que foram armazenados em freezer -80° C para posterior análise por técnica de ELISA.

5.5.1 Técnica de ELISA

ELISA é um teste imunoenzimático que permite a detecção de anticorpos específicos no plasma sanguíneo. O método utilizado para realizar o teste se baseia na interação anticorpo-antígeno.

5.5.1.1 Lavagem e incubação

Primeiramente todos os reagentes e amostras foram homogeneizados em temperatura ambiente (20-26°C). A solução de lavagem *Horseradish Peroxidase* (HRP) foi diluída em 1:40, adicionando o conteúdo do frasco de solução de lavagem HRP a 975ml de água destilada ou deionizada. A amostra de cada paciente foi diluída em 1:100, misturando 5 microlitros de amostra para 500 microlitros do diluente das amostras HRP.

Foram adicionados à placa 100 microlitros de Positivo Baixo, Positivo Alto, Controle Negativo ELISA pré-diluídos, e as amostras diluídas aos respectivos micropoços da placa. Em seguida, a placa foi incubada durante 30 minutos em temperatura ambiente, em uma superfície nivelada.

Para a lavagem, os conteúdos de cada cavidade foram aspirados completamente e adicionados 200-300 microlitros de solução de lavagem HRP a todos os poços, seguida por uma nova aspiração. Este procedimento foi repetido mais duas vezes, totalizando um total de três lavagens. Depois da última lavagem, a placa foi invertida e colocada sobre um papel absorvente para retirar qualquer líquido residual. Após, foram adicionados 100 microlitros do conjugado IgG HRP em cada micropoço da placa permanecendo incubada por 30 min. A lavagem se repetiu depois da incubação e 100 microlitros do Cromógeno tetrametilbenzina (TMB) foi adicionado em cada micropoço. A placa foi incubada por 30 minutos no escuro em temperatura ambiente.

Ao término da incubação foram adicionados 100 microlitros de solução de parada HRP em cada micropoço.

A leitura de absorbância (DO) de cada poço foi feita a 450nm em até 1 hora após a última incubação.

5.5.1.2 Controle de qualidade

O Positivo Baixo ELISA, Positivo Alto ELISA e o Controle Negativo ELISA pré-diluídos foram introduzidos em todos os ensaios, servindo de padrão para análise das DO.

Para que os resultados dos testes realizados fossem considerados válidos, todos os critérios listados abaixo deveriam ser cumpridos:

1. A absorvância do Positivo Alto ELISA pré-diluído teve que ser maior que a absorvância do Positivo Baixo ELISA pré-diluído, que por sua vez teve que ser maior que a absorvância do Controle Negativo ELISA.
2. O Positivo Alto ELISA pré-diluído para os diferentes anticorpos pesquisados teve que apresentar uma absorvância maior que 1,0, enquanto que a absorvância do Controle Negativo ELISA não poderia ultrapassar 0,2.
3. O Positivo Baixo ELISA deveria ter absorvância duas vezes maior que o Controle Negativo ELISA e/ou ter oscilado entre 0,25 e 0,6 unidades de DO.

O Controle Negativo ELISA e o Positivo Alto ELISA serviram para monitorar falhas substanciais nos reagentes.

5.6 Análise Estatística

Para as variáveis categóricas, as diferentes frequências foram analisadas pelo teste de Qui-Quadrado. A correção de Yates e o teste exato de Fischer foram utilizados quando necessário.

As variáveis numéricas foram avaliadas pelo teste de Kolmogorov-Smirnov para determinar a normalidade. Para variáveis de distribuição normal foi utilizado o teste T. Para as variáveis não-normais foram utilizados o teste de Kruskal-Wallis (seguido do teste de Dunn) e teste Mann-Whitney.

Resultados foram considerados estatisticamente significativos se o valor de $p < 0,05$.

6. Resultados

6.1 Capítulo 1: Prevalência e importância clínica dos anticorpos anti-P ribossomal no LESJ.

6.1.1 Dados demográficos

Foram incluídos 50 pacientes consecutivos com LESJ (47 [94,3%] mulheres) com média de idade de 16,82 anos [Desvio padrão (DP) \pm 3,46 anos; variação 10-20 anos]. O tempo médio de doença foi de 4,23 anos (DP \pm 6,28; variação 0-11 anos). Foram incluídos 35 (31 [88,57%] mulheres) familiares de primeiro grau com média de idade de 38,73 anos [DP \pm 3,89 anos; variação 15-48 anos]. O grupo controle foi composto por 20 (18 [90%] mulheres) indivíduos saudáveis com média de idade de 18,3 anos (DP \pm 4,97 anos; variação 12-26 anos). Os pacientes e controles foram pareados por idade e sexo. Familiares de primeiro grau eram significativamente mais velhos conforme esperado ($p < 0,05$).

6.1.2 Características clínicas, laboratoriais e tratamento

A média de idade no início da doença foi de 12,17 anos (DP \pm 3,09; variação 4-15 anos) (Tabela 2). No início do estudo, 24 (48%) pacientes com LESJ apresentavam doença ativa com pontuação média de SLEDAI de 8,37 (DP \pm 3,80, variação 4-18). Os demais 26 (52%) pacientes estavam em remissão com pontuação média de SLEDAI de 0,39 (DP \pm 0,80, variação 0-2). O dano cumulativo da doença ($SDI \geq 1$) foi observado em 15 (30%) pacientes. As manifestações clínicas e laboratoriais estão resumidas nas tabelas 3 e 4.

Tabela 2. LESJ: Dados demográficos de acordo com a presença do anticorpo anti-P ribossomal.

Dados Demográficos	Anti-P+	Anti-P –
	N=13	N=37
Idade de início da doença (média ± desvio padrão)	13,1 (2,7)	12,1 (2,8)
Idade na data da coleta (média ± desvio padrão)	17,2 (4,8)	17,7 (3,4)
Tempo de doença (média ± desvio padrão)	4,7 (3,9)	2,5 (2,3)
Relação mulher/homem	12/1	35/2

Tabela 3. LESJ: Manifestações clínicas, atividade da doença e dano cumulativo de acordo com a presença do anticorpo anti-P ribossomal.

Variáveis	Anti-P+	Anti-P –
	N=13	N=37
Manifestações Clínicas		
Artrite	2 (15,4%)	2 (5,4%)
Alopécia	1 (7,7%)	2 (5,4%)
Rash Malar	2 (15,4%)	2 (5,4%)
Nefrite	2 (15,4%)	10 (27,0%)
Serosite	2 (15,4%)	1 (2,7%)
Vasculite	1 (7,7%)	2 (5,4%)
SLEDAI ≥ 3	7 (53,8%)	17 (45,9%)

SDI \geq 1	6 (46,2%)	9 (24,3%)
--------------------------------	-----------	-----------

Tabela 4. LESJ: Manifestações laboratoriais de acordo com a presença do anticorpo anti-P ribossomal.

Manifestações Laboratoriais	Anti-P+ N=13	Anti-P – N=37
Anticardiolipina ou LA	7 (53,8%)	24 (64,9%)
Anti-Sm	4 (30,8%)	9 (24,3%)
Anti-SSA/Ro	3 (23,0%)	13 (35,1%)
Anti-DNA	2 (15,4%)	4 (10,8%)
Leucopenia	1 (7,7%)	1 (2,7%)
Plaquetopenia	1 (7,7%)	1 (2,7%)

As manifestações neuropsiquiátricas foram observadas em 30 (60%) dos pacientes. Vinte e sete (54%) pacientes apresentaram distúrbio cognitivo, 3 (6%) cefaléia, 1 (2%) crise convulsiva e 1 (2%) distúrbios de movimentos (coréia). Depressão foi diagnosticada em 7 (14,6%) pacientes e em nenhum dos familiares de primeiro grau ou controle. Depressão leve foi identificada em 5 dos 7 pacientes e depressão moderada/severa em 2 dos 7 pacientes com depressão. Ansiedade foi observada em 17 (34%) dos pacientes, em nenhum dos familiares e em 8 controles. Ansiedade leve foi identificada em 9 de 17 pacientes e ansiedade moderada/severa em 8 de 17 pacientes com ansiedade (Tabela 5).

Tabela 5. LESJ: Manifestações neuropsiquiátricas de acordo com a presença do anticorpo anti-P ribossomal.

Manifestações Neuropsiquiátricas	Anti-P+ N=13	Anti-P – N=37
Ansiedade	10 (76,9%)*	7 (18,9%)
Distúrbio Cognitivo	6 (66,7%)	21 (58,3%)
Depressão	3 (23,1%)	4 (10,8%)
Convulsão	1 (7,7%)	0
Coréia	1 (7,7%)	0
Psicose	0	0

*p<0,05

Na inclusão do estudo, 7 (14%) pacientes não estavam em uso de qualquer medicação imunossupressora. Quarenta e três (86%) pacientes estavam em uso de prednisona, 34 (68%) em uso de hidroxicloroquina e 24 (48%) em uso de outras drogas imunossupressoras (Tabela 6).

Tabela 6. LESJ: Imunossuppressores em uso de acordo com a presença do anticorpo anti-P ribossomal.

Imunossuppressores	Anti-P+ N=13	Anti-P – N=37
Sem medicação	1 (7,7%)	6 (16,2%)
Prednisona	10 (76,9%)	33 (89,2%)
Hidroxicloroquina	7 (53,8%)	27 (72,9%)
Outras drogas imunossupressoras	5 (38,5%)	21 (56,7%)
Azatioprina	3 (23,0%)	14 (37,8%)
Ciclofosfamida	0	0
Ciclosporina	0	3 (8,1%)
Metotrexato	0	1 (2,7%)
Micotenolato (mofetil ou sódico)	2 (15,4%)	3 (8,1%)

6.1.3 Prevalência e relevância clínica dos anticorpos anti-P ribossomal

Os anticorpos anti-P ribossomal foram observados em 13 (26%) pacientes e em nenhum familiar ou controle.

Os anticorpos anti-P ribossomal foram mais frequentemente observados em pacientes com ansiedade ($p=0.002$). Nenhuma outra característica clínica, laboratorial, ou de tratamento foi associada com a presença de anticorpos anti-P ribossomal.

6.2 Capítulo 2: Níveis elevados de S100 β estão associados com a presença de distúrbio cognitivo no LESJ.

6.2.1 Dados demográficos

Foram incluídos 42 pacientes consecutivos com LESJ (40 [95,2%] mulheres) com média de idade de 16,56 anos (DP \pm 3,68 anos; variação 9-29 anos). Dos 50 pacientes incluídos no estudo inicial da tese, 8 foram excluídos devido a problemas com a placa de ELISA na dosagem da proteína S100 β . O tempo médio de doença foi de 4,18 anos (DP \pm 3,6 anos; variação 0-12 anos). O grupo controle foi composto por 20 (16 [80%] mulheres) indivíduos saudáveis com média de idade de 19,9 anos (DP \pm 5,31 anos; variação 6-30 anos). Os pacientes e controles foram pareados por idade e sexo.

6.2.2 Características clínicas, laboratoriais e de tratamento

A média de idade dos pacientes no início da doença foi de 12,1 (DP=3,36 anos; variação 4-16 anos). No início do estudo, 18 (42,85%) dos pacientes com LESJ apresentavam doença ativa com pontuação média de SLEDAI de 9,1 (DP \pm 3,73, variação 4-18). Os demais 23 (54,77%) pacientes estavam em remissão com pontuação média de SLEDAI de 0,5 (DP \pm 0,88; variação 0-2). O dano cumulativo da doença foi observado em 19 (45,23%) pacientes que apresentavam SDI \geq 1 (Tabela 7).

Manifestações clínicas e laboratoriais são apresentadas nas tabelas 8,9 e 10.

Tabela 7. LESJ: Níveis de proteína S100 β em relação à presença de atividade da doença e ao dano cumulativo.

Atividade /Dano	Mediana	IQR	P
SLEDAI			0,10
≥ 3 (N=18)	34,91	41,54	
< 3 (N=24)	18,52	23,54	
SDI			0,07
≥ 1 (N=19)	23,58	33,16	
< 1 (N=23)	24,57	18,93	

Tabela 8. LESJ: Níveis de proteína S100 β em relação às manifestações clínicas.

Manifestações Clínicas	Mediana	IQR	P
Rash Malar			0,14
Sim (N=3)	63,86	28,39	
Não (N=39)	23,58	30,24	
Nefrite			0,90
Sim (N=11)	37,72	33,16	
Não (N=31)	26,15	23,54	
Vasculite			0,22
Sim (N=2)	48,82	31,70	
Não (N=40)	24,23	30,24	

Tabela 9. LESJ: Níveis de proteína S100 β em relação às manifestações laboratoriais.

Manifestações Laboratoriais	Mediana	IQR	P
Hematuria			0,81
Sim (N=6)	28,95	62,50	
Não (n=36)	23,90	29,98	
Proteinuria			0,71
Sim (N=8)	25,39	47,03	
Não (N=34)	24,57	27,83	
Leucocituria			0,67
Sim (N=8)	22,59	58,08	
Não (N=34)	24,57	28,39	
Plaquetopenia			0,16
Sim (N=1)	33,79	35,76	
Não (N=41)	24,23	30,24	
Hipocomplementemia			0,95
Sim (N=12)	21,63	34,00	
Não(N= 30)	27,64	34,10	

Tabela 10. LESJ: Níveis de proteína S100 β em relação aos autoanticorpos.

Manifestações Laboratoriais (autoanticorpos)	Mediana	IQR	P
Anticorpos anti-dsDNA			0,48
Sim (N=5)	26,15	24,02	
Não(N=37)	23,58	35,76	
Anticorpos anti-P ribossomal			0,90
Sim (N=10)	28,68	33,16	
Não (N=32)	27,64	23,54	

As manifestações neuropsiquiátricas foram observadas em 26 (61,9%) pacientes. Vinte e um (50%) pacientes apresentavam distúrbio cognitivo, 3 (7,14%) cefaléia e 1 (2,38%) distúrbios de movimentos (coréia); 1 controle apresentava distúrbio cognitivo (5%) (p=0,13). Depressão foi diagnosticada em 4 (9,52%) pacientes e em nenhum controle. Todos os pacientes apresentaram depressão leve. Ansiedade foi observada em 16 (38,1%) pacientes e em 8 (40%) controles (p=0,21). Ansiedade leve foi identificada em 10 de 16 pacientes e ansiedade moderada/severa em 6 de 16 pacientes com ansiedade (Tabela 11). Todos os controles apresentaram ansiedade leve.

Tabela 11. LESJ: Níveis de proteína S100 β em relação às manifestações neuropsiquiátricas.

Manifestações Neuropsiquiátricas	Mediana	IQR	P
NPLES			0,10
Sim (N=30)	35,75	35,24	
Não (N=12)	23,58	23,74	
Ansiedade			0,43
Sim (N=16)	20,94	37,20	
Não (N=26)	24,92	23,96	
Depressão			0,29
Sim (N=4)	27,99	26,88	
Não (N=38)	24,25	34,57	
Distúrbio Cognitivo			0,01*
Sim (N=21)	38,08	31,3	
Não (N=21)	16,12	17,20	
Cefaléia			0,52
Sim (N=3)	38,08	34,57	
Não (N=39)	24,23	31,7	

*p<0,05

Na inclusão do estudo, 6 (14,28%) pacientes não estavam em uso de qualquer medicação imunossupressora. Trinta e dois (76,19%) pacientes estavam em uso de

prednisona, 24 (57,14%) em uso de hidroxicloroquina e 17 (40,47%) em uso de outras drogas imunossupressoras (Tabela 12).

Tabela 12. LESJ: Níveis de proteína S100 β em relação ao tratamento.

Tratamento	Mediana	IQR	P
Medicação			0,35
Sim (N=36)	24,57	35,87	
Não (N=6)	23,40	24,42	
Prednisona			0,35
Sim (N=32)	24,57	35,87	
Não (N=10)	23,40	24,42	
Hidroxicloroquina			0,74
Sim (N=24)	24,25	39,38	
Não (N=18)	26,68	27,87	
Outras drogas imunossupressoras			0,15
Sim (N=17)	37,72	40,86	
Não (N=25)	21,48	26,36	

6.2.3 Relevância clínica da proteína S100 β

Pacientes com LESJ apresentaram níveis mais elevados de proteína S100 β quando comparados aos controles, porém esta diferença não foi estatisticamente significativa. Pacientes com manifestações NP também apresentaram níveis mais

elevados de proteína S100 β quando comparado aos pacientes sem manifestações NP, porém esta diferença não foi estatisticamente significativa.

Observamos que os níveis da proteína S100 β foram significativamente mais elevados em pacientes com distúrbio cognitivo (mediana = 38,08) quando comparados aos pacientes sem distúrbio cognitivo (mediana = 16,12; p=0,011) e quando comparados ao grupo controle (mediana = 19,38; p=0,001).

7. Discussão

Os anticorpos anti-P ribossomal são autoanticorpos que têm sido associados a manifestações NP no LES (Bonfa, 1986; Bonfa, 1987; Nojima, 1992; Press, 1996; Chan, 1998; Isshi, 1998; Kao, 1999; Tzioufas, 2000; Mahler, 2006; Hirohata, 2007; Shoenfeld, 2007; Abdel-Nasser, 2008; Hanly, 2008; Briani, 2009; Olesinska, 2010; Hanly, 2011). Uma vez ligado à superfície celular aumenta o influxo de cálcio levando a apoptose neuronal (Koren, 1992; Koscec, 1997; Sun, 2001; Reichlin, 2003; Mahler, 2003; Strous, 2006; Katzav, 2007; Matus, 2007; Moscovitch, 2009). A proteína S100 β , por outro lado está associada ao acometimento neuronal, não como agente causador, mas sim como sinalizador de disfunção do SNC (Portela, 2002; Schenatto, 2006; Yang, 2008). O fato que a proteína S100 β indica a presença de lesão neuronal causada pelos anticorpos anti-P ribossomal justifica a investigação concomitante dos anticorpos anti-P ribossomal e da proteína S100 β .

7.1 Anticorpos anti-P ribossomal

Embora descritos há mais de 25 anos, os anticorpos anti-P ribossomal não são rotineiramente dosados em pacientes com LES e não há consenso quanto à sua correlação com quadro clínico e quanto ao seu papel na patogênese de LES (Elkon, 1985; Caponi, 1995; Conti, 2004; Nery, 2007; Fragoso-Loyo, 2008). Estes anticorpos não são exclusivos do LES, tendo sido já descritos em esclerose sistêmica, síndrome de Sjogren e dermatomiosite (Muro, 2009), estando também presentes no soro de indivíduos saudáveis em estudos clínicos (Press, 1996; Agmon-Levin, 2009; Moscovitch, 2009) e laboratoriais (Stafford, 1995; Anderson, 1998; Pan, 1998).

As discrepâncias nas frequências de anticorpos anti-P ribossomal relatadas no LES podem estar associadas a fatores genéticos e ambientais (Sato, 1991; Nojima, 1992; Teh, 1993; Teh, 1994; Arnett, 1996; Reichlin, 1999; Gerli, 2002; Mahler, 2006).

Existem apenas três estudos que analisaram a prevalência de anticorpos anti-P ribossomal no LESJ (Press, 1996; Reichlin, 1999; Hoffman, 2009). Em dois deles, a presença de anticorpos anti-P ribossomal variou durante o curso da doença (Press, 1996; Reichlin, 1999), no entanto as prevalências relatadas (20%, 42% e 25% respectivamente) foram semelhantes aos 26% encontrados em nosso estudo.

O primeiro estudo, publicado em 1996, relatou uma prevalência de anticorpos anti-P ribossomal de 20%. Observou-se também que níveis séricos elevados de anticorpos anti-P ribossomal diferenciaram psicose associada ao LES e psicose primária na infância; no entanto, os anticorpos anti-P ribossomal não foram específicos para psicose no LESJ (Press, 1996). Cinco crianças foram avaliadas longitudinalmente, sendo observado que a resolução de psicose esteve associada com a queda dos títulos dos anticorpos anti-P ribossomal (Press, 1996). No grupo controle foi observada uma prevalência de 3,3% dos anticorpos anti-P ribossomal (Press, 1996).

No segundo estudo, a prevalência de anticorpos anti-P ribossomal foi de 42% no LESJ, significativamente maior quando comparado a um grupo de pacientes adultos com LES (Reichlin, 1999). Além disso, os níveis de anticorpos anti-P ribossomal diminuíram de acordo com a remissão da atividade da doença e redução de anticorpos anti-dsDNA (Reichlin, 1999). A presença simultânea de anticorpos anti-P ribossomal e anticorpos anti-dsDNA esteve fortemente associada à presença de nefrite neste estudo (Reichlin, 1999).

O terceiro estudo observou uma prevalência de anticorpos anti-P ribossomal de 25%, significativamente maior quando comparado a um grupo de pacientes adultos com

LES (Hoffman, 2009). Os anticorpos anti-P ribossomal foram associados à proteinúria, cilindros celulares no exame de urina e inversamente associados à presença de glomerulonefrite (Hoffman, 2009).

Observamos que anticorpos anti-P ribossomal foram mais frequentes em pacientes com ansiedade quando comparados a pacientes sem ansiedade ($p < 0,05$). Nenhuma outra característica clínica e/ou laboratorial esteve associada com anticorpos anti-P ribossomal no grupo estudado. Embora a prevalência global de manifestações neuropsiquiátricas tenha sido semelhante aos relatos anteriores (Bonfa, 1986; Bonfa, 1987; Nojima, 1992; Press, 1996; Chan, 1998; Isshi, 1998; Kao, 1999; Tzioufas, 2000; Lee, 2001; Mahler, 2006; Hirohata, 2007; Shoenfeld, 2007; Abdel-Nasser, 2008; Hanly, 2008; Briani, 2009; Olesinska, 2010; Hanly, 2011), a presença de manifestações neuropsiquiátricas analisadas individualmente, exceto de comprometimento cognitivo e de distúrbios do humor, foi menor no momento da avaliação. Uma vez que trabalhos anteriores mostraram que os títulos dos anticorpos anti-P ribossomal podem variar de acordo com o curso da doença (Bonfa, 1987; Press, 1996; Chindalore, 1998; Reichlin, 1999; Frampton, 2000; Sugisaki, 2002; Agmon-Levin, 2009; Mahler, 2010), não incluímos manifestações neuropsiquiátricas cumulativas como uma variável neste estudo.

O envolvimento do sistema nervoso central (SNC) ainda é difícil de ser avaliado no LESJ e pode levar a significativa morbidade em crianças (Carreno, 1999; Muscal, 2010). As estimativas da prevalência do LES neuropsiquiátrico em crianças têm variado de 22% a 95% (Yancey, 1981; Steinlin, 1995; Loh, 2000; Sibbit, 2002; Olfat, 2004; Harel, 2006; Yu, 2006; Brunner, 2007; Hiraki, 2008; Muscal, 2009; Muscal, 2010; Levy, 2009). Estudos têm demonstrado presença elevada de ansiedade (Sibbit, 2002; Hiraki, 2008) a qual foi semelhante aos achados em nosso estudo. No

entanto nenhum dos estudos avaliou a associação de anticorpos anti-P ribossomal e transtornos de humor em crianças (Press, 1996; Reichlin, 1999; Hoffman, 2009).

A associação de anticorpos anti-P ribossomal e manifestações neuropsiquiátricas no LES ainda é controversa (Derksen, 1990; Teh, 1992; Van Dam, 1991; Gerli, 2002; Conti, 2004; Nery, 2007; Fragoso-Loyo, 2008; Haddouk, 2009). Diferentes técnicas de dosagem e intervalos de tempo diferentes entre as manifestações e a dosagem dos anticorpos podem explicar algumas das discrepâncias relatadas (Agmon-Levin, 2009). Ao contrário das dosagens de anticorpos anti-P ribossomal a partir do soro, dosagens a partir do LCR parecem ser mais específicas (Hirohata, 2007; Yoshio, 2005).

A patogênese dos anticorpos anti-P ribossomal no SNC foi avaliada a partir da injeção intraventricular destes anticorpos em camundongos (Katzav, 2007). Os animais desenvolveram comportamento depressivo, porém, sem indícios de distúrbios motores, cognitivos ou déficits de coordenação (Katzav, 2007). A análise histológica do cérebro dos animais demonstrou a presença de anticorpos anti-P ribossomal em regiões que fazem parte do sistema límbico e estão associadas com o equilíbrio do humor (Strous, 2006; Katzav, 2007). O papel direto dos anticorpos anti-P ribossomal na indução de depressão foi reforçado pela reversão dos efeitos quando os camundongos foram tratados com anticorpos monoclonais específicos anti-idiotípicos e terapia antidepressiva de longo prazo (Blank, 2007). Estudos posteriores demonstraram que os anticorpos anti-P ribossomal estão associados a um aumento do influxo de cálcio e da ativação de caspase-3, levando a apoptose neuronal (Matus, 2007).

Embora não encontramos uma associação entre a presença de anticorpos anti-P ribossomal com depressão e/ou déficit cognitivo, indicando o envolvimento do hipocampo, nós encontramos uma associação com a ansiedade, o que sugere o envolvimento da amígdala.

Não encontramos anticorpos anti-P ribossomal em nosso grupo controle, porém é importante ressaltar que anticorpos anti-P ribossomal estão presentes na população saudável (Moscaitch, 2009).

Concluindo, encontramos uma prevalência de 26% de anticorpos anti-P ribossomal no LESJ e uma associação da presença de anticorpos anti-P ribossomal com ansiedade, sugerindo o acometimento da amígdala. Estudos de neuroimagem serão necessários para confirmar estes achados.

7.2 Proteína S100 β

Estudos anteriores demonstraram níveis séricos elevados da proteína S100 β em pacientes com LES, com manifestações NP, quando comparados aos pacientes sem manifestações NP, ou comparados com indivíduos saudáveis (Schenatto, 2006; Yang, 2008; Portela, 2002). Nosso estudo demonstrou níveis séricos elevados da proteína S100 β em pacientes quando comparados ao grupo controle, mas essa diferença não foi estatisticamente significativa. Foram observados também níveis séricos elevados de proteína S100 β em pacientes com manifestações NP, em relação aos pacientes sem manifestações NP; porém, esta diferença entre os grupos não foi estatisticamente significativa.

Níveis elevados de proteína S100 β têm sido associados a manifestações NP no LES como síndrome orgânica cerebral, convulsão, acidente vascular cerebral e psicose (Yang, 2008). Observamos elevados níveis séricos da proteína S100 β em pacientes com LES que apresentavam distúrbio cognitivo quando comparados a pacientes sem distúrbio cognitivo e ao grupo controle. Nenhuma outra manifestação NP esteve associada com os níveis séricos da proteína S100 β .

Em estudo conduzido por Portela e colaboradores, pacientes com LES em atividade e manifestações neuropsiquiátricas presentes apresentaram níveis elevados da proteína S100 β em relação aos pacientes com LES em atividade sem manifestações neuropsiquiátricas ou pacientes com doença inativa (Portela, 2002). Apesar dos pacientes com doença em atividade apresentarem níveis séricos elevados de proteína S100 β , esta diferença não foi significativa em nosso estudo.

Os níveis de proteína S100 β têm sido associados à presença de anticorpos anti-dsDNA positivos (Schenatto, 2006). No nosso trabalho não observamos associação entre manifestações laboratoriais ou imunológicas com os níveis séricos da proteína S100 β .

Embora não encontramos associação entre a presença de manifestações NP e a proteína S100 β , observamos níveis mais elevados de proteína S100 β em pacientes com distúrbio cognitivo. Estudos de neuroimagem são necessários para determinar se a proteína S100 β está associada à presença de atrofia cerebral difusa e/ou localizada.

8. Conclusões

8.1 A prevalência dos anticorpos anti-P ribossomal no LESJ foi de 26%, não sendo encontrados em familiares de primeiro grau ou indivíduos controle.

8.2 Os anticorpos anti-P ribossomal estiveram associados com a presença de ansiedade.

8.3 Os níveis da proteína S100 β foram similares entre pacientes e o grupo controle.

8.4 Níveis elevados da proteína S100 β foram associados à presença de distúrbio cognitivo em pacientes com LESJ.

9. Referências Bibliográficas

Abdel-Nasser AM, Ghaleb RM, Mahmoud JA, Khairy W, Mahmoud RM. Association of anti-ribosomal P protein antibodies with neuropsychiatric and other manifestations of systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol*. 2008; 27:1377-1385.

Abraha HD, Butterworth RJ, Bath PM, Wassif WS, Garthwaite J, Sherwood RA. Serum S-100 protein, relationship to clinical outcome in acute stroke. *Ann Clin Biochem*. 1997; 34:366 –70.

Afeltra, A; Garzia, P; Mitterhofer, AP; et al. Neuropsychiatric lupus syndromes, relationship with antiphospholipid antibodies. *Neurology*. 2003; 61:108-10.

Agmon-Levin N, Gilburd B, Kivity S, Katz BS, Flitman-Katzevman I, Shoenfeld N, et al. Anti-ribosomal-P antibodies in lupus patients and healthy controls: evaluation of three ELISA assays. *Isr Med Assoc J*. 2009; 11:403-6.

Ainiala H, Hietaharju A, Dastidar P, Loukkola J, Lehtimäki T, Peltola J, et al. Increased serum matrix metalloproteinase 9 levels in systemic lupus erythematosus patients with neuropsychiatric manifestations and brain magnetic resonance imaging abnormalities. *Arthritis and Rheum*. 2004; 50:858-65.

Ainiala H, Hietaharju A, Loukkola J, Peltola J, Korpela M, Metsänoja R, et al. Validity of the new American College of Rheumatology criteria for neuropsychiatric lupus syndromes: a population-based evaluation. *Arthritis Rheum.* 2001; 45:419-23.

Alarcon GS. Of ethnicity race and lupus. *Lupus.* 2001; 10:594-596.

Alchieri JC, Noronha APP, Primi R. Guia de referência: testes psicológicos comercializados no Brasil. Editora Casa do Psicólogo, 2003; 218 páginas ISBN: 85-7396-243-7.

Allore RJ, Friend WC, O'Hanlon D, Neilson KM et al. Cloning and expression of the human S100B gene. *J Biol Chem.* 1990; 266:15537–15543

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

Anderson CJ, Neas BR, Pan Z, Taylor-Albert E, Reichlin M, Stafford HA. The presence of masked antiribosomal P autoantibodies in healthy children. *Arthritis Rheum.* 1998; 41:33-40.

Appenzeller S, Vasconcelos Faria A, Li LM, Costallat LT, Cendes F. Quantitative magnetic resonance imaging analyses and clinical significance of hyperintense white matter lesions in systemic lupus erythematosus patients. *Ann Neurol.* 2008; 64:635-43.

Appenzeller S, Zeller CB, Annichino-Bizzachi JM, Costallat LT, Deus-Silva L, Voetsch B, et al. Cerebral venous thrombosis: influence of risk factors and imaging findings on prognosis. *Clinical Neurol and Neurourg*. 2005; 107:371-378.

Arinuma Y, Yanagida T, Hirohata S. Association of cerebrospinal fluid anti-NR2 glutamate receptor antibodies with diffuse neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2008; 58:1130-5.

Arnett FC, Reveille JD, Moutsopoulos HM, Georgescu L, Elkon KB. Ribosomal P autoantibodies in systemic lupus erythematosus. Frequencies in different ethnic groups and clinical and immunogenetic associations. *Arthritis Rheum*. 1996; 39:1833-1839.

Baigent C, Burbury K, Wheeler D. Premature cardiovascular disease in chronic renal failure. *Lancet*. 2000; 356(9224):147-52.

Beck AT, Epstein N, Brown G, Steer RA. An inventory for measuring clinical anxiety: psychometric properties. *J Consult Clin Psychol*. 1988; 56:893-897

Beck AT, Ward CH, Mendelsohn M, Mock J, Erbaugh J. An inventory for measuring depression. *Arch Gen Psychiatry*. 1961; 4:53-63.

Bianchi R, Giambanco I, Donato R. S-100 protein, but not calmodulin, binds to the glial fibrillary acidic protein and inhibits its polymerization in a Ca(2+)-dependent manner. *J Biol Chem*. 1993; 268:12669–12674

Blank M, Beinglass I, Shoenfeld Y. The therapeutic potential of targeting anti-Ribosomal-P antibody in treating SLE patients with depression. *Expert Opin Biol Ther.* 2007; 7:1283-5.

Bombardier C, Gladman DD, Urowitz MB, Caron D, Chang CH. The Committee on Prognosis Studies in SLE. Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. *Arthritis Rheum.* 1992; 35:630–640.

Bonfa E, Elkon KB. Clinical and serological associations of the anti-ribosomal P protein antibody. *Arthritis Rheum.* 1986; 29:981–985.

Bonfa E, Golombek SJ, Kaufman LD, Skelly S, Weissbach H, Brot N, et al. Association between lupus psychosis and anti-ribosomal P protein antibodies. *N Engl J Med.* 1987; 317:265-271.

Borba EF, Bonfá E, Vinagre CG, Ramires JA, Maranhão RC. Chylomicron metabolism is markedly altered in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2000; 43:1033-40.

Borba EF, Santos RD, Bonfa E, Vinagre CG, Pileggi FJ, Cossermelli W, et al. Lipoprotein(a) levels in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 1994; 21:220-3.

Brandt JT, Barna LK, Triplett DA. Laboratory identification of lupus anticoagulants: results of the Second International Workshop for Identification of Lupus Anticoagulants. On behalf of the Subcommittee on Lupus Anticoagulants/Antiphospholipid Antibodies of the ISTH. *Thromb Haemost.* 1995; 74:1597-603.

Briani C, Lucchetta M, Ghirardello A, Toffanin E, Zampieri S, Ruggero S, et al. Neurolupus is associated with anti-ribosomal P protein antibodies: an inception cohort study. *J Autoimmun.* 2009; 32:79-84.

Bruce IN, Gladman DD, Urowitz MB. Premature atherosclerosis in systemic lupus erythematosus. *Rheum Dis Clin North Am.* 2000; 26:257-78.

Brunner HI, Ruth NM, German A, Nelson S, Passo MH, Roebuck-Spencer T, et al. Initial validation of the Pediatric Automated Neuropsychological Assessment Metrics for childhood-onset systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2007; 57:1174-82.

Buttner T, Weyers S, Postert T, Sprengelmeyer R, Kuhn W. S-100 protein: serum marker of focal brain damage after ischemic territorial MCA infarction. *Stroke.* 1997; 28:1961-5.

Caponi L, Pegoraro S, Di Bartolo V, Rovero P, Revoltella R, Bombardieri S. Anti-P protein antibodies in systemic lupus erythematosus: correlations with clinical and serological data. *J Immunol Methods.* 1995; 179:193-202.

Carreno L, López-Longo FJ, Monteagudo I, et al. Immunological and clinical differences between juvenile and adult onset of systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 1999; 8: 287–92.

Cervera R, Khamashta MA, Font J, Sebastiani GD, Gil A, Lavilla P, et al. Systemic lupus erythematosus: clinical and immunologic patterns of disease expression in a cohort of 1,000 patients. The European Working Party on Systemic Lupus Erythematosus. *Medicine (Baltimore)* 1993; 72:113–124.

Chahade WH, Sato EI, Moura JE Jr, Costallat LT, Andrade LE. Systemic lupus erythematosus in São Paulo/Brazil: a clinical and laboratory overview. *Lupus*. 1995; 4:100-3.

Chan EY, Ko OK, Lawton JW, Lau CS. The use of anti-ribosomal P antibodies in the diagnosis of cerebral lupus---superiority of western blotting over enzyme-linked immunosorbent assay. *Hong Kong Med J*. 1998; 4:145-150.

Chapman J, Cohen-Armon M, Shoenfeld Y, Korczyn AD. Antiphospholipid antibodies permeabilize and depolarize brain synaptoneurosome. *Lupus*, 1999; 8: 127- 133.

Chindalore V, Neas B, Reichlin M. The association between anti-ribosomal P antibodies and active nephritis in systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol Immunopathol*. 1998; 87:292-6.

Clark EC, Bailey AA. Neurological and psychiatric signs associated with systemic lupus erythematosus. *J Am Med Assoc.* 1956; 160:455-7.

Conti F, Alessandri C, Bompane D, Bombardieri M, Spinelli FR, Rusconi AC, et al. Autoantibody profile in systemic lupus erythematosus with psychiatric manifestations: a role for antiendothelial-cell Abs. *Arthritis Res Ther.* 2004; 6:366-72.

Costallat LTL, Coimbra AMV. Systemic lupus erythematosus: clinical and laboratory aspects related to age at disease onset. *Clin Exp Immunol.* 1994; 12:603-7.

Costallat LT, De Capitani EM, Zambon L. Pulmonary silicosis and systemic lupus erythematosus in men: a report of two cases. *Joint Bone Spine.* 2002; 69:68-71.

Costallat LT, de Oliveira RM, Santiago MB, Cossermelli W, Samara AM. Neuropsychiatric manifestations of systemic lupus erythematosus: the value of anticardiolipin, antigangliosides and antigalactocerebrosides antibodies. *Clin Rheumatol.* 1990; 9:489-97.

Cunha, JA Manual da versão em português das Escalas Beck. São Paulo: Casa do Psicólogo, 2001.

Daly D. Central nervous system in acute disseminate lupus erythematosus. *J Nerv Ment Dis.* 1945; 102:461-5.

DeGiorgio LA, Konstantinov KN, Lee SC, Hardin JA, Volpe BT, Diamond B. A subset of lupus anti-DNA antibodies cross-reacts with the NR2 glutamate receptor in systemic lupus erythematosus. *Nat Med.* 2001; 7:1189-93.

Derksen RH, van Dam AP, Gmelig Meyling FH, Bijlsma JW, Smeenk RJ. A prospective study on antiribosomal P proteins in two cases of familial lupus and recurrent psychosis. *Ann Rheum Dis.* 1990; 49:779-82.

Devinsky O, Petito CK, Alonso DR. Clinical and neuropathological findings in systemic lupus erythematosus, the role of vasculitis, heart emboli, and thrombotic thrombocytopenic purpura. *Ann Neurol.* 1988; 23:380-4.

Donato R. S100: a multigenic family of calciummodulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol.* 2001; 33:637– 68.

Dubois EL, Tuffanelli DL. Clinical manifestations of systemic lupus erythematosus. Computer analysis of 520 cases. *JAMA.* 1964; 190:104-11.

Eber T, Chapman J, Shoenfeld Y. Anti-ribosomal P-protein and its role in psychiatric manifestations of systemic lupus erythematosus: myth or reality? *Lupus.* 2005; 14:571-5.

Elkon K, Parnassa A, Foster C. Lupus autoantibodies target ribosomal P proteins. *J Exp Med.* 1985; 162:459–71.

Elkon K, Skelly S, Parnassa A, Moller W, Danho W, Weissbach H, et al. Identification and chemical synthesis of a ribosomal protein antigenic determinant in systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci.* 1986; 83:7419–7423.

Ellis SG, Verity MA. Central nervous system involvement in systemic lupus erythematosus: a review of neuropathologic findings in 57 cases, 1955--1977. *Semin Arthritis Rheum.* 1979; 8:212-21.

Elting JW, de Jager AE, Teelken AW, Schaaf MJ, Maurits NM, van der Naalt J, et al. Comparison of serum S-100 protein levels following stroke and traumatic brain injury. *J Neurol Sci.* 2000; 181:104–10.

Faber-Elmann A, Sthoeger Z, Tcherniack A, Dayan M, Mozes E. Activity of matrix metalloproteinase-9 is elevated in sera of patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol.* 2002; 127:393-8.

Feinglass EJ, Arnett FC, Dorsch CA, Zizic TM, Stevens MB. Neuropsychiatric manifestations of systemic lupus erythematosus: diagnosis, clinical spectrum, and relationship to other features of the disease. *Medicine, (Baltimore).* 1976; 55:323-39.

Feng JB, Ni JD, Yao X, Pan HF, Li XP, Xu JH, et al. Gender and age influence on clinical and laboratory features in Chinese patients with systemic lupus erythematosus: 1,790 cases. *Rheumatol Int.* 2010; 30:1017–23.

Fessel EJ. Systemic lupus erythematosus in the community. Incidence, prevalence, outcome, and first symptoms; the high prevalence in black women. *Arch Intern Med.* 1974; 134:1027-35.

Foerch C, Du Mesnil de Rochemont R, Singer O, Neumann-Haefelin T, Buchkremer M, Zanella FE, et al. S100B as a surrogate marker for successful clot lysis in hyperacute middle cerebral artery occlusion. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2003; 74:322–5.

Foerch C, Singer OC, Neumann-Haefelin T, du Mesnil de Rochemont R, Steinmetz H, Sitzer M. Evaluation of serum S100B as a surrogate marker for long-term outcome and infarct volume in acute middle cerebral artery infarction. *Arch Neurol.* 2005; 62:1130-4.

Font J, Cervera R, Espinosa G, Pallarés L, Ramos-Casals M, Jiménez S, et al. Systemic lupus erythematosus (SLE) in childhood: analysis of clinical and immunological findings in 34 patients and comparison with SLE characteristics in adults. *Ann Rheum Dis.* 1998; 57:456–9.

Fragoso-Loyo H, Cabiedes J, Atisha-Fregoso Y, Llorente L, Sánchez-Guerrero J. Utility of serum S100B protein for identification of central nervous system involvement in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 2010; 37:2280-5.

Fragoso-Loyo H, Cabiedes J, Orozco-Narváez A, Dávila-Maldonado L, Atisha-Fregoso Y, Diamond B, et al. Serum and cerebrospinal fluid autoantibodies in patients with neuropsychiatric lupus erythematosus. Implications for diagnosis and pathogenesis. *PLoS One.* 2008; 3:e3347.

Frampton G, Moriya S, Pearson JD, Isenberg DA, Ward FJ, Smith TA, et al. Identification of candidate endothelial cell autoantigens in systemic lupus erythematosus using a molecular cloning strategy: a role for ribosomal P protein P0 as an endothelial cell autoantigen. *Rheumatology (Oxford)*. 2000; 39:1114-20.

Ganor Y, Goldberg-Stern H, Lerman-Sagie T, Teichberg VI, Levite M. Autoimmune epilepsy: distinct subpopulations of epilepsy patients harbor serum autoantibodies to either glutamate/AMPA receptor GluR3, glutamate/NMDA receptor subunit NR2A or double-stranded DNA. *Epilepsy Res*. 2005; 65:11-22.

García-Valladares I, Atisha-Fregoso Y, Richaud-Patin Y, Jakez-Ocampo J, Soto-Vega E, Elías-López D, et al. Diminished expression of complement regulatory proteins (CD55 and CD59) in lymphocytes from systemic lupus erythematosus patients with lymphopenia. *Lupus*. 2006; 15:600-5.

George J, Afek A, Gilburd B, Harats D, Shoenfeld Y. Autoimmunity in atherosclerosis: lessons from experimental models. *Lupus*. 2000; 9:223-7.

Gerlach R, Demel G, König HG, Gross U, Prehn JH, Raabe A, et al. Active secretion of S100B from astrocytes during metabolic stress. *Neuroscience*. 2006; 141:1697–1701.

Gerli R, Caponi L, Tincani A, Scorza R, Sabbadini MG, Danieli MG, et al. Clinical and serological Associations of ribosomal P autoantibodies in systemic lupus erythematosus: prospective evaluation in a large cohort of Italian patients. *Rheumatology*. 2002; 41:1357-66.

Ghirardello A, Doria A, Zampieri S, Gerli R, Rapizzi E, Gambari PF. Anti-ribosomal P protein antibodies detected by immunoblotting in patients with connective tissue diseases: their specificity for SLE and association with IgG anticardiolipin antibodies. *Ann Rheum Dis*. 2000; 59:975-81.

Gladman DD, Urowitz MB, Goldsmith CH, Fortin P, Ginzler E, Gordon C, et al. The reliability of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology Damage Index in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1997; 40:809-13.

Gómez J, Suárez A, López P, Mozo L, Díaz JB, Gutiérrez C. Systemic lupus erythematosus in Asturias, Spain: clinical and serologic features. *Medicine (Baltimore)* 2006; 85:157-68.

Graham JW, Jan W. MRI and the brain in systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2003; 12:891-6.

Haddouk S, Marzouk S, Jallouli M, Fourati H, Frigui M, Hmida YB, et al. Clinical and Diagnostic value of ribosomal P autoantibodies in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology*. 2009; 48:953-7.

Hanly JG. Evaluation of patients with CNS involvement in SLE. *Baillieres Clin Rheumatol*. 1998; 12:415-31.

Hanly, JG. Neuropsychiatric lupus. *Curr Rheumatol Rep*. 2001; 3:205-12.

Hanly, JG. Neuropsychiatric lupus. *Rheum Dis Clin North Am*. 2005; 31:273-98.

Hanly JG, Harrison MJ. Management of neuropsychiatric lupus. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2005; 19:799-821.

Hanly JG, McCurdy G, Fougere L, Douglas JA, Thompson K. Neuropsychiatric events in systemic lupus erythematosus: attribution and clinical significance. *J Rheumatol*. 2004; 31: 2156-62.

Hanly JG, Urowitz MB, Siannis F, Farewell V, Gordon C, Bae SC, et al. Autoantibodies and neuropsychiatric events at the time of systemic lupus erythematosus diagnosis: results from an international inception cohort study. *Arthritis Rheum*. 2008; 58:843-53.

Hanly JG, Urowitz MB, Su L, Bae SC, Gordon C, Clarke A, et al. Autoantibodies as biomarkers for the prediction of neuropsychiatric events in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*. 2011; 70:1726-32.

Hanly JG, Walsh NM, Sangalang V. Brain pathology in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 1992; 19:732-41.

Harats D, George J, Levy Y, Khamashta MA, Hughes GR, Shoenfeld Y. Atheroma: links with antiphospholipid antibodies, Hughes syndrome and lupus. *QJM.* 1999; 92:57-9.

Harel L, Sandborg C, Lee T, von Scheven E. Neuropsychiatric manifestations in pediatric systemic lupus erythematosus and association with antiphospholipid antibodies. *J Rheumatol.* 2006; 33:1873-7.

Hashimoto H, Tsuda H, Hirano T, Takasaki Y, Matsumoto T, Hirose S. Differences in clinical and immunological findings of systemic lupus erythematosus related to age. *J Rheumatol.* 1987; 14:497-501.

Hiraki LT, Benseler SM, Tyrrell PN, Hebert D, Harvey E, Silverman ED. Clinical and laboratory characteristics and long-term outcomes of pediatric systemic lupus erythematosus: a longitudinal study. *J Pediatr.* 2008; 152:550-6.

Hirohata S, Arinuma Y, Takayama M, Yoshio T. Association of cerebrospinal fluid anti-ribosomal p protein antibodies with diffuse psychiatric/neuropsychological syndromes in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther.* 2007; 9:R44.

Hirohata S, Kanai Y, Mitsuo A, Tokano Y, Hashimoto H. NPSLE Research Subcommittee. Accuracy of cerebrospinal fluid IL-6 testing for diagnosis of lupus psychosis. A multicenter retrospective study. *Clin Rheumatol*. 2009; 28:1319-23.

Hirohata, S; Miyamoto, T. Elevated levels of interleukin-6 in cerebrospinal fluid from patients with systemic lupus erythematosus and central nervous system involvement. *Arthritis Rheum*. 1990; 33:644-9.

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

Hoffman IE, Lauwerys BR, De Keyser F, Huizinga TW, Isenberg D, Cebecauer L, et al. Juvenile-onset systemic lupus erythematosus: different clinical and serological pattern than adult-onset systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*. 2009; 68:412–5.

Hoffman IE, Peene I, Meheus L, Huizinga TW, Cebecauer L, Isenberg D, et al. Specific antinuclear antibodies are associated with clinical features in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*. 2004; 63:1155-8.

Huemer C, Huemer M, Dorner T, Falger J, Schacherl H, Bernecker M, et al. Incidence of pediatric rheumatic diseases in a regional population in Austria. *J Rheumatol* 2001; 28:2116–9.

Hopkinson ND, Doherty M, Powell RJ. Clinical features and race-specific incidence/prevalence rates of systemic lupus erythematosus in a geographically complete cohort of patients. *Ann Rheum Dis.* 1994; 53:675-80.

Huang JL, Yao TC, See LC. Prevalence of pediatric systemic lupus erythematosus and juvenile chronic arthritis in a Chinese population: a nation-wide prospective population-based study in Taiwan. *Clin Exp Rheumatol.* 2004; 22:776–80.

Hulsey M, Goldstein R, Scully L, Surbeck W, Reichlin M. Anti-ribosomal P antibodies in systemic lupus erythematosus: a case-control study correlating hepatic and renal disease. *Clin Immunol Immunopathol.* 1995; 74:252–6.

Isenberg DA. Autoantibodies: markers of disease or pathogenic? *Ann N Y Acad Sci.* 1997; 823:256-62.

Isshi K, Hirohata S. Differential roles of the anti-ribosomal P antibody and antineuronal antibody in the pathogenesis of central nervous system involvement in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1998; 41:1819–27.

Jara, LJ; Irigoyen, L; Ortiz, MJ; Zazueta, B; Bravo, G; Espinoza, LR. Prolactin and interleukin-6 in neuropsychiatric lupus erythematosus. *Clin Rheumatol.* 1998; 17:110-4.

Jauch EC, Lindsell C, Broderick J, Fagan SC, Tilley BC, Levine SR; NINDS rt-PA Stroke Study Group. Association of serial biochemical markers with acute ischemic stroke: the National Institute of Neurological Disorders and Stroke recombinant tissue plasminogen activator Stroke Study. *Stroke*. 2006; 37:2508–13.

Jennekens FG, Kater L. The central nervous system in systemic lupus erythematosus. Part 2. Pathogenetic mechanisms of clinical syndromes: a literature investigation. *Rheumatology (Oxford)*. 2002; 41:619-30.

Johnson AE, Gordon C, Palmer RG, Bacon PA. The prevalence and incidence of systemic lupus erythematosus in Birmingham, England. Relationship to ethnicity and country of birth. *Arthritis Rheum*. 1995; 38:551–8.

Johnson RT, Richardson EP. The neurological manifestations of systemic lupus erythematosus. *Medicine (Baltimore)*. 1968; 47:337-69.

Kaell AT, Shetty M, Lee BC, Lockshin MD. The diversity of neurologic events in systemic lupus erythematosus. Prospective clinical and computed tomographic classification of 82 events in 71 patients. *Arch Neurol*. 1986; 43:273-6.

Kao CH, Ho YJ, Lan JL, Changlai SP, Liao KK, Chieng PU. Discrepancy between regional cerebral flow and glucose metabolism of the brain in systemic lupus erythematosus patients with normal brain magnetic resonance imaging findings. *Arthritis Rheum*. 1999; 42:61-8.

Kanner AA, Marchi N, Fazio V, Mayberg MR, Koltz MT, Siomin V, et al. Serum S100beta: a noninvasive marker of blood-brain barrier function and brain lesions. *Cancer*. 2003; 97:2806– 13.

Karpiak SE, Graf L, Rapport MM. Antiserum to brain gangliosides produces recurrent epileptiform activity. *Science*. 1976; 194:735-7.

Kassan SS, Lockshin MD. Central nervous system lupus erythematosus. The need for classification. *Arthritis Rheum*. 1979; 22:1382-5.

Katzav A, Solodееv I, Brodsky O, Chapman J, Pick CG, Blank M, et al. Induction of autoimmune depression in mice by anti-ribosomal P antibodies via the limbic system. *Arthritis Rheum*. 2007; 56:938-48.

Klein-Gitelman M, Reiff A, Silverman ED. Systemic lupus erythematosus in childhood. *Rheum Dis Clin North Am*. 2002; 3:561-77.

Knight JA, Kaplan E. *The Handbook of Rey-Osterrieth Complex Figure Usage: clinical and research applications*. Psychological Assessment Resources, Lutz. 2003.

Kobiler D, Allweis C. The effect of antisynaptosomal plasma membrane antibodies on memory. *Brain Res*. 1976; 115:129-38.

Koren E, Reichlin MW, Koscec M, Fugate RD, Reichlin M. Autoantibodies to the ribosomal P proteins react with a plasma membrane-related target on human cells. *J Clin Invest.* 1992; 89:1236–41.

Koscec M, Koren E, Wolfson-Reichlin M, Fugate RD, Trieu E, Targoff IN, et al. Autoantibodies to ribosomal P proteins penetrate into live hepatocytes and cause cellular dysfunction in culture. *J Immunol.* 1997; 159:2033–41.

Kovacs M. The Children's Depression, Inventory (CDI). *Psychopharmacol Bull.* 1985; 21:95-8.

Kozora E, West SG, Maier SF, Filley CM, Arciniegas DB, Brown M, et al. Antibodies against N-methyl-D-aspartate receptors in patients with systemic lupus erythematosus without major neuropsychiatric syndromes. *J Neurol Sci.* 2010; 295:87-91.

Levy DM, Ardoin SP, Schanberg LE. Neurocognitive impairment in children and adolescents with systemic lupus erythematosus. *Nat Clin Pract Rheumatol.* 2009; 5:106-14.

Livingston B, Bonner A, Pope J. Differences in clinical manifestations between childhood-onset lupus and adult-onset lupus: a meta-analysis. *Lupus.* 2011 Sep 27. [Epub ahead of print]

Loh WF, Hussain IM, Soffiah A, Lim YN. Neurological manifestations of children with systemic lupus erythematosus. *Med J Malaysia.* 2000; 55:459-63.

Love, PE; Santoro, SA. Antiphospholipid antibodies: anticardiolipin and the lupus anticoagulant in systemic lupus erythematosus (SLE) and in non-SLE disorders. Prevalence and clinical significance. *Ann Intern Med.* 1990; 112:682-98.

Macedo PA, Borba EF, Viana Vdos S, Leon EP, Testagrossa Lde A, Barros RT, et al. Antibodies to ribosomal P proteins in lupus nephritis: a surrogate marker for a better renal survival? *Autoimmun Rev.* 2011; 10:126-30.

Machulda MM, Ivnik RJ, Smith GE, Ferman TJ, Boeve BF, Kopman D, Petersen RC, Tangalos EG. Mayo's Older Americans Normative Studies: Visual Form Discrimination and copy trial of the Rey-Osterrieth Complex Figure. *J Clin Exp Neuropsychol.* 2007; 29:377-84.

Mahler M, Agmon-Levin N, van Liempt M, Shoenfeld Y, Waka A, Hiepe F, et al. Multi-center evaluation of autoantibodies to the major ribosomal P C22 epitope. *Rheumatol Int.* 2010 Dec 8.

Mahler M, Kessenbrock K, Raats J, Williams R, Fritzler MJ, Blüthner M. Characterization of the human autoimmune response to the major C-terminal epitope of the ribosomal P proteins. *J Mol Med (Berl).* 2003; 81:194-204.

Mahler M, Kessenbrock K, Szmyrka M, Takasaki Y, Garcia-De La Torre I, Shoenfeld Y, et al. International multicenter evaluation of autoantibodies to ribosomal P proteins. *Clin Vaccine Immunol.* 2006; 13:77–83.

Marini R, Costallat LT. Young age at onset, renal involvement, and arterial hypertension are of adverse prognostic significance in juvenile systemic lupus erythematosus. *Rev Rhum Engl.* 1999; 66:303-9.

Massardo L, Burgos P, Martínez ME, Pérez R, Calvo M, Barros J, et al. Antiribosomal P protein antibodies in Chilean SLE patients: no association with renal disease. *Lupus.* 2002; 11:379-83.

Matus S, Burgos PV, Bravo-Zehnder M, Kraft R, Porras OH, Farías P, et al. Antiribosomal-P autoantibodies from psychiatric lupus target a novel neuronal surface protein causing calcium influx and apoptosis. *J Exp Med.* 2007; 204:3221-34.

Menon, S; Jameson-Shortall, E; Newman, SP; Hall-Craggs, MR; Chinn, R; Isenberg, DA. A longitudinal study of anticardiolipin antibody levels and cognitive functioning in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1999; 42:735-41.

Meroni PL, de Bartolo G, Barcellini W, Riboldi PS, Basile R, Betterle C, et al. Antiribosomal ribonucleoprotein autoantibodies in systemic lupus erythematosus. *J Clin Immunol.* 1984; 4:45-54.

Mikdashi JA, Esdaile JM, Alarcón GS, Crofford L, Fessler BJ, Shanberg L et al. Proposed response criteria for neurocognitive impairment in systemic lupus erythematosus clinical trials. *Lupus*. 2007; 16:418-25.

Miljic P, Bonaci-Nikolic B, Colovic N, Terzic T, Colovic M. Antiribosomal-P protein antibodies in a patient with systemic lupus erythematosus and non-Hodgkin's lymphoma: more than coincidental finding? *Lupus*. 2009; 18:81-5.

Mok CC, Mak A, Chu WP, To CH, Wong SN. Long-term survival of Southern Chinese patients with systemic lupus erythematosus: a prospective study of all age-groups. *Medicine (Baltimore)*. 2005; 84:218–24.

Molina JF, Molina J, García C, Gharavi AE, Wilson WA, Espinoza LR. Ethnic differences in the clinical expression of systemic lupus erythematosus: a comparative study between African-Americans and Latin Americans. *Lupus*. 1997; 6:63-7.

Molokhia M, McKeigue PM, Cuadrado M, Hughes G. Systemic lupus erythematosus in migrants from west Africa compared with Afro-Caribbean people in the UK. *Lancet*. 2001 May 5;357(9266):1414-5.

Moore BW. A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem Biophys Res Commun*. 1965; 19:739–44.

Morris, RG; Anderson, E; Lynch, GS; Baudry, M. Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an Nmethyl- D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature*. 1986; 319:774-6.

Moscavitch SD, Szyper-Kravitz M, Shoenfeld Y. Autoimmune pathology accounts for common manifestations in a wide range of neuro-psychiatric disorders: the olfactory and immune system interrelationship. *Clin Immunol*. 2009; 130:235-43.

Muro Y, Sugiura K, Morita Y, Tomita Y. Evaluation of anti-ribosomal P protein immunoassay in Japanese patients with connective tissue diseases: comparison with an indirect immunofluorescence assay. *Scand J Rheumatol*. 2009; 38:460-3.

Muscal E, Bloom DR, Hunter JV, Myones BL. Neurocognitive deficits and neuroimaging abnormalities are prevalent in children with lupus: clinical and research experiences at a US pediatric institution. *Lupus*. 2010; 19:268-79.

Muscal E, Brey RL. Neurologic manifestations of systemic lupus erythematosus in children and adults. *Neurol Clin*. 2010; 28:61-73.

Nascimento AP, Viana Vdos S, Testagrossa Lde A, Leon EP, Borba EF, Barros RT, et al. Antibodies to ribosomal P proteins: a potential serologic marker for lupus membranous glomerulonephritis. *Arthritis Rheum*. 2006; 54:1568-72.

Nery FG, Borba EF, Viana VS, Hatch JP, Soares JC, Bonfá E, et al. Prevalence of depressive and anxiety disorders in systemic lupus erythematosus and their association with anti-ribosomal P antibodies. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2008; 32:695-700.

Nojima Y, Minota S, Yamada A, Takaku F, Aotsuka S, Yokohari R. Correlation of antibodies to ribosomal P protein with psychosis in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*. 1992; 51:1053–5.

Nowotny M, Spiechowicz M, Jastrzebska B, Filipek A et al. Calcium-regulated interaction of Sgt1 with S100A6(calcyclin) and other S100 proteins. *J Biol Chem*. 2003; 278:26923–26928.

Ohira H, Takiguchi J, Rai T, Abe K, Yokokawa J, Sato Y, et al. High frequency of anti-ribosomal P antibody in patients with systemic lupus erythematosus-associated hepatitis. *Hepatol Res*. 2004; 28:137-139.

Olesińska M, Chwalińska-Sadowska H, Wiesik-Szewczyk E, Mielnik P, Zabek J. Clinical manifestation of systemic lupus erythematosus in patients with antiribosomal P protein antibodies. *Pol Arch Med Wewn*. 2010; 120:76-81.

Olfat MO, Al-Mayouf SM, Muzaffer MA. Pattern of neuropsychiatric manifestations and outcome in juvenile systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol*. 2004; 23:395-9.

Omdal R, Brokstad K, Waterloo K, Koldingsnes W, Jonsson R, Mellgren SI. Neuropsychiatric disturbances in SLE are associated with antibodies against NMDA receptors. *Eur J Neurol*. 2005; 12:392-8.

O'Neill S, Cervera R. Systemic lupus erythematosus. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2010; 6:841-55.

Pan ZJ, Anderson CJ, Stafford HA. Anti-idiotypic antibodies prevent the serologic detection of antiribosomal P autoantibodies in healthy adults. *J Clin Invest*. 1998; 102:215-22.

Pande I, Sekharan NG, Kailash S, et al. Analysis of clinical and laboratory profile in Indian childhood systemic lupus erythematosus and its comparison with SLE in adults. *Lupus*. 1993; 2:83-7.

Persson L, Hardemark HG, Gustafsson J, Rundström G, Mendel-Hartvig I, Esscher T, Pählman S. S-100 protein and neuron-specific enolase in cerebrospinal fluid and serum: markers of cell damage in human central nervous system. *Stroke* 1987; 18:911-8.

Petri M. Epidemiology of systemic lupus erythematosus. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2002; 16:847-58.

Pineles D, Valente A, Warren B, Peterson M, Lehman T, Moorthy L. Worldwide incidence and prevalence of pediatric onset systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2011; 20:1187-92.

Pistiner M, Wallace DJ, Nessim S, Metzger AL, Klinenberg JR. Lupus erythematosus in the 1980s: a survey of 570 patients. *Semin Arthritis Rheum*. 1991; 21:55-64.

Portela LV, Brenol JC, Walz R, Bianchin M et al. Serum S100B levels in patients with lupus erythematosus: preliminary observation. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2002; 9:164-6.

Postal M, Costallat LT, Appenzeller S. Neuropsychiatric manifestations in systemic lupus erythematosus: epidemiology, pathophysiology and management. *CNS Drugs*. 2011; 25:721-36.

Press J, Palayew K, Laxer RM, Elkon K, Eddy A, Rakoff D, et al. Antiribosomal P antibodies in pediatric patients with systemic lupus erythematosus and psychosis. *Arthritis Rheum*. 1996; 39: 671-6.

Quintana G, Coral-Alvarado P, Aroca G, Patarroyo PM, Chalem P, Iglesias-Gamarra A, et al. Single anti-P ribosomal antibodies are not associated with lupus nephritis in patients suffering from active systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev*. 2010; 9:750-5.

Rahman A, Isenberg DA. Systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med.* 2008; 358:929-39.

Ramírez Gómez LA, Uribe Uribe O, Osio Uribe O, Grisales Romero H, Cardiel MH, Wojdyla D, et al. Childhood systemic lupus erythematosus in Latin America. The GLADEL experience in 230 children. *Lupus.* 2008; 17:596–604.

Reichlin M. Autoantibodies to the ribosomal P proteins in systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Med.* 2006; 6:49-52.

Reichlin M. Cellular dysfunction induced by penetration of autoantibodies into living cells: cellular damage and dysfunction mediated by antibodies to dsDNA and ribosomal P proteins. *J Autoimmun.* 1998; 11:557-61.

Reichlin M. Ribosomal P antibodies and CNS lupus. *Lupus.* 2003; 12:916-8.

Reichlin M, Broyles TF, Hubscher O, James J, Lehman TA, Palermo R, et al. Prevalence of autoantibodies to ribosomal P proteins in juvenile-onset systemic lupus erythematosus compared with the adult disease. *Arthritis Rheum.* 1999; 42:69–75.

Reichlin M, Wolfson-Reichlin M. Correlations of anti-dsDNA and anti-ribosomal P autoantibodies with lupus nephritis. *Clin Immunol.* 2003; 108:69-72.

Rood MJ, ten Cate R, van Suijlekom-Smit LW, den Ouden EJ, Ouwerkerk FE, Breedveld FC, et al. Childhood-onset Systemic Lupus Erythematosus: clinical presentation and prognosis in 31 patients. *Scand J Rheumatol.* 1999; 28:222-6.

Ruiz-Irastorza G, Khamashta MA, Castellino G, Hughes GR. Systemic lupus erythematosus. *Lancet.* 2001; 357(9261):1027-32. Review.

Sato EI, Natour J, Martineli VPL, Assis LSS, Farão SR, Medeiros EL, et al: Seguimento clínico e laboratorial de 132 pacientes com lúpus eritematoso sistêmico. *Rev Bras Reumatol.* 1991; 31:57-62.

Schenatto CB, Xavier RM, Bredemeier M, Portela LV, Tort AB, Dedavid e Silva TL, et al. Raised serum S100B protein levels in neuropsychiatric lupus. *Ann Rheum Dis.* 2006; 65:829-31.

Schur PH, Moroz LA, Kunkel HG. Precipitating antibodies to ribosomes in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *Immunochemistry.* 1967; 4:447-53.

Sergent JS, Lockshin MD, Klempner MS, Lipsky BA. Central nervous system disease in systemic lupus erythematosus. Therapy and prognosis. *Am J Med.* 1975; 58:644-54.

Shinjo SK, Bonfá E. Cutaneous vasculitis in systemic lupus erythematosus: association with anti-ribosomal P protein antibody and Raynaud phenomenon. *Clin Rheumatol.* 2011; 30:173-7.

Shiozawa S, Kuroki Y, Kim M, Hirohata S, Ogino T. Interferon-alpha in lupus psychosis. *Arthritis Rheum.* 1992; 35:417-22.

Shoenfeld Y. To smell autoimmunity: anti-P-ribosomal autoantibodies, depression, and the olfactory system. *J Autoimmun.* 2007; 28:165-9.

Sibbitt WL, Jr, Brandt JR, Johnson CR, Maldonado ME, Patel SR, Ford CC, et al. The incidence and prevalence of neuropsychiatric syndromes in pediatric onset systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 2002; 29:1536-42.

Siegel M, Lee SL. The epidemiology of systemic lupus erythematosus. *Semin Arthritis Rheum.* 1973; 3:1-54.

Singer J, Denburg JA. Diagnostic criteria for neuropsychiatric systemic lupus erythematosus: the results of a consensus meeting. The Ad Hoc Neuropsychiatric Lupus Workshop Group. *J Rheumatol.* 1990; 17:1397-402.

Song J, Park YB, Lee WK, Lee KH, Lee SK. Clinical associations of antiendothelial cell Abs in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int.* 2000; 20:1-7.

Stafford HA, Anderson CJ, Reichlin M. Unmasking of anti-ribosomal P autoantibodies in healthy individuals. *J Immunol.* 1995; 155:2754-61.

Steiner J, Bernstein HG, Bielau H, Berndt A et al. Evidence for a wide extra-astrocytic distribution of S100B in human brain. *BMC Neurosci.* 2007; 8:2.

Steinlin MI, Blaser SI, Gilday DL, Eddy AA, Logan WJ, Laxer RM, et al. Neurologic manifestations of pediatric systemic lupus erythematosus. *Pediatr Neurol.* 1995; 13:191-7.

Steup-Beekman G, Steens S, van Buchem M, Huizinga T. Anti-NMDA receptor autoantibodies in patients with systemic lupus erythematosus and their first-degree relatives. *Lupus.* 2007; 16:329-34.

Strous RD, Shoenfeld Y. To smell the immune system: olfaction, autoimmunity and brain involvement. *Autoimmun Rev.* 2006; 6:54-60.

Sun KH, Liu WT, Tsai CY, Tang SJ, Han SH, Yu CL. Anti-dsDNA antibodies cross-react with ribosomal P proteins expressed on the surface of glomerular mesangial cells to exert a cytostatic effect. *Immunology.* 1995; 85:262-9.

Sun KH, Tang SJ, Lin ML, Wang YS, Sun GH, Liu WT. Monoclonal antibodies against human ribosomal P proteins penetrate into living cells and cause apoptosis of Jurkat T cells in culture. *Rheumatology (Oxford).* 2001; 40:750–6.

Takeda I, Rayno K, Wolfson-Reichlin M, Reichlin M. Heterogeneity of anti-dsDNA antibodies in their cross-reaction with ribosomal P protein. *J Autoimmun.* 1999; 13:423-8.

Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1982; 25:1271-7.

Teh LS, Bedwell AE, Isenberg DA, Gordon C, Emery P, Charles PJ, et al. Antibodies to protein P in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis.* 1992; 51:489-94.

Teh, LS; Isenberg, DA. Antiribosomal, P protein antibodies in systemic lupus erythematosus. A reappraisal. *Arthritis Rheum.* 1994; 37:307-15.

Teh LS, Lee MK, Wang F, Manivasagar M, Charles PJ, Nicholson GD et al. Antiribosomal P protein antibodies indifferent populations of patients with systemic lupus erythematosus. *Br JRheumatol.* 1993; 32:663-5.

Trysberg, E; Carlsten, H; Tarkowski, A. Intrathecal cytokines in systemic lupus erythematosus with central nervous system involvement. *Lupus.* 2000; 9:498-503.

Tucker LB, Menon S, Schaller JG, Isenberg DA. Adult- and childhood-onset systemic lupus erythematosus: a comparison of onset, clinical features, serology, and outcome. *Br J Rhematol.* 1995; 34:866-72.

Tzioufas AG, Tzortzakis NG, Panou-Pomonis E, Boki KA, Sakarellos-Daitsiotis M, Sakarellos C, et al. The clinical relevance of antibodies to ribosomal-P common epitope in two targeted systemic lupus erythematosus populations: a large cohort of consecutive patients and patients with active central nervous system disease. *Ann Rheum Dis.* 2000; 59:99–104.

Van Dam AP. Diagnosis and pathogenesis of CNS lupus. *Rheumatol Int.* 1991; 11:1-11.

Van Eldik LJ, Wainwright MS. The Janus face of glial-derived S100B: Beneficial and detrimental functions in the brain. *Restor Neurol Neurosci.* 2003; 21:97–108.

Vilar MJ, Sato EI. Estimating the incidence of systemic lupus erythematosus in a tropical region (Natal, Brazil). *Lupus.* 2002;11:528-32.

Weening JJ, D'Agati VD, Schwartz MM, Seshan SV, Alpers CE, Appel GB, et al. The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited. *J Am Soc Nephrol.* 2004; 15:241-50. Erratum in: *J Am Soc Nephrol.* 2004 15:835-6.

Weschler D. WAIS-III administration and scoring manual. San Antonio, TX: Psychological Corporation. 1997.

Weschler D. Weschler Intelligence Scale for Children – Third Edition. San Antonio, TX: Psychological Corporation. 1991.

West SG. Neuropsychiatric lupus. *Rheum Dis Clin North Am.* 1994; 20:129-58.

Wunderlich MT, Wallesch CW, Goertler M. Release of neurobiochemical markers if brain damage is related to the neurovascular status on admission and the site of arterial occlusion in acute ischemic stroke. *J Neurol Sci.* 2004; 227:49–53.

Yancey CL, Doughty RA, Athreya BH. Central nervous system involvement in childhood systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1981; 24:1389-95.

Yang X, Lin J, Lu X, Zhao X. Expression of S100B protein levels in serum and cerebrospinal fluid with different forms of neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol.* 2008; 27:353–7.

Yee C, Farewell VT , Isenberg DA, Griffiths B, The L, Bruce IN, et al. The use of Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index-2000 to define active disease and minimal clinically meaningful change based on data from a large cohort of systemic lupus erythematosus patients. *Rheumatology.* 2011; 50:982-8.

Yoshio T, Masuyama JI, Minota S, Kaneko N, Iwamoto M, Okazaki H, et al. A close temporal relationship of liver disease to antiribosomal P0 protein antibodies and central nervous system disease in patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 1998; 25:681-8.

Yoshio T, Onda K, Nara H, Minota S. Association of IgG anti-NR2 glutamate receptor antibodies in cerebrospinal fluid with neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2006; 54:675-8.

Yu HH, Lee JH, Wang LC, Yang YH, Chiang BL. Neuropsychiatric manifestations in pediatric systemic lupus erythematosus: A 20-year study. *Lupus.* 2006; 15:651–7.

Zandman-Goddard G, Chapman J, Shoenfeld Y. Autoantibodies involved in neuropsychiatric SLE and antiphospholipid syndrome. *Semin Arthritis Rheum.* 2007; 36(5):297-315.

Apêndice 1

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - Pacientes

OBJETIVO DA PESQUISA:

Eu _____ entendo que fui convidado (a) a participar em um projeto de pesquisa envolvendo pacientes com lúpus eritematoso sistêmico juvenil. O objetivo geral do estudo é o de determinar a utilidade de exames específicos de sangue no Lúpus Eritematoso Sistêmico Juvenil e correlacionar as alterações encontradas à atividade da doença, a manifestações clínicas diversas como dor de cabeça e problemas de memória. A identificação e quantificação dessas anormalidades no cérebro, pode eventualmente melhorar o diagnóstico e levar a um melhor tratamento desta doença. As informações médicas a meu respeito que forem obtidas para esse estudo, poderão ser compartilhadas com outros pesquisadores que trabalham com diversos tipos de doenças reumatológicas, podendo, assim, ser utilizadas, eventualmente, para outros fins de pesquisa sobre Lúpus Eritematoso Sistêmico Juvenil. O sigilo será mantido em todos os estudos colaborativos através da utilização de um número de código para a identificação dos indivíduos participantes.

A coleta de sangue será realizada em um dos braços no dia da sua coleta de sangue no centro de coleta. É importante ter várias amostras ao longo de sua doença para comparar a atividade do lúpus.

PROCEDIMENTO:

Eu entendo que se concordar em participar desse estudo, os pesquisadores participantes farão perguntas a respeito dos meus antecedentes médicos e de minha família. Responderei a um questionário para avaliar a presença de depressão, ansiedade e qualidade de vida. Eu serei submetido a um exame físico, neurológico e um teste para diagnóstico de distúrbios cognitivos para estabelecer meu estado clínico e cognitivo. Hospitalização não será necessária.

Uma amostra de sangue venoso será colhida (10 ml, o equivalente a uma colher de sopa) a cada visita ao ambulatório e na ocasião da sua coleta de sangue de rotina que são pedidos para cada visita no ambulatório de reumatologia. O sangue será identificado por um número e será congelado. Este estudo terá duração de 2 anos. Os exames poderão ser feitos durante um período máximo de 30 anos após a coleta. As células que por ventura forem isoladas do meu sangue serão preservadas para utilização durante todo o estudo e depois que ele se completar serão destruídas.

Não vai haver nenhuma forma de reembolso de dinheiro, já que com a participação na pesquisa você não vai ter nenhum gasto

VANTAGENS:

Eu entendo que não obterei nenhuma vantagem direta com a minha participação nesse estudo e que o meu diagnóstico e o meu tratamento provavelmente não serão modificados. Contudo, os resultados desse estudo podem, a longo prazo, oferecer vantagens para os indivíduos com Lúpus Eritematoso Sistêmico Juvenil, possibilitando um melhor diagnóstico e um tratamento mais adequado. Os resultados do meu exame de sangue ficarão a disposição dos médicos responsáveis pelo meu tratamento, e poderão ser úteis no futuro.

RISCO E DESCONFORTO:

Os riscos associados a coleta de sangue são mínimos, podendo ocorrer dor e manchas roxas (equimoses) no local da coleta do sangue. O desconforto será mínimo pois se trata de uma coleta de sangue geralmente da veia do braço que será realizada por profissional treinado e devidamente habilitado para realizar esse procedimento.

SIGILO:

Eu entendo que todas as informações médicas decorrentes desse projeto de pesquisa farão parte do meu prontuário médico e serão submetidos aos regulamentos do HC- UNICAMP referentes ao sigilo da informação médica. Se os resultados ou informações fornecidas forem utilizados para fins de publicação científica, nenhum nome será utilizado.

FORNECIMENTO DE INFORMAÇÃO ADICIONAL:

Eu entendo que posso requisitar informações adicionais relativas ao estudo a qualquer momento. A Dra Simone Appenzeller, tel (019) 3521-7372 estará disponível para responder minhas questões e preocupações. Em caso de recurso, dúvidas ou reclamações contactar a secretaria da Comissão de Ética da Faculdade de Ciências Médicas-UNICAMP, tel. (019) 3521-8942

RECUSA OU DESCONTINUAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO:

Eu entendo que a minha participação é voluntária e que eu posso me recusar a participar ou retirar meu consentimento e interromper a minha participação no estudo a qualquer momento sem comprometer os cuidados médicos que recebo atualmente ou receberei no futuro no HC- UNICAMP.

Eu confirmo que o(a)
Dr(a). _____

me explicou o objetivo do estudo, os procedimentos aos quais serei submetido e os riscos, desconforto e possíveis vantagens advindas desse projeto de pesquisa. Eu li e compreendi esse formulário de consentimento e estou de pleno acordo em participar desse estudo.

_____ HC: _____

Idade: _____

Nome do participante e responsável (se necessário)

Assinatura do participante ou responsável

data

Nome da testemunha

Assinatura da testemunha

data

Telefone de contato: _____

Endereço: _____

RESPONSABILIDADE DO PESQUISADOR:

Eu _____ expliquei _____ a _____ o objetivo do estudo, os procedimentos requeridos e os possíveis riscos e vantagens que poderão advir do estudo, usando o melhor do meu conhecimento. Eu me comprometo a fornecer uma cópia desse formulário de consentimento ao participante ou responsável.

Nome do pesquisador ou associado

Assinatura do pesquisador ou associado

data

Apêndice 2

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Controles

OBJETIVO DA PESQUISA:

Eu _____ entendo que fui convidado (a) a participar em um projeto de pesquisa envolvendo pacientes com lúpus eritematoso sistêmico juvenil. O objetivo geral do estudo é o de determinar a utilidade de exames específicos de sangue no Lúpus Eritematoso Sistêmico Juvenil e correlacionar as alterações encontradas à atividade da doença, a manifestações clínicas diversas como dor de cabeça e problemas de memória. A identificação e quantificação dessas anormalidades no cérebro, pode eventualmente melhorar o diagnóstico e levar a um melhor tratamento desta doença. As informações médicas a meu respeito que forem obtidas para esse estudo, poderão ser compartilhadas com outros pesquisadores que trabalham com diversos tipos de doenças reumatológicas, podendo, assim, ser utilizadas, eventualmente, para outros fins de pesquisa sobre Lúpus Eritematoso Sistêmico Juvenil. O sigilo será mantido em todos os estudos colaborativos através da utilização de um número de código para a identificação dos indivíduos participantes.

A coleta de sangue será realizada em um dos braços no dia da sua coleta de sangue no centro de coleta. É importante ter várias amostras ao longo de sua doença para comparar a atividade do lúpus.

PROCEDIMENTO:

Eu entendo que se concordar em participar desse estudo, os pesquisadores participantes farão perguntas a respeito dos meus antecedentes médicos e de minha família. Responderei a um questionário para avaliar a presença de depressão, ansiedade e qualidade de vida. Eu serei submetido a um exame físico, neurológico e um teste para diagnóstico de distúrbios cognitivos para estabelecer meu estado clínico e cognitivo. Hospitalização não será necessária.

Uma amostra de sangue venoso será colhida (10 ml, o equivalente a uma colher de sopa) a cada visita ao ambulatório e na ocasião da sua coleta de sangue de rotina que são pedidos para cada visita no ambulatório de reumatologia. O sangue será identificado por um número e será congelado. Este estudo terá duração de 2 anos. Os exames

poderão ser feitos durante um período máximo de 30 anos após a coleta. As células que por ventura forem isoladas do meu sangue serão preservadas para utilização durante todo o estudo e depois que ele se completar serão destruídas.

Não vai haver nenhuma forma de reembolso de dinheiro, já que com a participação na pesquisa você não vai ter nenhum gasto

VANTAGENS:

Eu entendo que não obterei nenhuma vantagem direta com a minha participação nesse estudo e que o meu diagnóstico e o meu tratamento provavelmente não serão modificados. Contudo, os resultados desse estudo podem, a longo prazo, oferecer vantagens para os indivíduos com Lúpus Eritematoso Sistêmico Juvenil, possibilitando um melhor diagnóstico e um tratamento mais adequado. Os resultados do meu exame de sangue ficarão a disposição dos médicos responsáveis pelo meu tratamento, e poderão ser úteis no futuro.

RISCO E DESCONFORTO:

Os riscos associados a coleta de sangue são mínimos, podendo ocorrer dor e manchas roxas (equimoses) no local da coleta do sangue. O desconforto será mínimo pois se trata de uma coleta de sangue geralmente da veia do braço que será realizada por profissional treinado e devidamente habilitado para realizar esse procedimento.

SIGILO:

Eu entendo que todas as informações médicas decorrentes desse projeto de pesquisa farão parte do meu prontuário médico e serão submetidos aos regulamentos do HC- UNICAMP referentes ao sigilo da informação médica. Se os resultados ou informações fornecidas forem utilizados para fins de publicação científica, nenhum nome será utilizado.

FORNECIMENTO DE INFORMAÇÃO ADICIONAL:

Eu entendo que posso requisitar informações adicionais relativas ao estudo a qualquer momento. A Dra Simone Appenzeller, tel (019) 3521-7372 estará disponível para responder minhas questões e preocupações. Em caso de recurso, dúvidas ou reclamações contactar a secretaria da Comissão de Ética da Faculdade de Ciências Médicas-UNICAMP, tel. (019) 3521-8942

RECUSA OU DESCONTINUAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO:

Eu entendo que a minha participação é voluntária e que eu posso me recusar a participar ou retirar meu consentimento e interromper a minha participação no estudo a qualquer momento sem comprometer os cuidados médicos que recebo atualmente ou receberei no futuro no HC- UNICAMP.

Eu confirmo que o(a)
Dr(a). _____

me explicou o objetivo do estudo, os procedimentos aos quais serei submetido e os riscos, desconforto e possíveis vantagens advindas desse projeto de pesquisa. Eu li e compreendi esse formulário de consentimento e estou de pleno acordo em participar desse estudo.

_____ HC: _____
Idade: _____

Nome do participante e responsável (se necessário)

Assinatura do participante ou responsável

data

Nome da testemunha

Assinatura da testemunha

data

Telefone de contato: _____

Endereço: _____

RESPONSABILIDADE DO PESQUISADOR:

Eu _____ expliquei _____ a _____ o objetivo do estudo, os procedimentos requeridos e os possíveis riscos e vantagens que poderão advir do estudo, usando o melhor do meu conhecimento. Eu me comprometo a fornecer uma cópia desse formulário de consentimento ao participante ou responsável.

Nome do pesquisador ou associado

Assinatura do pesquisador ou associado

data

Apêndice 3

Prevalence and clinical significance of antiribosomal P antibody in childhood-onset systemic lupus erythematosus.

Aldar H Bs¹, Lapa AT Bs², Bellini B², Sinicato NA Bs², Postal M Bs¹, Fernandes PT PhD³, Costallat LTL MD, PhD¹, Marini R MD, PhD⁴, Appenzeller S MD, PhD¹

¹Department of Medicine, Rheumatology Unit, Faculty of Medical Science, State University of Campinas

²MSc Graduate (Postgraduate) Program in Child and Adolescent Health, Faculty of Medical Science, State University of Campinas, UNICAMP

³ Associated Researcher, Faculty of Sports, State University of Campinas

⁴Department of Pediatrics, Pediatric Rheumatology Unit, Faculty of Medical Science, State University of Campinas

Running title: Anti-P and juvenile systemic lupus erythematosus

Keywords: Antiribosomal P antibody, nephritis, early hemolytic anemia, juvenile onset systemic lupus erythematosus

Correspondence to: Simone Appenzeller-Department of Medicine, Faculty of Medical Science, State University of Campinas, Cidade Universitária, Campinas SP, Brazil, CEP 13083-970; FAX: +55 19 3289-1818

Email: appenzellersimone@yahoo.com

Key messages: 1. Anti-P antibodies are frequently observed in childhood SLE

2. Anti-P was associated with anxiety in childhood SLE

Abstract

Objective: To investigate the prevalence of the anti-ribosomal P (anti-P) antibodies in childhood-onset systemic lupus erythematosus patients (cSLE), healthy controls and first degree relatives. To elucidate the association between anti-P and disease activity, laboratory and treatment features in cSLE patients.

Methods: We included consecutive SLE patients with disease onset before 16 years. Controls were age and sex-matched. SLE patients were assessed for clinical and laboratory SLE manifestations, disease activity [SLE Disease Activity Index (SLEDAI)], damage [Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology Damage Index (SDI)] and current drug exposures. Mood disorders were determined through Becks Depression (BDI) and Becks Anxiety Inventory (BAI). Anti-P measured by enzyme-linked immunosorbent assay.

Results: We included 50 consecutive cSLE patients (mean age of 16.82 ± 3.46), 35 first degree relatives (mean age of 38.73 ± 3.89), and 20 health control (mean age of 18.3 ± 4.97). Anti-P was observed in 13 (26%) cSLE patients and in no first-degree relative ($p < 0.01$) or control ($p < 0.01$). Anti-P was more frequently observed in patients with anxiety ($p < 0.002$). No other clinical, laboratory or treatment features, including SLEDAI and SDI scores were associated with the presence of anti-P in cSLE patients.

Conclusion: Anti-P is frequently observed in cSLE patients and was associated with the presence of anxiety in this cohort of cSLE.

Introduction

The anti-ribosomal P (anti-P) antibodies are members of a polyspecific population of autoantibodies that react to at least one epitope common to ribosomal phosphoproteins, called P0 (38 kd), P1 (19 kd), and P2 (17 kd) (1,2). The ribosomal phosphoproteins are associated mainly with the 60S ribosomal subunit in eukaryotic cells (3-5). The anti-P antibodies are found in sera of systemic lupus erythematosus (SLE) patients and cross-react with P0, P1, and P2 due to a common determinant contained within the carboxyl-terminal 22 amino acids of all three proteins (2,6).

The prevalence of anti-ribosomal P varies from 6% to 36% in SLE patients, depending on ethnicity, age and clinical variables analyzed (2,7-14). Anti-P antibodies have been associated with nephritis (15-18), autoimmune hepatitis (3,4,15, 19), and central nervous system (CNS) manifestations (20-25), especially psychosis (23-25), and mood disorders (21,24).

Only three studies have, however, analyzed anti-P antibodies in childhood (c)SLE (2,8, 60). These studies analyzed the association of anti-P antibodies and psychosis (2), disease activity (8), proteinuria and urinary cell casts (60) and the inverse association with glomerulonephritis (60); however, none of the studies analyzed the association of anti-P with other neuropsychiatric manifestations, such as cognitive impairment and mood disorders.

The aim of the present study was to investigate the prevalence of the anti-P antibodies in cSLE patients, first-degree relatives and healthy controls. In addition we analyzed clinical and laboratory features associated with the presence of anti-P in cSLE, with special attention to neuropsychiatric manifestations.

Subjects and Methods

Subjects

Consecutive cSLE patients, recruited from the Pediatric Rheumatology Outpatient Clinic of State University of Campinas were included in this study. Patients were included in the present study if they: (i) fulfilled at least four criteria of American College of Rheumatology (ACR) (26); (ii) were below 16 years of age at disease onset; and (iii) completed neuropsychiatric investigation.

Twenty health individuals with similar age and gender, and unrelated to the patients and without history of any chronic disease (including auto-immune diseases) and 35 first-degree relatives were included as a control group.

The study was approved by the ethics committee at our institution, and informed written consent was obtained from each participant and/or legal guardian.

Clinical features

All patients had their medical histories, clinical and serological characteristics entered at the time of SLE diagnosis in special computer database programs. Features included in this protocol were age at onset of disease (defined as the age at which the first symptoms clearly attributable to SLE occurred), age at diagnosis (defined as the age when patients fulfilled four or more of the 1997 revised criteria for the classification of SLE) (26), and follow-up time (defined as the time from disease onset until May 2010).

All clinical manifestations and laboratory findings were recorded at the day of blood withdrawal. Nephritis was diagnosed on the basis of proteinuria exceeding 0.5 g/L with abnormal urinary sediment and/or histological findings. Nephrotic syndrome was defined as proteinuria in excess of 3.0 g/day. Hematological alterations were

ascribed to lupus only in the absence of bone-marrow suppression (leukopenia <4000 cells/mm³; thrombocytopenia $<100,000$ cells/mm³; hemolytic anemia). We also analyzed the presence of malar rash, discoid lesions, subacute cutaneous lesions, cutaneous vasculitis, photosensitivity, oral ulcers, arthritis and serositis.

Neuropsychiatric evaluation

CNS manifestations were recorded following ACR case definitions (27) and divided into the categories present or absent at study entry. A complete neurologic examination as well as cognitive and psychiatric evaluation was applied to all patients and control subjects at study entry order to identify CNS involvement (28).

All subjects were submitted to a battery of standardized neuropsychological tests in order to screen for possible impairment. Subjects that were 16 years old or less performed the Wechsler Intelligence Scale for Children (WISC-III) (29) and patients who were 17 years or older performed the Wechsler Adult Intelligence Scale (WAIS-III) (30). The Rey Complex Figure (Figure A) was also applied for all subjects (31, 32). The individual test results were converted into standard scores, which were compared with the normative data obtained from the control group (33). Regarding cognitive domains, subjects with a total score of ≤ 2 SDs below the normative value were considered to be impaired. Cognitive dysfunction was classified as mild if there were deficits in <3 dimensions, as moderate if there were deficits in 3–4 dimensions, and as severe if there were deficits in ≥ 5 dimensions (33).

Mood evaluation

All subjects completed the Beck Depression (BDI) (34) and Beck Anxiety Inventory (BAI) (35). For patients under sixteen years, Children's Depression Inventory (CDI) was applied. These scales consist of 21 items, each describing a common symptom of depression/anxiety. The respondent is asked to rate how much he or she has

been bothered by each symptom over the past month on a 4-point scale ranging from 0 to 3. The items are summed to obtain a total score that can range from 0 to 63. The cutoffs used for the BDI/CDI are: 0–13: no/minimal depression; 14–19: mild depression; 20–28: moderate depression; and 29–63: severe depression and for the BAI: 0-7: no/minimal level of anxiety; 8-15: mild anxiety; 16-25: moderate anxiety; 26-63: severe anxiety (34-36).

Laboratory studies

Antinuclear antibodies (ANA) were determined by indirect immunofluorescence using mouse liver as substrate, and regarded as positive if higher than 1:40. Anti-dsDNA antibodies were determined by indirect immunofluorescence using *Crythidia* as substrate and considered positive if higher than 1:10. Precipitating antibodies to extractable nuclear antigens (ENA), including Ro (SSA), La (SSB), and Sm were detected by a standardized ELISA method, and considered positive if higher than 1: 40. Rheumatoid factor (RF) was detected by nephelometry, and regarded as positive if higher than 10. Anticardiolipin antibodies (aCL) of the IgG and IgM isotypes were measured by an ELISA method (37). The lupus anticoagulant (LA) activity was detected by coagulation assays in platelet-free plasma obtained by double centrifugation, following the recommendation of the subcommittee on LA of the Scientific and Standardization Committee of the International Society of Thrombosis and Homeostasis (38). These measurements were carried out twice, at an interval of 12 weeks.

Disease Activity and damage

Disease activity was measured by the Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index (SLEDAI) (39). SLEDAI scores range between 0 and 105. Scores of ≥ 3 were considered active disease (40).

Cumulative SLE-related damage in all patients was determined using the Systemic Lupus International Collaborating Clinics (SLICC)/ACR Damage Index (SDI) at time of blood withdrawal (41). SDI score range from 0 to 47.

Treatment

Treatment prescribed at time of blood withdrawal, as well as its adverse events related to drug use, was recorded. Doses of oral and parenteral corticosteroids were analyzed and converted to the equivalent doses of prednisone.

Antibody assays

A blood sample was collected from all participants, centrifuged at 3000 rpm for 15 min after being allowed to clot for 30 min at room temperature. Sera were separated as soon as possible from the clot of red cells after centrifugation. Separated sera were kept in aliquots at -80°C until the time of assay. Commercially available kits from INOVA QUANTA Lite™ Ribosome P, San Diego, California, USA were used for analysis. The samples were classified as negative if < 20 units, low positive if between 20-39 units, moderate positive if between 40-80 units, or high positive if > 80 units (5).

Statistical Analysis

The different frequencies were analyzed using Chi-Square test. The Yates correction and the Fischer's exact test were used when necessary. For all analyses, a p-value < 0.05 was considered statistically significant.

Results

Demographics

We included 50 consecutive cSLE patients (47 [94.3%] women) with mean age of 16.82 years [Standard deviation (SD) \pm 3.46 years; range 10-20] at study entry. Mean disease duration was 4.23 years (SD \pm 6.28; range 0-11 years). Thirty-five first-degree relatives (31 women [88.57%]) agreed to participate in the study (mean age of 38.73 years [SD \pm 3.89 years; range 15-48 years]). The control group consisted of 20 healthy controls (18 [90%] women) with a mean age of 18.3 years (SD \pm 4.97 years; range 12-26 years). Patients and healthy controls were statistically comparable in terms of age and sex. First-degree relatives were significantly older, as expected ($p < 0.05$)

Clinical, laboratory, and treatment features

Mean age at disease onset was 12.17 (SD=3.09; range=4-15). At time of study entry, 24 (48%) cSLE patients had active disease with mean SLEDAI scores of 8.37 (SD \pm 3.80, range 4-18). The 26 (52%) inactive patients had a mean SLEDAI score of 0.39 (SD \pm 0.80 range 0-2)]. SDI $>$ 1 were observed in 15 (30%) patients. Clinical and laboratory manifestations at study entry are shown in Table 1.

Neuropsychiatric manifestations at study entry were observed in 30 (60%) patients. We observed cognitive impairment 27 (54%), headache in 3 (6%), seizures in 1 (2%), and movement disorders in 1 (2%) patient. Depression was identified in 7 (14.6%) patients and in no healthy control or first-degree relatives. Mild depression was identified in 5/7 patients and 2/7 patients had moderate/severe depression. Anxiety was observed in 17 (34%) cSLE patients. Nine/17 patients had mild and 8/17 had moderate/severe anxiety.

At time of study entry, 7 (14%) patients were without any immunosuppressant medication. Forty-three (86%) patients were receiving prednisone, 34 (68%)

hydroxychloroquine and 24 (48%) patients were receiving other immunosuppressive drugs (Table 1).

Anti-P antibodies: prevalence and clinical significance

Thirteen (26%) patients had positive anti-P antibodies. None of the healthy controls or first degree relatives had positive anti-P antibodies.

Anti-P antibodies were more frequently observed in patients with anxiety ($p=0.002$). No other clinical, laboratory or treatment features were associated with anti-P antibodies in this cohort.

Discussion

Although discovered over 30 years ago, anti-P antibodies are not routinely performed in SLE patients and there is no consensus regarding their correlation with clinical picture and their role in the pathogenesis of SLE (42). Genetic and environmental factors are most likely responsible for the discrepancies in reported frequencies of anti-P positivity in SLE patients (7-14).

Only three previous studies have analyzed the prevalence of anti-P antibodies in cSLE (2, 8, 60). In the two first studies the positivity of anti-P antibodies varied throughout the disease course (2, 8); however the reported prevalence were similar to the 26% found in our study (2, 8, 60).

In the first study published in 1996, the prevalence of anti-P antibodies was 20%, and elevated levels of anti-P distinguished SLE associated psychosis from primary psychosis, however anti-P levels were not specific for psychosis in cSLE (2). Longitudinal data were available for 5 children in which resolution of psychosis was associated with decrease in anti-P titers (2).

In the second study, the prevalence of anti-P antibodies was 42%, significantly higher when compared to a group of adult SLE patients (8). In addition, levels of anti-P antibodies varied with the clinical disease activity, often in concordance with anti-double stranded DNA (dsDNA) levels. The presence of both anti-P and anti-dsDNA antibodies was powerfully associated with nephritis (8).

The third study compared the prevalence of anti-P antibodies in cSLE and adult-onset SLE, reporting a significantly higher prevalence of 25% in cSLE (60). The presence of anti-P antibodies was associated with proteinuria, urinary cell casts and inversely associated with glomerulonephritis (60).

We also observed that anti-P antibodies were more frequently observed in patients with anxiety when compared to patients without anxiety. No other clinical and laboratory features were associated with anti-P in this cohort. Although the overall prevalence of neuropsychiatric manifestation was similar to previous reported studies (43), the prevalence of neuropsychiatric manifestation other than cognitive impairment and mood disorders was low at the time of evaluation. Since previous studies showed that anti-P titers may vary with the course of disease (2, 8, 44, 45), we did not include cumulative neuropsychiatric manifestations as a variable in this study.

Central nervous system (CNS) involvement in SLE continues to be very difficult to diagnose, assess, and treat, but can lead to significant morbidity in children (46). Estimates of the prevalence of neuropsychiatric SLE have ranged from 22%–95% in children (47). There have been few comprehensive studies detailing neuropsychiatric SLE features and prevalence rates in children and adolescents (46-50). Few prospectively studies have been done (49, 50) and have shown higher rates of anxiety, when compared to retrospective studies and similar to the rates found in our study. However none of the studies analyzed the association of anti-P antibodies and mood disorders in children (2, 8, 61).

In adult SLE, the association of anti-P antibodies and neuropsychiatric SLE is still controversial (14, 20-25, 51-52). Different ELISA methods and different time span between the manifestations and the exam, may explain some of the reported differences (44). Contrary to serum anti-P measurements, cerebral spinal fluid (CSF) measurements of anti-P seem to be more specific for diffuse NP SLE, however all CSF measurements were done during new onset of neuropsychiatric manifestations (53, 54).

The pathogenic potential of anti-P autoantibody on the CNS was studied by the intraventricular injection of anti-P antibodies into mice (55). The injected animals

developed a depressive-like behavior; however, the depressive-like behavior was not accompanied by motor, cognitive or coordination deficits (56). The direct role of anti-P antibody in the induction of depression was strengthened by the reversal of the effects when mice were treated with specific monoclonal anti-idiotypic antibodies and long-term anti-depressive therapy (57). Histological analysis of the mice brain showed anti-P labeling neurons at the hippocampus, neocortical layers II, V, and VI; amygdala, cingulate cortex and piriform cortex, which are part of limbic system and implicated in mood balance (56). In further studies, anti-P antibodies have been shown to cause apoptosis by increasing the calcium influx and activation of caspase-3 (58). These findings suggest that anti-P antibodies may be associated with a wide range of CNS functions (59).

Although we did not find an association between the presence of anti-P antibodies and depression and cognitive impairment, indicating hippocampal involvement, we did find an association with anxiety, which could indicate the involvement of the amygdala.

We did not find positive anti-P antibodies in our control group, however it is important to highlight that masked anti-P autoantibodies are present in the healthy population, and their detection in SLE may represent a disruption of regulatory immune networks (59).

In summary we did find a prevalence of 26% of anti-P antibodies and an association of the presence of anti-P antibodies and anxiety, suggesting amygdala involvement. Neuroimaging studies are necessary to confirm these findings.

Grants: Fundação Amparo À Pesquisa Estado São Paulo-Brasil (FAPESP 2008/02917-0, 2009/06049-6 and 2009/13046-3), Conselho Nacional Pesquisa Desenvolvimento-Brasil CNPq (300447/2009-4)

Conflict of Interest: None of the authors has any conflict of interest

References

1. Elkon K, Parnassa A, Foster C. Lupus autoantibodies target ribosomal P proteins. *J Exp Med* 1985;162:459–71.
2. Press J, Palayew K, Laxer RM, Elkon K, Eddy A, Rakoff D, et al. Antiribosomal P antibodies in pediatric patients with systemic lupus erythematosus and psychosis. *Arthritis Rheum* 1996;39: 671–6.
3. Koren E, Reichlin MW, Koscec M, Fugate RD, Reichlin M. Autoantibodies to the ribosomal P proteins react with a plasma membrane-related target on human cells. *J Clin Invest* 1992;89: 1236–41.
4. Koscec M, Koren E, Wolfson-Reichlin M, Fugate RD, Trieu E, Targoff IN, et al. Autoantibodies to ribosomal P proteins penetrate into live hepatocytes and cause cellular dysfunction in culture. *J Immunol* 1997;159:2033–41.
5. Sun KH, Tang SJ, Lin ML, Wang YS, Sun GH, Liu WT. Monoclonal antibodies against human ribosomal P proteins penetrate into living cells and cause apoptosis of Jurkat T cells in culture. *Rheumatology (Oxford)* 2001;40:750–6.
6. Mahler M, Kessenbrock K, Raats J, Williams R, Fritzler MJ, Bluthner M. Characterization of the human autoimmune response to the major C-terminal epitope of the ribosomal P proteins. *J Mol Med* 2003;81:194–204.
7. Sato T, Uchiumi T, Ozawa T, Kikuchi M, Nakano M, Kominami R, et al. Autoantibodies against ribosomal proteins found with high frequency in patients with systemic lupus erythematosus with active disease. *J Rheumatol* 1991;18:1681–4.

8. Reichlin M, Broyles TF, Hubscher O, James J, Lehman TA, Palermo R, et al. Prevalence of autoantibodies to ribosomal P proteins in juvenile-onset systemic lupus erythematosus compared with the adult disease. *Arthritis Rheum* 1999;42:69–75.
9. Teh LS, Isenberg DA. Antiribosomal P protein antibodies in systemic lupus erythematosus: a reappraisal. *Arthritis Rheum* 1994;37:307–15.
10. Mahler M, Kessenbrock K, Szmyrka M, Takasaki Y, Garcia-De La Torre I, Shoenfeld Y, et al. International multicenter evaluation of autoantibodies to ribosomal P proteins. *Clin Vaccine Immunol* 2006;13:77–83.
11. Nojima Y, Minota S, Yamada A, Takaku F, Aotsuka S, Yokohari R. Correlation of antibodies to ribosomal P protein with psychosis in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 1992;51:1053–5.
12. Teh LS, Lee MK, Wang F, Manivasagar M, Charles PJ, Nicholson GD et al. Antiribosomal P protein antibodies indifferent populations of patients with systemic lupus erythematosus. *Br JRheumatol.* 1993; 32: 663-665.
13. Arnett FC, Reveille JD, Moutsopoulos HM, Georgescu L, Elkon KB. Ribosomal P autoantibodies in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1996; 11: 1833-1839.
14. Gerli R, Caponi L, Tincani A, Scorza R, Sabbadini MG, Danieli MG, et al. Clinical and serological Associations of ribosomal P autoantibodies in systemic lupus erythematosus: prospective evaluation in a large cohort of Italian patients. *Rheumatology.* 2002; 41: 1357-1366.
15. Hulsey M, Goldstein R, Scully L, Surbeck W, Reichlin M. Antiribosomal P antibodies in systemic lupus erythematosus: a case control study correlating hepatic and renal disease. *Clin Immunol Immunopathol* 1995;74:252–6.

16. Chindalore V, Neas B, Reichlin M. The association between anti-ribosomal P antibodies and active nephritis in systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol Immunopathol.* 1998; 87: 292-296.
17. Monova D, Argirova T, Monov S. Antiribosomal P antibodies in patients with lupus glomerulonephritis. *Clin Nephrol.* 2001; 55: 425-426.
18. Martin AL, Reichlin M. Fluctuations of antibody to ribosomal "P" proteins correlate with appearance and remission of nephritis in SLE. *Lupus* 1996;5:22–9
19. Arnett FC, Reichlin M. Lupus hepatitis: an under-recognized disease feature associated with autoantibodies to ribosomal P. *Am J Med.* 1995; 99: 465-472.
20. Tzioufas AG, Tzortzakis NG, Panou-Pomonis E, Boki KA, Sakarellos-Daitsiotis M, Sakarellos C, et al. The clinical relevance of antibodies to ribosomal-P common epitope in two targeted systemic lupus erythematosus populations: a large cohort of consecutive patients and patients with active central nervous system disease. *Ann Rheum Dis* 2000;59:99–104.
21. Abdel-Nasser AM, Ghaleb RM, Mahmoud JA, Khairy W, Mahmoud RM. Association of anti -ribosomal P protein antibodies with neuropsychiatric and other manifestations of systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol* 2008; 27:1377–1385
22. Isshi K, Hirohata S. Differential roles of the anti-ribosomal P antibody and antineuronal antibody in the pathogenesis of central nervous system involvement in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1998;41:1819–2723.
23. Briani C, Lucchetta M, Ghirardello A, Toffanin E, Zampieri S, Ruggero S, et al. Neurolyupus is associated with anti-ribosomal P protein antibodies: an inception cohort study. *J Autoimmun.* 2009;32:79-84.

24. Schneebaum AB, Singleton JD, West SG, Blodgett JK, Allen LG, Cheronis JC, et al. Association of psychiatric manifestations with antibodies to ribosomal P proteins in systemic lupus erythematosus. *Am J Med.* 1991;90:54-62.
25. Isshi K, Hirohata S. Association of anti-ribosomal P protein antibodies with neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1996;39:1483-90.
26. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997;40:1725
27. American College of Rheumatology (ACR), The American College of Rheumatology nomenclature and case definitions for neuropsychiatric lupus syndromes. *Arthritis and Rheumatism* 1999; 42: 599–608.
28. Ross GS, Zelko F, Klein-Gitelman M, Levy DM, Muscal E, Schanberg LE, et al. Childhood Arthritis & Rheumatology Research Alliance Ad-Hoc Neurocognitive Lupus Committee. A proposed framework to standardize the neurocognitive assessment of patients with pediatric systemic lupus erythematosus. *Arthritis Care Res (Hoboken).* 2010;62:1029-33.
29. Weschler D. *Weschler Intelligence Scale for Children – Third Edition.* San Antonio, TX: Psychological Corporation. 1991.
30. Weschler D. *WAIS-III administration and scoring manual.* San Antonio, TX: Psychological Corporation. 1997.
31. Machulda MM, Ivnik RJ, Smith GE, Ferman TJ, Boeve BF, Kopman D, Petersen RC, Tangalos EG. Mayo's Older Americans Normative Studies: Visual Form Discrimination and copy trial of the Rey-Osterrieth Complex Figure. *J Clin Exp Neuropsychol* 2007;29:377-384.

32. Knight JA, Kaplan E. The Handbook of Rey-Osterrieth Complex Figure Usage: clinical and research applications. Psychological Assessment Resources, Lutz. 2003.
33. Mikdashi JA, Esdaile JM, Alarcón GS, Crofford L, Fessler BJ, Shanberg L et al. Proposed response criteria for neurocognitive impairment in systemic lupus erythematosus clinical trials. *Lupus* 2007; 16:418-425.
34. Beck AT, Ward CH, Mendelsohn M, Mock J, Erbaugh J. An inventory for measuring depression. *Arch Gen Psychiatry* 1961;4:53-63.
35. Beck, AT, Epstein, N, Brown, G, Steer, RA. An inventory for measuring clinical anxiety: psychometric properties. *J. Consult. Clin. Psychol.* 1988; 56, 893-897
36. Lindsay W, Skene D. The Beck Depression Inventory II and the Beck Anxiety Inventory in people with intellectual disabilities: factor analyses and group data. *Journal of Applied Research in Intellectual Disabilities.* 2007;20:401–408.
37. Harris EN, Gharavi AE, Patel SP, Hughes GR. Evaluation of the anti-cardiolipin antibody test: report of an international workshop held 4 April 1986. *Clin Exp Immunol* 1987; 68: 215–22.
38. Pengo V, Tripodi A, Reber G, Rand JH, Ortel TL, Galli M, et al; Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibody of the Scientific and Standardisation Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection. Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibody of the Scientific and Standardisation Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *J Thromb Haemost.* 2009;7:1737-40.

39. Bombardier C, Gladman DD, Urowitz MB, Caron D, Chang CH. The Committee on Prognosis Studies in SLE. Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. *Arthritis Rheum.* 1992; 35:630–640.
40. Yee C, Farewell VT, Isenberg DA, Griffiths B, The L, Bruce IN, et al. The use of Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index-2000 to define active disease and minimal clinically meaningful change based on data from a large cohort of systemic lupus erythematosus patients. *Rheumatology.* 2011 doi:10.1093/rheumatology/keq376.
41. Gladman DD, Urowitz MB, Goldsmith CH, Fortin P, Ginzler E, Gordon C, et al. The reliability of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology Damage Index in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1997;40:809-13.
42. Caponi L, Pegoraro S, Di Bartolo V, Rovero P, Revoltella R, Bombardieri S. Anti-P protein antibodies in systemic lupus erythematosus: correlations with clinical and serological data. *J Immunol Methods.* 1995;179:193-202.
43. Lee T, von Scheven E, Sandborg C. Systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome in children and adolescents. *Curr Opin Rheumatol.* 2001;13:415-21.
44. Agmon-Levin N, Gilburd B, Kivity S, Katz BS, Flitman-Katzevman I, Shoenfeld N, et al. Anti-ribosomal-P antibodies in lupus patients and healthy controls: evaluation of three ELISA assays. *Isr Med Assoc J.* 2009;11:403-6.
45. Bonfa E, Golombek SJ, Kaufman LD, Skelly S, Weissbach H, Brot N, et al. Association between lupus psychosis and anti-ribosomal P protein antibodies. *N Engl J Med.* 1987;317:265-71.

46. Muscal E, Brey RL. Neurologic manifestations of systemic lupus erythematosus in children and adults. *Neurol Clin.* 2010;28:61-73.
47. Harel L, Sandborg C, Lee T, von Scheven E. Neuropsychiatric manifestations in pediatric systemic lupus erythematosus and association with antiphospholipid antibodies. *J Rheumatol.* 2006;33:1873–1877.
48. Yu HH, Lee JH, Wang LC, Yang YH, Chiang BL. Neuropsychiatric manifestations in pediatric systemic lupus erythematosus: A 20-year study. *Lupus.* 2006;15:651–657.
49. Sibbitt WL, Jr, Brandt JR, Johnson CR, Maldonado ME, Patel SR, Ford CC, et al. The incidence and prevalence of neuropsychiatric syndromes in pediatric onset systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 2002;29:1536–1542.
50. Hiraki LT, Benseler SM, Tyrrell PN, Hebert D, Harvey E, Silverman ED. Clinical and laboratory characteristics and long-term outcomes of pediatric systemic lupus erythematosus: a longitudinal study. *J Pediatr.* 2008;152:550–556.
51. Nery FG, Borba EF, Viana VS, Hatch JP, Soares JC, Bonfá E, et al. Prevalence of depressive and anxiety disorders in systemic lupus erythematosus and their association with anti-ribosomal P antibodies. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2008;32:695-700.
52. Haddouk S, Marzouk S, Jallouli M, Fourati H, Frigui M, Hmida YB, et al. Clinical and diagnostic value of ribosomal P autoantibodies in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford).* 2009;48:953-7
53. Hirohata S, Arinuma Y, Takayama M, Yoshio T. Association of cerebrospinal fluid anti-ribosomal p protein antibodies with diffuse

- psychiatric/neuropsychological syndromes in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther.* 2007;9:R44
54. Yoshio T, Hirata D, Onda K, Nara H, Minota S. Antiribosomal P protein antibodies in cerebrospinal fluid are associated with neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 2005;32:34-9.
55. Katzav A, Solodeev I, Brodsky O, Chapman J, Pick CG, Blank M, et al. Induction of autoimmune depression in mice by anti-ribosomal P antibodies via the limbic system. *Arthritis Rheum.* 2007;56:938-48.
56. Strous RD, Shoenfeld Y. To smell the immune system: olfaction, autoimmunity and brain involvement. *Autoimmun Rev.* 2006;6:54-60.
57. Blank M, Beinglass I, Shoenfeld Y. The therapeutic potential of targeting anti-Ribosomal-P antibody in treating SLE patients with depression. *Expert Opin Biol Ther.* 2007;7:1283-5.
58. Matus S, Burgos PV, Bravo-Zehnder M, Kraft R, Porras OH, Farías P, et al. Antiribosomal-P autoantibodies from psychiatric lupus target a novel neuronal surface protein causing calcium influx and apoptosis. *J Exp Med.* 2007;204:3221-34.
59. Moscovitch SD, Szyper-Kravitz M, Shoenfeld Y. Autoimmune pathology accounts for common manifestations in a wide range of neuro-psychiatric disorders: the olfactory and immune system interrelationship. *Clin Immunol.* 2009;130:235-43.
60. Hoffman IE, Lauwerys BR, De Keyser F, Huizinga TW, Isenberg D, Cebecauer L, et al. Juvenile-onset systemic lupus erythematosus: different clinical and serological pattern than adult-onset systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis.* 2009; 68:412-5.

Table 1. Clinical/Laboratorial and treatment features in anti-P+ and anti-P- cSLE patients.

Feature	Anti-P+ N=13	Anti-P – N=37
Demographic		
Age at disease onset (mean±SD)	13.07 (2.7)	12.16 (2.8)
Age at study entry (mean±SD)	17.23 (4.8)	17.73 (3.4)
Disease duration (mean±SD)	4.77 (3.9)	2.5 (2.3)
Women/men ratio	12/1	35/2
Clinical manifestations		
Arthritis	2 (15.4%)	2 (5.4%)
Alopecia	1 (7.7%)	2 (5.4%)
Malar Rash	2 (15.4%)	2 (5.4%)
Nephritis	2 (15.4%)	10 (27.0%)
Serositis	2 (15.4%)	1 (2.7%)
Vasculitis	1 (7.7%)	2 (5.4%)
Neuropsychiatric manifestations		
Anxiety	10 (76.92%)*	7 (18.9%)
Cognitive impairment	6 (66.67%)	21 (58.3%)
Depression	3 (23.07%)	4 (10.8%)
Seizure	1 (7.69%)	0
Coreia	1 (7.69%)	0

Laboratory manifestations		
Anticardiolipine or LA	7 (53.8%)	24 (64.9%)
Anti-Sm	4 (30.8%)	9 (24.3%)
Anti-SSA/Ro	3 (23.0%)	13 (35.1%)
dsDNA	2 (15.4%)	4 (10.8%)
Leukopenia	1 (7.7%)	1 (2.7%)
Thrombocytopenia	1 (7.7%)	1 (2.7%)
Treatment		
No medication	1 (7.7%)	6 (16.2%)
Prednisone	10 (76.9%)	33 (89.2%)
Hydroxychloroquine	7 (53.8%)	27 (72.9%)
Immunosuppressive drugs	5 (38.5%)	21 (56.7%)
	3	14
Azathioprine	0	0
	0	3
Ciclophosphamide	0	1
	2	3
Cyclosporine		
Methotrexate		
Mycophenolate mofetil		
SLEDAI \geq 3	7 (53.8%)	17 (45.9%)
SDI \geq 1	6 (46.2%)	9 (24.3%)

(*) $p < 0,05$