

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**AVALIAÇÃO PROSPECTIVA DOS NÍVEIS URINÁRIOS DE VCAM-1 SOLÚVEL  
COMO BIOMARCADOR DE NEFRITE EM PACIENTES COM LÚPUS  
ERITEMATOSO SISTÊMICO**

ANDRESE ALINE GASPARIN

Porto Alegre

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**AVALIAÇÃO PROSPECTIVA DOS NÍVEIS URINÁRIOS DE VCAM-1 SOLÚVEL  
COMO BIOMARCADOR DE NEFRITE EM PACIENTES COM LÚPUS  
ERITEMATOSO SISTÊMICO**

ANDRESE ALINE GASPARIN

Orientador: Prof. Dr. Odirlei André Monticielo  
Coorientador: Prof. Dr. Francisco José Veríssimo  
Veronese

Tese apresentada como requisito para obtenção do  
título de Doutor em Medicina: Ciências Médicas,  
da Universidade Federal do Rio Grande do Sul,  
Programa de Pós-Graduação em Medicina:  
Ciências Médicas.

Porto Alegre

2019

## FICHA CATALOGRÁFICA

### CIP - Catalogação na Publicação

Gasparin, Andrese Aline  
AVALIAÇÃO PROSPECTIVA DOS NÍVEIS URINÁRIOS DE  
VCAM-1 SOLÚVEL COMO BIOMARCADOR DE NEFRITE EM  
PACIENTES COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO / Andrese  
Aline Gasparin. -- 2019.  
147 f.  
Orientador: Odirlei André Monticielo.

Coorientador: Francisco José Veríssimo Veronese.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de  
Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto  
Alegre, BR-RS, 2019.

1. Lúpus eritematoso sistêmico. 2. Nefrite lúpica.  
3. Biomarcadores urinários. 4. VCAM-1. 5. Molécula de  
adesão celular vascular-1. I. Monticielo, Odirlei  
André, orient. II. Veronese, Francisco José  
Verissimo, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os  
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

**BANCA EXAMINADORA**

Professor Claiton Viegas Brenol (PPGCM)

Professor Rafael Mendonça da Silva Chakr (PPGCM)

Professor Charles Lubianca Kohem

Professora Elizete Keitel

## **Agradecimentos**

À minha amada mãe, Inês Gasparin (*in memoriam*), exemplo de força, dedicação e perfeição, de quem sinto saudades todos os dias da minha vida.

Ao meu querido pai Valdemar Gasparin, que me ensina sempre que a vida pode ser mais leve e divertida.

Ao meu esposo Arthur Brescovit Trotta, pela paciência, carinho e apoio incondicional, permitindo que eu pudesse realizar o meu trabalho de forma tranquila.

À minha irmã Taline Cristina Gasparin, pelo incentivo e entusiasmo com minhas pesquisas.

À minha segunda mãe e sogra Delurdes Brescovit Trotta, minha grande incentivadora.

À toda minha família, que mesmo distante se faz muito presente pelo carinho que me dedica.

Ao meu orientador Prof. Odirlei André Monticielo, exemplo de competência e dedicação, pelo carinho e preocupação com que orienta seus alunos e pela capacidade de nos contagiar com seu entusiasmo, nos levando mais longe do que sonhamos.

Ao meu coorientador Prof. Francisco José Veríssimo Veronese, pela atenção e pronta ajuda que contribuíram de forma significativa para o meu sucesso.

Às minhas amigas, quase-irmãs, e muito mais que colegas de trabalho, Dra. Penélope Esther Palominos, Dra. Nicole Pamplona Bueno de Andrade e Dra. Vanessa Hax, pelo companheirismo, zelo, carinho e amizade verdadeira.

Aos professores Sandra Helena Machado, Ricardo Machado Xavier, João Carlos Tavares Brenol, Charles Lubianca Kohem, Claiton Viegas Brenol e Rafael Mendonça da Silva Chakr, pelos valorosos ensinamentos de vida e de reumatologia.

Aos demais colegas de trabalho, Dra. Bruna de Lima Porto, Dr. Afonso Papke, Dra. Micheline Sulzbacher Batista, Maurício Simoni Candaten, Ana Laura Kunzler, Victória Carvalho, Gabriela Ratkiewicz Taffarel, Franciele de Almeida Menegat, Adriana Brentano e Daiana de Lima Morales, por tornarem meu trabalho no Hospital de Clínicas prazeroso.

À Marina Siebert, pela competência exemplar de sempre.

Ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre por me proporcionar um ambiente de trabalho favorável e estimular o desenvolvimento intelectual e pessoal de seus

funcionários.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, pela oportunidade de realizar meu doutorado.

Aos pacientes que fizeram parte desta pesquisa, pela colaboração em prol do crescimento do conhecimento científico.

A todos os demais que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão desse trabalho.

*“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”.*

*Isaac Newton*

## RESUMO

**Introdução:** Embora a avaliação histológica através da biópsia renal seja altamente preditiva do curso da nefrite lúpica (NL), ela não pode ser realizada repetidamente devido à sua natureza invasiva e à morbidade associada. Os biomarcadores tradicionais usados na prática clínica não são preditores acurados da classe histológica e da gravidade da NL nem são confiáveis na avaliação da resposta ao tratamento. A molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1) está envolvida na progressão da lesão glomerular e tubulointersticial na NL e pode ser facilmente dosada na urina.

**Objetivo:** O objetivo deste estudo foi avaliar o desempenho da VCAM-1 solúvel urinária (uVCAM-1) como biomarcador de atividade de doença e de resposta ao tratamento na NL.

**Métodos:** Este estudo prospectivo incluiu pacientes com NL classe III, IV ou V diagnosticada nos últimos três anos e os dividiu em dois grupos: com e sem nefrite ativa na inclusão. Em cada visita, uma amostra de urina foi coletada para dosagem de uVCAM-1 e o status da nefrite foi avaliado.

**Resultados:** O nível mediano de uVCAM-1 foi elevado em pacientes com NL ativa comparado com inativa ( $p < 0,001$ ). A curva ROC da uVCAM-1 demonstrou uma área sob a curva de 0,84 e um ponto de corte de 47,2 ng/mgCr apresentou boa sensibilidade (74,2%) e especificidade (74,2%) para o diagnóstico de NL ativa. Houve correlação significativa entre o nível de uVCAM-1 e os escores de atividade renal e os biomarcadores tradicionais de NL. O nível de uVCAM-1 reduziu nos pacientes com NL ativa que entraram em remissão ( $p < 0,001$ ), aumentou nos pacientes que entraram em atividade ( $p = 0,002$ ) e não sofreu alterações nos pacientes que permaneceram inativos ( $p = 0,797$ ). O nível de uVCAM-1 atingiu seu pico durante a ativação da NL ( $p < 0,05$ ).

**Conclusão:** A uVCAM-1 é um biomarcador confiável que reflete a atividade da doença renal sendo útil na monitorização de pacientes com nefrite lúpica ao longo do tempo.

**Palavras-chave:** nefrite lúpica, VCAM-1, molécula de adesão celular vascular, biomarcador urinário.



## ABSTRACT

**Introduction:** Although renal pathology is highly predictive of clinical outcomes in lupus nephritis (LN), it cannot be performed serially because of its invasive nature and associated morbidity. Traditional biomarkers used in the clinical practice are not accurate predictors of LN histological class and severity, nor are they reliable in assessing treatment response. Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) is involved in the progression of glomerular and tubulointerstitial injury in LN and can be easily assessed in urine.

**Objective:** The aim of this study was to assess urinary soluble VCAM-1 (uVCAM-1) as a biomarker of disease activity and treatment response in LN.

**Methods:** This prospective study enrolled patients with class III, IV or V LN diagnosed within the last three years and divided them in two groups: with and without active nephritis at the inclusion. At each visit, a urine sample was collected for uVCAM-1 evaluation and the nephritis status was accessed.

**Results:** Median uVCAM-1 level was elevated in patients with active compared to inactive LN ( $p<0.001$ ). The ROC curve of uVCAM-1 demonstrated an AUC of 0.84 and a cutoff of 47.2 ng/mgCr yielded a good sensitivity (74.2%) and specificity (74.2%) for the diagnosis of active LN. A significant correlation was found between uVCAM-1 level and renal activity scores and traditional biomarkers of LN. The level of uVCAM-1 dropped in patients with active LN who went into remission ( $p<0.001$ ), increased in patients who went into activity ( $p=0.002$ ) and did not change in patients who remained inactive ( $p=0.797$ ). The level of uVCAM-1 peaked during the flare of LN ( $p<0.05$ ).

**Conclusion:** The uVCAM-1 is a reliable biomarker that reflects renal disease activity and is useful for monitoring individual patients with lupus nephritis over time.

**Keywords:** lupus nephritis, VCAM-1, vascular cell adhesion molecule-1, urinary biomarker.

## LISTA DE FIGURAS DA REVISÃO DE LITERATURA

<b>Figura 1.</b> Fluxograma da estratégia de busca para localizar e selecionar as informações da pesquisa.....	18
<b>Figura 2.</b> Patogênese da nefrite lúpica.....	31
<b>Figura 3.</b> Mecanismos de lesão na nefrite lúpica.....	34
<b>Figura 4.</b> Variantes humanas de VCAM-1.....	50
<b>Figura 5.</b> Marco conceitual: níveis urinários de VCAM-1 solúvel como biomarcador de atividade da nefrite lúpica e de resposta ao tratamento.....	62

## LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO DE REVISÃO

<b>Figure 1.</b> Human VCAM-1 variants .....	101
--	-----

## LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO ORIGINAL

<b>Figure 1.</b> Analysis of uVCAM-1 according to nephritis status during follow-up.....	122
<b>Figure 2.</b> Urinary soluble VCAM-1 levels according to lupus nephritis status.....	125
<b>Figure 3.</b> Urinary soluble VCAM-1 levels at different time points relative to a lupus nephritis flare.....	126

## LISTA DE TABELAS DA REVISÃO DE LITERATURA

<b>Tabela 1.</b> Principais fatores genéticos envolvidos na predisposição de nefrite lúpica em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico.....	28
<b>Tabela 2.</b> Principais definições de remissão completa e parcial de nefrite lúpica.....	38
<b>Tabela 3.</b> Performance dos biomarcadores tradicionais na detecção de nefrite lúpica em atividade.....	42
<b>Tabela 4.</b> Principais biomarcadores urinários identificados e seus potenciais usos.....	46
<b>Tabela 5.</b> Resumo dos principais artigos publicados relacionando os níveis de uVCAM-1 e nefrite lúpica.....	60

## LISTA DE TABELAS DO ARTIGO DE REVISÃO

<b>Table 1.</b> Principal identified urinary biomarkers and their potential uses in lupus nephritis.....	97
<b>Table 2.</b> Results of the ROC analysis for diagnosis of active lupus nephritis.....	98
<b>Table 3.</b> Summary of main published articles relating urinary soluble VCAM-1 and lupus nephritis .....	105

## LISTA DE TABELAS DO ARTIGO ORIGINAL

<b>Table 1.</b> Baseline demographics, clinical characteristics, laboratory findings, disease scores and medications.....	120
<b>Table 2.</b> Combination of conventional biomarkers and urinary soluble VCAM-1 for the diagnosis of active LN.....	123
<b>Table 3.</b> Correlations between urinary soluble VCAM-1 and other LN biomarkers/disease scores.....	123

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACR	<i>American College of Rheumatology</i>
ADAM	<i>A desintegrin and metalloproteinase</i>
AINEs	Anti-inflamatórios não-esteroidais
ANCA	<i>Antineutrophil cytoplasmic antibodies</i>
Anti-dsDNA	<i>Anti-double stranded DNA</i>
CCF	Ciclofosfamida
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
EQU	Exame qualitativo de urina
EULAR	<i>European League Against Rheumatism</i>
FAN	Fator antinuclear
GESF	Glomeruloesclerose segmentar focal
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i>
ICAM	<i>Intercellular Adhesion Molecule</i>
iECA	Inibidor da enzima de conversão da angiotensina
IFN- $\alpha$	Interferon alfa
IFN- $\gamma$	Interferon gama
IL	Interleucina
IPC	Índice proteinúria/creatinúria em amostra de urina
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
LES	Lúpus eritematoso sistêmico
MCP	<i>Monocyte chemoattractant protein</i>
MBG	Membrana basal glomerular
MMF	Micofenolato mofetil
NETs	<i>Neutrophil extracellular traps</i>

NGAL	<i>Neutrophil gelatinase-associated lipocalin</i>
NL	Nefrite lúpica
PGA	<i>Physician global estimate of disease activity</i>
RC	Remissão completa
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RPS/ISN	<i>The Renal Pathology Society/ International Society of Nephrology</i>
rSLAM-R	<i>Renal SLE Activity Measure revised</i>
SLEDAI	<i>Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index</i>
SLICC	<i>Systemic Lupus International Collaborating Clinics</i>
SLICC renal	<i>SLICC Renal Activity/Response Exercise</i>
TFG	Taxa de filtração glomerular
TGF- $\beta$	<i>Transforming Growth Factor Beta</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF- $\alpha$	<i>Tumor Necrosis Factor alpha</i>
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule-1</i>
sVCAM-1	VCAM-1 sérica
uVCAM-1	VCAM-1 urinária
VLA-4	<i>Very late antigen-4</i>

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	16
2. REVISÃO DA LITERATURA .....	17
2.1 Estratégias para localizar e selecionar as informações .....	17
2.2 Epidemiologia .....	20
2.2.1 <i>Lúpus eritematoso sistêmico</i> .....	20
2.2.2 <i>Nefrite lúpica</i> .....	20
2.3 Diagnóstico e manifestações clínicas .....	21
2.3.1 <i>Lúpus eritematoso sistêmico</i> .....	21
2.3.2 <i>Nefrite lúpica</i> .....	22
2.4 <i>Patogênese da nefrite lúpica</i> .....	28
2.5 Tratamento da nefrite lúpica.....	35
2.6 Índices de atividade de doença .....	40
2.7 Biomarcadores de nefrite lúpica .....	41
2.7.1 <i>Biomarcadores tradicionais de nefrite lúpica</i> .....	43
2.7.1.1 Anti-dsDNA.....	43
2.7.1.2 Complementos.....	44
2.7.1.3 Proteinúria .....	45
2.7.2 <i>Biomarcadores urinários de nefrite lúpica</i> .....	46
2.8 Inflamação e moléculas de adesão celular .....	48
2.9 A molécula de adesão celular vascular -1 (VCAM-1).....	50
2.10 VCAM-1 e o lúpus eritematoso sistêmico .....	53
2.11 Níveis urinários de VCAM-1 solúvel e nefrite lúpica.....	55
3 MARCO CONCEITUAL .....	62
4 JUSTIFICATIVA.....	64
5 OBJETIVOS.....	65
5.1 Objetivo primário .....	65

5.2	Objetivos secundários .....	65
6	REFERÊNCIAS .....	66
7	ARTIGOS EM INGLÊS.....	96
7.1	Artigo de revisão.....	96
7.2	Artigo original.....	114
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	136
9	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	137
10	ANEXOS .....	138
	ANEXO I. Critérios de classificação do ACR para LES revisados em 1997 .....	138
	ANEXO II. Critérios de classificação de 2012 do SLICC para LES .....	139
	ANEXO III. Classificação 2003 da ISN/RPS para nefrite lúpica .....	140
	ANEXO IV. Classificação de 1982 da OMS/ISKDC para nefrite lúpica .....	140
	ANEXO V. Termo de consentimento livre e esclarecido .....	141
	ANEXO VI. The systemic lupus erythematosus disease activity index 2000 (SLEDAI-2k) .....	143
	ANEXO VII. The renal systemic lupus activity measure revised renal (rSLAM-R).....	144
	ANEXO VIII. Systemic lupus international collaborating clinics renal activity/response exercise (SLICC renal).....	144
	ANEXO IX. The systemic lupus international collaborating clinics/American College of Rheumatology damage index (SLICC/ACR damage index) .....	145
	ANEXO X. Declaração STROBE (Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology) - checklist of items that should be included in reports of observational studies .....	146

## 1. INTRODUÇÃO

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença autoimune crônica, heterogênea, de etiologia ainda não completamente conhecida, que tem como característica a produção de autoanticorpos e o acometimento de múltiplos sistemas orgânicos (1). O envolvimento renal ocorre em cerca de 60% dos pacientes (2) e é um dos principais preditores de morbidade e de mortalidade (3).

Existem diferentes subtipos histológicos de nefrite lúpica (NL) e o tratamento adequado varia conforme o seu subtipo (4). Embora a apresentação clínica, a avaliação do exame qualitativo de urina (EQU) e do sedimento urinário e a estimativa da função renal possam sugerir um subtipo específico, a biópsia renal ainda é o padrão ouro para confirmar o diagnóstico e a correta classificação da NL. Contudo, além de ser um procedimento invasivo com riscos associados, a biópsia renal está disponível apenas em centros de atendimento de maior complexidade, o que limita sua utilização. Além disso, sua repetição seriada não está indicada para o seguimento de pacientes com NL.

Atualmente, o *anti-double stranded DNA* (anti-dsDNA), os complementos séricos e a proteinúria são os únicos biomarcadores não invasivos usados rotineiramente no acompanhamento da atividade renal em pacientes com NL (5), no entanto, eles não refletem o dano renal tampouco têm valor prognóstico. Desta forma, torna-se interessante a descoberta de biomarcadores capazes de antecipar a atividade de doença, de predizer a histologia renal e de possibilitar tratamento mais precoce, reduzindo os desfechos indesejados.

Os biomarcadores urinários são facilmente obtidos e podem diferenciar com maior acurácia a atividade renal da doença de outras manifestações sistêmicas do que os biomarcadores séricos (6). Diversos estudos já foram realizados e correlacionaram os níveis urinários da molécula de adesão celular vascular 1 solúvel (uVCAM-1) com o índice proteinúria/creatinúria em amostra de urina (IPC), com a atividade de doença geral



avaliada através do *Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index* (SLEDAI) (7,8) e com a presença de NL ativa (9,10), sendo que os pacientes com alterações histológicas mais avançadas (nefrite classe III, IV e V com maior dano na biópsia renal) apresentaram os valores mais elevados (11,12). Contudo, são necessários estudos prospectivos analisando o papel do uVCAM-1 na predição de atividade de doença e na monitorização da resposta ao tratamento, para avaliarmos sua utilidade como biomarcador de NL.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Estratégias para localizar e selecionar as informações

Esta revisão da literatura buscou identificar artigos originais avaliando o papel do uVCAM-1 como biomarcador de atividade de nefrite em pacientes com LES. A estratégia de busca envolveu as seguintes bases de dados: *MEDLINE* (PubMed), *EMBASE* e *LILACS* além dos anais de congresso: *EULAR* (*European League Against Rheumatism*) e *ACR* (*American College of Rheumatology*) a partir do ano de 2010.

Estratégia de busca no PubMed: a busca realizada no dia 26/08/2019 usando os seguintes termos *MeSH*: ["*Vascular Cell Adhesion Molecule-1*"][*Mesh*] OR (*Vascular Cell Adhesion Molecule 1*) OR (*Inducible Cell Adhesion Molecule 110*) OR (*INCAM-110*) OR (*CD106 Antigens*) OR (*CD106 Antigen*) OR (*Antigen, CD106*) OR (*Antigens, CD106*) OR (*Vascular Cell Adhesion Molecule*) OR (*VCAM-1*) AND ("*Lupus Nephritis*")[*Mesh*] OR (*Lupus Glomerulonephritis*) OR (*Nephritis, Lupus*) OR (*Lupus Nephritides*) OR (*Nephritides, Lupus*) OR (*Glomerulonephritis, Lupus*) OR (*Glomerulonephritides, Lupus*) OR (*Lupus Glomerulonephritides*) AND ("*Biomarkers*")[*Mesh*] OR (*Markers, Biological*) OR (*Biologic Markers*) OR (*Markers, Biologic*) OR (*Biologic Marker*) OR (*Marker, Biologic*) OR (*Marker, Biologica*) OR (*Biological Marker*) OR (*Biological*

*Markers) OR (Markers, Laboratory) OR (Laboratory Markers) OR (Laboratory Marker) OR (Marker, Laboratory) OR (Serum Markers) OR (Markers, Serum) OR (Marker, Serum) OR (Serum Marker) OR (Surrogate Endpoints) OR (Endpoints, Surrogate) OR (Surrogate End Points) OR (End Points, Surrogate) OR (Surrogate End Point) OR (End Point, Surrogate) OR (Surrogate Endpoint) OR (Endpoint, Surrogate) OR (Markers, Clinical) OR (Clinical Markers) OR (Clinical Marker) OR (Marker, Clinical) OR (Biochemical Marker) OR (Biochemical Markers) OR (Markers, Biochemical) OR (Marker, Biochemical) OR (Markers, Immunologic) OR (Immune Markers) OR (Markers, Immune) OR (Marker, Immunologic) OR (Immunologic Markers) OR (Immune Marker) OR (Marker, Immune) OR (Immunologic Marker) OR (Surrogate Markers) OR (Markers, Surrogate) OR (Marker, Surrogate) OR (Surrogate Marker)))]*, localizou 43 artigos.

Estratégia de busca no EMBASE: a busca realizada no dia 26/08/2019 usando os seguintes termos “mtree”: (*'lupus erythematosus nephritis'/exp OR 'glomerulonephritis, lupoid' OR 'lupoid nephritis' OR 'lupus glomerulonephritis' OR 'lupus kidney' OR 'lupus nephritis' OR 'lupus nephropathy'*) AND (*'vascular cell adhesion molecule 1'/exp OR 'CD106 antigen' OR 'VCAM 1'*) AND (*'biological marker'/exp OR 'biomarker' OR 'marker, biological'*) AND (*'urine level'/exp*), localizou 11 artigos.

Estratégia de busca LILACS: a busca realizada no dia 26/08/19 usando os seguintes termos “DECS”: (*tw:("lupus nephritis")*) AND (*tw:("vascular cell adhesion molecule 1")*) AND (*tw:(biomarkers)*) AND (*tw:(urinary)*), resultou em 15 artigos. A figura 1 apresenta o modelo esquemático da estratégia de busca na literatura.

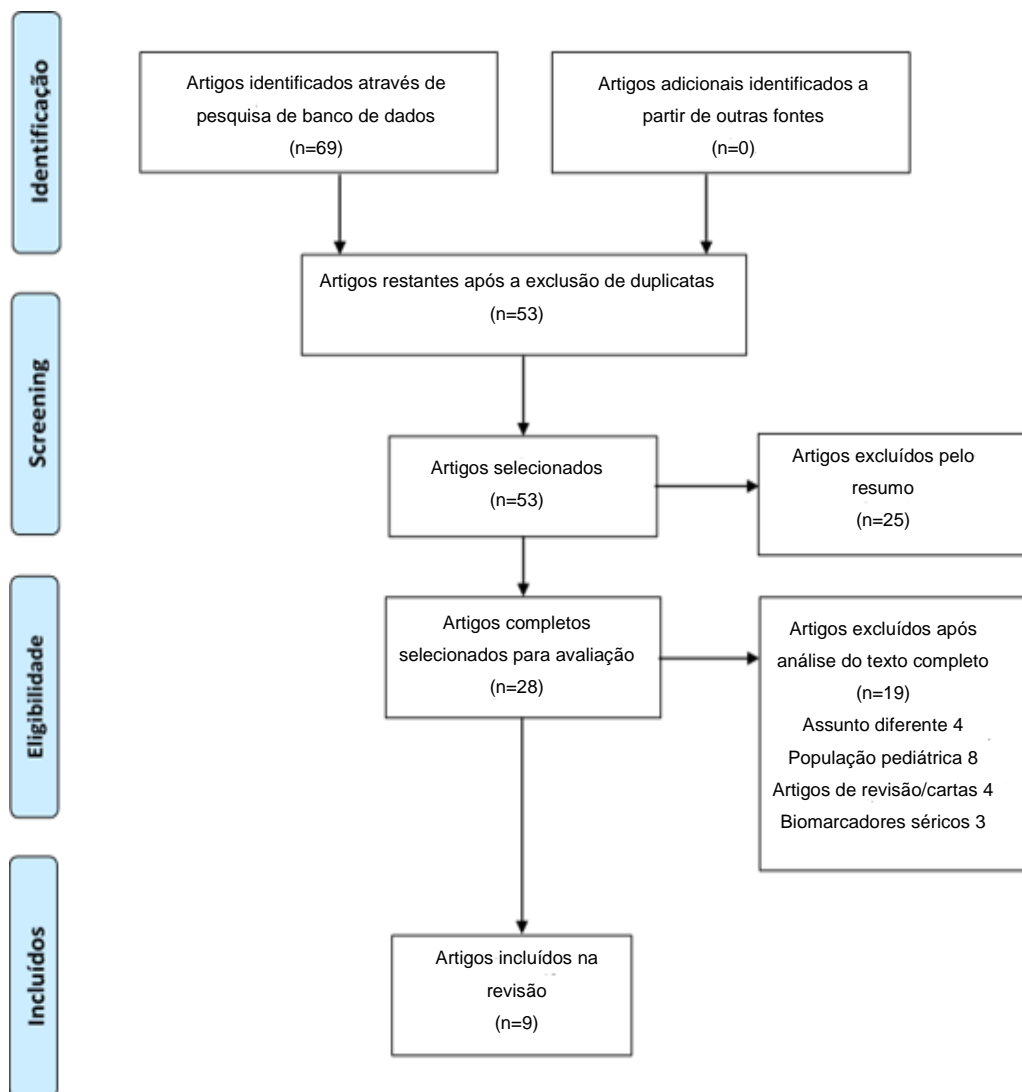


Figura 1. Fluxograma da estratégia de busca para localizar e selecionar as informações da pesquisa

## **2.2 Epidemiologia**

### ***2.2.1 Lúpus eritematoso sistêmico***

A incidência anual de LES nos Estados Unidos varia entre de 1,8 a 7,6 casos/100.000 pessoas por ano (13,14). Estudo brasileiro realizado em Natal (RN) em 2000 encontrou taxa de incidência de 8,7 por 100.000/ano, sendo 14,1 para mulheres e 2,2 para homens (15). A prevalência global do LES nos Estados Unidos e Hawaii tem sido reportada variando entre 14,6 e 122 casos/100.000 pessoas (13,14,16). Em mulheres, as taxas de prevalência variam de 164 (caucasianas) a 406 (afroamericanas) por 100.000 (17).

### ***2.2.2 Nefrite lúpica***

A doença renal clinicamente evidente ocorre eventualmente em até 60% dos pacientes com LES (18,19). Variações nas estimativas de prevalência ocorrem de estudo para estudo e podem ser devidas a diferenças raciais e a formas distintas de definição de nefrite (20–22).

Um estudo que incluiu 1.000 pacientes consecutivos de 12 centros clínicos europeus encontrou uma prevalência de nefropatia de 16% (definida como proteinúria >0,5 g/dia ou mais de 3+ de proteinúria no multistix, cilindros celulares ou elevação não explicada da creatinina sérica de pelo menos 0,8 mg/dL), por ocasião do diagnóstico de LES (18).

Durante 10 anos de seguimento, 28% desenvolveram nefropatia, embora não tenha ficado claro se representavam apenas casos novos ou incluíam também doença recorrente (23). Outro trabalho incluiu 1.378 pacientes com LES nos EUA e encontrou 32% de prevalência de doença renal (definida por proteinúria >0,5 g/dia,  $\geq 5$  cilindros hemáticos por campo de grande aumento, creatinina sérica  $\geq 1,5$  mg/dL ou necessidade

de diálise ou transplante renal) dentro de um ano do diagnóstico de LES (19).

A incidência de NL é maior em negros (34 a 51%), hispânicos (31 a 43%) e asiáticos (33 a 55%) que em brancos (14 a 23%) (20,24,25). Negros e hispânicos também tendem a apresentar alterações histopatológicas de maior gravidade, níveis séricos de creatinina mais elevados e maior proteinúria que brancos (26). Negros, hispânicos e pacientes de baixo status socioeconômico também apresentam pior prognóstico.

A maioria das alterações renais surgem, comumente, dentro dos primeiros seis meses à três anos após o diagnóstico de LES (24,27). O curso de tempo necessário para desenvolver NL varia de acordo com o gênero, idade e etnicidade. Em um estudo retrospectivo norte-americano, homens, pacientes mais jovens (com menos de 33 anos ao diagnóstico) e não-brancos, apresentaram risco elevado de desenvolver NL mais cedo no curso da doença (24).

## **2.3 Diagnóstico e manifestações clínicas**

### **2.3.1 *Lúpus eritematoso sistêmico***

A heterogeneidade clínica e a falta de características patognomônicas tornam o diagnóstico de LES um desafio. A exclusão de diagnósticos diferenciais é um passo importante no processo diagnóstico. Os critérios de classificação devem ser usados como guias para ajudar a identificar algumas características relevantes da doença, lembrando que eles foram criados com o objetivo de classificar pacientes para padronização da linguagem científica em estudos clínicos. A história clínica detalhada e o exame físico completo são fundamentais, devendo os exames de laboratório serem complementares a esta investigação. Alguns marcadores sorológicos como o anti-dsDNA e anti-*Smith* (Sm) são importantes pois têm alta especificidade (28).

O diagnóstico de LES pode ser estabelecido quando são encontrados pelo menos

4 de 11 critérios de classificação do *American College of Rheumatology* (ACR) de 1982 e modificado em 1997 (29) (ANEXO I) ou 4 ou mais de 17 critérios do *Systemic Lupus International Collaborating Clinics* (SLICC) de 2012 (30) (ANEXO II), incluindo pelo menos 1 de 11 critérios clínicos e 1 de 6 critérios imunológicos ou quando houver biópsia renal compatível com NL na presença de fator antinuclear (FAN) ou anti-dsDNA.

### **2.3.2 Nefrite lúpica**

Pacientes com LES devem ser monitorizados com exames para avaliação de envolvimento renal em intervalos regulares de tempo. O diagnóstico de NL deve ser suspeitado na presença de alterações em exame de análise urinária (sedimento com hematúria, leucocitúria ou cilindros celulares), na presença de proteinúria, alterações da creatinina sérica ou da estimativa da taxa de filtração glomerular.

Títulos elevados de anti-dsDNA e reduzidos de complementos (C3 e C4), podem indicar LES em atividade, particularmente NL, embora a utilidade desta avaliação sorológica seja diferente entre os pacientes. Estes biomarcadores tradicionais têm baixa sensibilidade (49 a 79%) e especificidade (51 a 74%) para atividade renal atual e não predizem com confiabilidade atividade renal quando medidos de forma seriada, com sensibilidade e especificidade por volta de 50 e 70%, respectivamente (5,31–36).

Uma biópsia renal deve ser realizada nos pacientes que apresentarem evidências de acometimento renal, com o objetivo de estabelecer o diagnóstico e a classe histológica da NL. Contudo, pacientes com proteinúria menor que 500 mg/dia que não apresentem alterações importantes de sedimento urinário, não necessitam realizar biópsia renal. Tais pacientes geralmente não apresentam uma classe de nefrite que necessite de terapia imunossupressora, a menos que seja notada piora da função renal ao longo do seguimento ou alterações mais importantes do sedimento urinário e da proteinúria (28).

Algumas alterações histopatológicas, embora não patognomônicas, são altamente

características de NL, como por exemplo:

- Imunofluorescência com depósitos glomerulares compostos predominantemente por IgG, apresentando também IgA, IgM, C3 e C1q. Padrão conhecido como “*full house*”. Este padrão, contudo, pode ser encontrado também em pacientes com endocardite (37), HIV (*Human Immunodeficiency Virus*) (38), Hepatite C (39), *shunt* portossistêmico (40) e glomerulonefrite pós-estreptocócica.
- Depósitos glomerulares encontrados simultaneamente em localização mesangial, subendotelial e subepitelial.
- Depósitos do tipo imunológico extraglomerulares dentro de membranas basais tubulares, interstício e vasos sanguíneos.
- Inclusões tubuloreticulares nas células endoteliais glomerulares. A síntese destas inclusões é estimulada pelo interferon alfa (IFN- $\alpha$ ) (41). Podem ser encontradas também em pacientes com nefropatia por HIV e nos que estão realizando tratamento com IFN- $\alpha$ .

Determinar a classe da NL é importante pois o tratamento é guiado pelo subtipo histológico, além disso, a apresentação clínica pode não refletir acuradamente a gravidade dos achados histológicos. Nas últimas duas décadas, houve diversas tentativas por diferentes sociedades de se elaborar um sistema de classificação das diferentes glomerulopatias associadas ao LES. Um grupo de patologistas, nefrologistas e reumatologistas desenvolveu no ano de 2004 um sistema de classificação da NL baseado na correlação clínico-patológica (*The Renal Pathology Society/International Society of Nephrology*, ou classificação RPS/ISN) (42) (ANEXO III). Esta classificação parece ter maior reprodutibilidade quando comparada com o sistema da Organização Mundial da Saúde modificado em 1982 (43) (ANEXO IV).

O sistema de classificação da RPS/ISN divide as alterações glomerulares associadas ao LES em seis diferentes padrões ou classes baseadas na histopatologia da

biópsia renal (42). Embora as diferentes classes tendam a apresentar diferentes características histológicas, clínicas e prognósticas, existe uma substancial sobreposição devida, em parte, a variações na amostra. Além disso, significativa parcela dos pacientes evoluem de uma classe para outra após tratamento ou mesmo espontaneamente (42,44–46). Nenhum marcador de atividade de doença disponível até o momento, sérico ou urinário, proporciona o grau de informação obtido através da histopatologia.

- ***Nefrite lúpica mesangial mínima (classe I)***: os pacientes não apresentam alterações no exame comum de urina, a proteinúria é ausente ou discreta, e a creatinina sérica é normal. Na biópsia, apresenta depósitos imunes mesangiais que são identificados por imunofluorescência ou microscopia eletrônica, mas não apresenta alterações à microscopia óptica. Representa a forma mais inicial e leve de envolvimento glomerular.
- ***Nefrite lúpica proliferativa mesangial (classe II)***: pode se manifestar clinicamente com hematúria microscópica e/ou proteinúria, porém, hipertensão, síndrome nefrótica e perda de função renal são muito raras. A microscopia óptica mostra hiperplasia mesangial de qualquer grau ou expansão da matriz mesangial. Na imunofluorescência, encontramos depósitos imunes mesangiais granulares. Os depósitos subepiteliais ou subendoteliais não são comuns, mas podem ser encontrados em pequena quantidade e de forma isolada. Na microscopia eletrônica, encontramos depósitos eletrodensos dentro da matriz mesangial. Uma extensa obliteração podocitária com síndrome nefrótica pode raramente ser vista, semelhante à glomerulopatia por lesões mínimas.
- ***Nefrite lúpica focal (classe III)***: os pacientes geralmente se apresentam com proteinúria e hematúria e alguns ainda com hipertensão, redução da taxa de filtração glomerular e/ou síndrome nefrótica. A nefrite classe III é definida histologicamente por:



- ✓ Menos de 50% dos glomérulos são afetados na microscopia óptica. Apesar disso, a imunofluorescência (para IgG e C3) revela envolvimento quase uniforme (47).
- ✓ A glomerulonefrite extracapilar ou endocapilar inativa ou ativa é quase sempre segmentar (envolve menos de 50% do tufo glomerular) (42). A microscopia eletrônica frequentemente revela depósitos imunes no espaço subendotelial da parede do capilar glomerular bem como no mesângio. Existem subclasses que são determinadas pela atividade inflamatória ou cronicidade das lesões (42):
  - ✓ Classe III (A): apresenta lesões ativas. É chamada também de NL proliferativa focal;
  - ✓ Classe III (A/C): está associada com lesões ativas e crônicas. É chamada também de NL proliferativa focal e esclerosante;
  - ✓ Classe III (C): são observadas lesões crônicas, inativas, com cicatrizes. É chamada também de NL focal esclerosante.

Características histológicas adicionais incluem a proporção de glomérulos afetados por necrose fibrinoide e crescentes e a presença ou ausência de anormalidades vasculares ou tubulointersticiais.

Pode ser difícil definir o prognóstico da nefrite classe III devido à falta de acurácia em determinar a porcentagem dos glomérulos envolvidos, principalmente quando a amostra apresentar pequeno número de glomérulos.

- **Nefrite lúpica difusa (classe IV):** esta é a forma mais comum e mais grave de NL (48). Hematúria e proteinúria estão presentes em virtualmente todos os pacientes com classe IV ativa e síndrome nefrótica, hipertensão e redução da taxa de filtração glomerular são frequentemente vistas. Os pacientes afetados apresentam

hipocomplementenemia significativa (principalmente C3) e elevação do anti-dsDNA, especialmente quando a doença está ativa (49). A nefrite classe IV é definida histologicamente por:

- ✓ Mais de 50% dos glomérulos são afetados na microscopia óptica.
- ✓ Os glomérulos afetados apresentam glomerulonefrite endocapilar, com ou sem glomerulonefrite extracapilar. Estas lesões podem ser segmentares (envolvendo menos de 50% do tufo glomerular) ou globais (envolvendo mais de 50% do tufo glomerular). Alterações mesangiais também podem ser observadas. A microscopia eletrônica revela depósitos subendoteliais, pelo menos, durante a fase ativa. A presença de depósitos em alça de arame difusos, mas com proliferação glomerular pequena ou ausente também é considerada glomerulonefrite classe IV.

Existem subdivisões da nefrite classe IV que levam em conta a forma de acometimento do glomérulo: segmentar (S) ou global (G) e a presença de atividade inflamatória ou cronicidade das lesões (42):

- ✓ Classe IV-S (A): apresenta lesões ativas. É chamada também de nefrite proliferativa segmentar difusa;
- ✓ Classe IV-G (A): apresenta lesões ativas. É chamada também de nefrite proliferativa global difusa;
- ✓ Classe IV-S (A/C): associada com lesões ativas e crônicas. É também chamada de nefrite segmentar difusa proliferativa e esclerosante;
- ✓ Classe IV-G (A/C): associada com lesões ativas e crônicas. É também chamada de nefrite global difusa proliferativa e esclerosante;

- ✓ Classe IV-S (C): associada com lesões crônicas, inativas e com cicatrizes. É também chamada de nefrite difusa segmentar esclerosante;
- ✓ Classe IV-G (C): associada com lesões crônicas, inativas e com cicatrizes. É também chamada de nefrite difusa global esclerosante.

Com doença ativa, lesões necrotizantes, proliferativas e formação de crescentes podem estar presentes, afetando mais de 50% dos glomérulos na microscopia óptica (47,48). A deposição marcada de imunoglobulinas (especialmente IgG) e complementos (C3), resulta em espessamento da parede capilar glomerular e um padrão na microscopia óptica semelhante ao da glomerulonefrite membranoproliferativa. Estas lesões são caracterizadas pelo marcado influxo de células pró-inflamatórias (monócitos, células T citotóxicas), algumas vezes resultando na formação de crescentes celulares (50,51).

- ***Nefropatia membranosa lúpica (Classe V):*** Pacientes com NL classe V tipicamente apresentam-se com sinais de síndrome nefrótica. Hematúria microscópica e hipertensão também podem ser vistas e a creatinina sérica encontra-se normal ou discretamente elevada. É caracterizada por espessamento difuso da parede capilar glomerular na microscopia óptica e por depósitos imunes subepiteliais na imunofluorescência ou na microscopia eletrônica.
- ***Nefrite lúpica esclerosante avançada (classe VI):*** o paciente geralmente apresenta disfunção renal lentamente progressiva em associação com proteinúria e alterações discretas de sedimento urinário. É caracterizada por esclerose global de mais de 90% dos glomérulos, que representa cicatrização de dano inflamatório

prévio bem como o estágio avançado da NL classes III, IV e V crônicas. A glomerulonefrite ativa não deve ser observada. A identificação desta classe via biópsia renal é importante, desde que não está indicada terapia imunossupressora nestes casos.

#### ***2.4 Patogênese da nefrite lúpica***

Apesar de diversos estudos terem identificado mais de 50 polimorfismos no LES associados ao risco genético, até o momento, poucos fatores de risco genético específicos para NL foram consistentemente identificados (52). A predisposição à NL parece envolver uma combinação de genes de suscetibilidade geral ao LES e genes com função renal, que são associados especificamente com NL (53).

Os polimorfismos dos alelos dos receptores de imunoglobulina FC-gama-RIIa-H131, presentes em macrófagos, foram associados com suscetibilidade à NL (54,55), porém, existem dados conflitantes (56). Outros estudos notaram a associação entre polimorfismos do alelo do receptor Fc-gama-RIIIa-F158 e Fc-gama-RIIIb e NL (57,58). Estes polimorfismos resultam na alteração da avidéz de ligação dos receptores a sua subclasse específica de IgG o que, hipoteticamente, permite a deposição inadequada de imunocomplexos circulantes nos rins e seu *clearance* inadequado por macrófagos hepáticos e esplênicos (54). Duas variantes do gene APOL1 que são encontradas quase que exclusivamente em afro-americanos foram associadas com glomeruloesclerose e progressão de doença na NL (59). A tabela 1 resume os principais fatores genéticos envolvidos na predisposição de NL em pacientes com LES.

Tabela 1. Principais fatores genéticos envolvidos na predisposição de NL em pacientes com LES

<b>Genes associados com LES e NL</b>			
<b>Nome do gene</b>	<b>Cromossomo</b>	<b>Função conhecida</b>	<b>Referência</b>
HLA-DR	6	Apresentação de antígeno	(60–63)
ITGAM	16	<i>Clearance</i> de imunocomplexos	(60,61,64–66)
FcγR 2A	1	<i>Clearance</i> de imunocomplexos	(54,55,67)
FcγR 3A			(57,68–71)
IRF5	7	Imunidade inata, via do IFN alfa	(61)
TNIP1	5	Inibição da via do NF-kappa-B	(52,61,72)
STAT4	2	Sinalização de célula T	(61,73)
TNFSF4	1	Fator coestimulatório para ativação da célula T	(60,66,74)
<b>Genes não associados ao LES, mas associados à NL</b>			
<b>Nome do gene</b>	<b>Cromossomo</b>	<b>Função conhecida</b>	<b>Referência</b>
APOL1	22	Imunidade inata, autofagia	(59)
PDGFRA	2	Desenvolvimento renal	(60)
HAS2	8	Fibrose orgânica	(60)

APOL1: apolipoproteína L-1; FcγR: receptor gama Fc; HAS2: *hyaluronan synthase 2*; IFN: interferon; ITGAM: integrina alfa M; LES: lúpus eritematoso sistêmico; NF-kappa-B: fator nuclear kappa B; NL: nefrite lúpica; PDGFRA: receptor alfa do fator de crescimento derivado de plaquetas; STAT4: transdutor de sinal e ativador da transcrição 4; TNFSF4:superfamília 4 do fator de necrose tumoral; TNIP1: proteína de interação 1; Adaptado de Iwamoto, T. et al (53).

O padrão do dano glomerular visto no LES é relacionado primariamente ao local de formação dos depósitos imunes, os quais são constituídos principalmente por DNA e por anticorpos anti-dsDNA. Além de formar imunocomplexos com o DNA, alguns anticorpos anti-dsDNA podem se ligar diretamente a componentes da membrana basal glomerular (MBG) e mesângio (75,76). Na NL, os depósitos de imunocomplexos podem ocorrer nos compartimentos mesangial, subendotelial e/ou subepitelial dos glomérulos.

Os imunocomplexos podem se depositar em ambos os lados da MBG e tanto a sua quantidade quanto a sua localização se correlacionam com a gravidade da doença. Dados substanciais associam defeitos nos mecanismos de depuração de células apoptóticas à apresentação de nucleossomos contendo DNA com revestimento catiônico de histonas para o sistema imunológico provocando resposta autoimune (77–79). A resposta anti-DNA e antinucleossômica dos linfócitos B leva à formação de depósitos imunes nos glomérulos que contêm esses componentes nucleossômicos. Estudos de anticorpos eluídos a partir de glomérulos de pacientes com NL proliferativa revelam que estes se dirigem principalmente contra os componentes das *neutrophil extracellular traps* (NETs) - nucleossomos, DNA e histonas (80). Não se sabe se em humanos estes depósitos refletem o aprisionamento passivo de imunocomplexos pré-formados ou a formação *in situ* de depósitos provavelmente iniciada pela ligação do componente altamente catiônico da histona dos nucleossomos aos sítios aniônicos glomerulares. No entanto, o grau de inflamação induzida pelos depósitos sugere uma origem *in situ* (81). Depósitos mesangiais e subendoteliais em doença proliferativa provavelmente tem origem semelhante.

Os depósitos que se limitam ao mesângio e poupam as alças capilares estão associados à nefrite classe I e II. Os depósitos subendoteliais, localizam-se entre o endotélio e a MBG, são encontrados nas nefrites classe III e IV, e têm acesso ao espaço vascular. Por causa disso, resultam na ativação do complemento (tipicamente a via

clássica) com a produção de quimioatratores, C3a e C5a, resultando no influxo de neutrófilos e células mononucleares, levando ao dano endotelial subsequente.

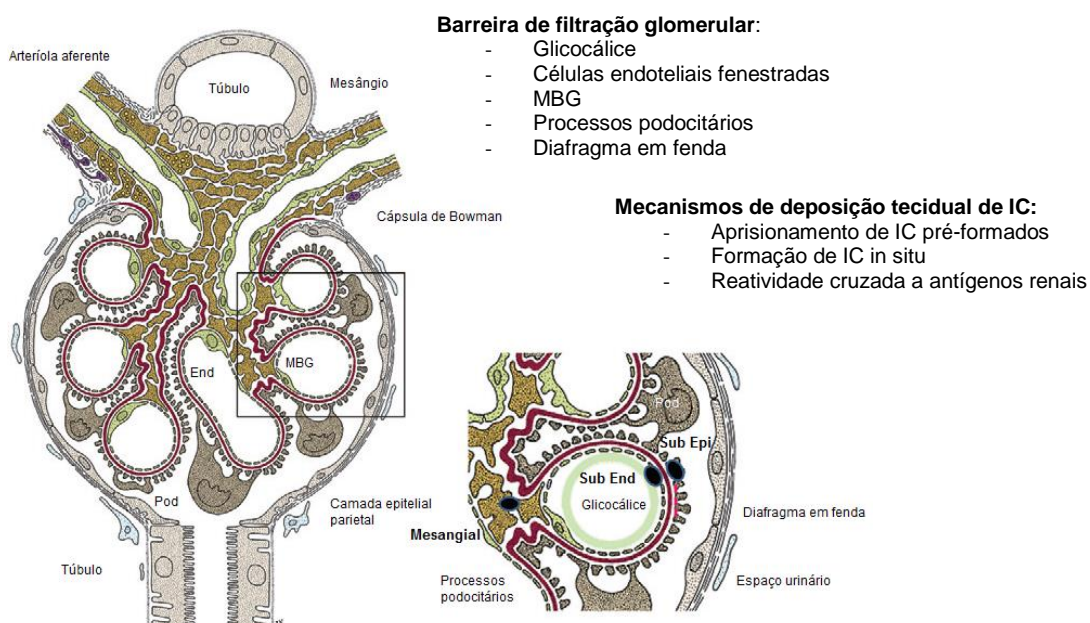
Cerca de 10-20% dos pacientes com NL terão lesões glomerulares membranosas ou Classe V (82). Em comparação à nefropatia membranosa primária, em que os depósitos imunes são compostos de IgG4 e são exclusivamente subepiteliais, na nefropatia lúpica membranosa os depósitos de IgG são compostos de IgG1-3 e contêm outras classes de imunoglobulinas incluindo IgM, IgA e IgE. Apesar de serem predominantemente subepiteliais, podem ser normalmente encontrados em sítios subendoteliais e mesangiais, além de serem acompanhados por estruturas túbulo-reticulares semelhante à viral (83,84).

É importante, também, distinguir estes indivíduos daqueles que apresentam podocitopatia lúpica, na qual ocorre síndrome nefrótica grave não explicável pela escassez de depósitos de complexos imunes na biópsia (85). Atualmente acredita-se que estes pacientes tenham uma variante da síndrome nefrótica de lesão mínima sobreposta a uma NL relativamente discreta (85). Na NL classe V, o dano podocitário mediado pelo complemento induz à deposição excessiva de matriz, levando a alterações estruturais da MBG e expressando-se clinicamente com proteinúria.

Embora os depósitos subepiteliais também possam ativar o complemento, não há influxo de células inflamatórias, já que os quimioatratores são separados da circulação pela MBG. Além disso, os mediadores inflamatórios recrutados por esses depósitos subepiteliais são diluídos no espaço urinário e excretados, limitando o número de células inflamatórias e o dano local.

Os depósitos mesangiais são encontrados na maioria das classes de NL e podem induzir a superprodução de mediadores inflamatórios, fatores de crescimento e matriz extracelular pelas células mesangiais. Alguns depósitos de imunocomplexos também têm

sido reportados na vasculatura e no espaço tubulointersticial. A figura 2 ilustra a patogênese da NL.



**Figura 2. Patogênese da nefrite lúpica. Os depósitos de imunocomplexos podem ser encontrados em ambos os lados da membrana basal glomerular e no mesângio. End: endotelial; Epi: epitelial; IC: imunocomplexos; MBG: membrana basal glomerular. Modificado de DUBOIS' *Lupus Erythematosus and Related Syndromes*, 8th ed.2013 (86).**

As propriedades precisas dos anticorpos patogênicos que se depositam nos rins e desencadeiam a resposta inflamatória ainda não foram completamente definidas. Anticorpos eluídos de rins de pacientes com LES apresentam maior atividade anti-dsDNA e maior reatividade cruzada com diversos autoantígenos, incluindo componentes da MBG, quando comparados com anticorpos anti-dsDNA séricos (87,88). Ligar-se ao nucleossoma pode ser mais importante do que ligar-se ao DNA, pois o nucleossoma pode ficar aprisionado nos rins (88). Contudo, a ligação à cromatina não é o único mecanismo para a deposição renal, pois anticorpos sem especificidade para nenhum componente



nuclear também podem depositar-se no rim e causar dano renal em modelos murinos de LES (89).

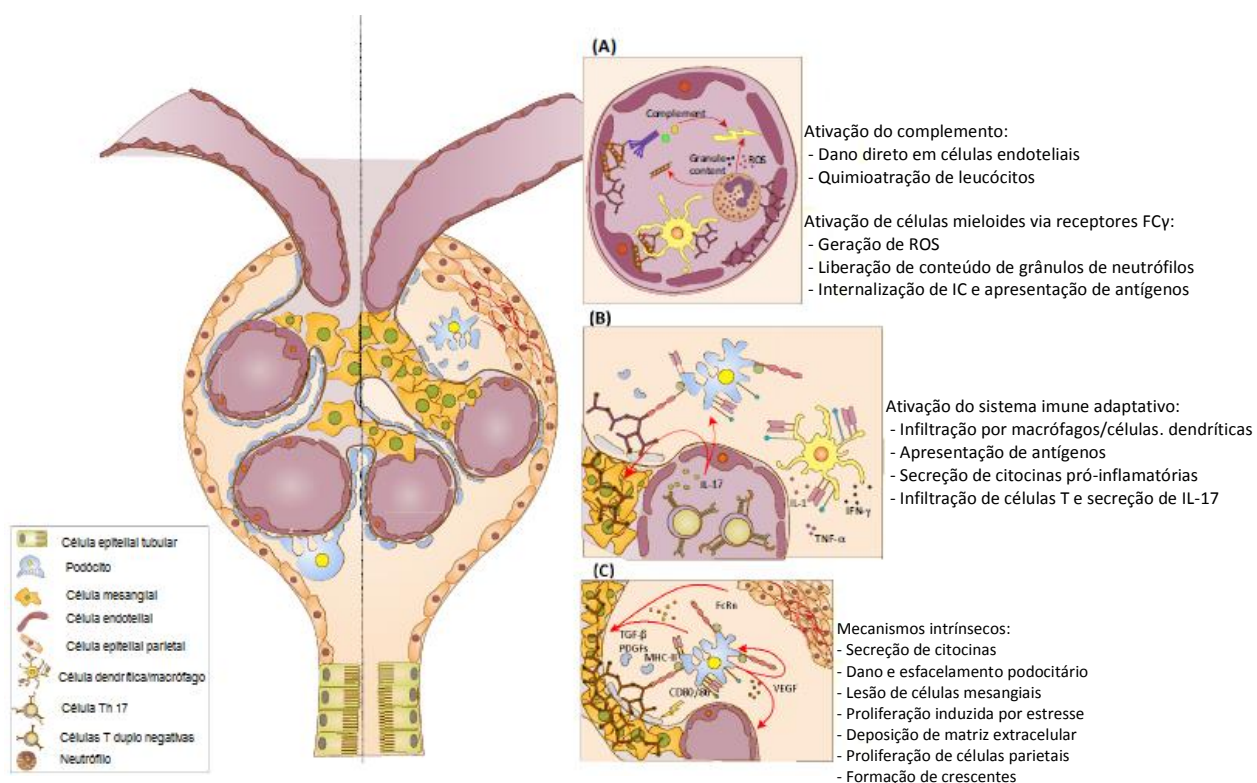
Outra característica dos anticorpos patogênicos é a carga catiônica, a qual pode conferir especificidade de ligação a cargas negativas, como DNA ou sulfato de heparan na MBG. Estudos *in vitro* mostraram que anticorpos anti-dsDNA induzem diretamente a liberação de citocinas pró-inflamatórias em células mesangiais e tubulares bem como o aumento de sua proliferação e alteração de sua viabilidade. O mecanismo destes efeitos ainda não foi totalmente elucidado.

Finalmente, o isotipo do anticorpo determina suas propriedades efetoras, particularmente a habilidade de ligar-se a receptores Fc e ativar complemento. Nem todos anticorpos anti-dsDNA são patogênicos (90), alguns trabalhos mostraram que os anticorpos anti-dsDNA capazes de fixar complemento são mais nefritogênicos (91). Além disso, um estudo mostrou que a habilidade de ligar-se ao glomérulo *in vitro* ou de induzir patologia renal *in vivo* foi independente da avidéz relativa ao DNA (92). Em adição, a nefrotoxicidade do anti-dsDNA pode não requerer a formação de imunocomplexos. Anticorpos anti-dsDNA parecem ligar-se a células mesangiais humanas *in vitro* e induzir a produção de substâncias pró-inflamatórias (93,94).

Alguns dados sugerem que anticorpos contra o componente do complemento C1q podem correlacionar-se com NL (95,96). O mecanismo de ação destes anticorpos pode ser iniciado pela deposição de imunocomplexos na MBG, com C1q sendo fixado a esses imunocomplexos. A ligação subsequente de anticorpos anti-C1q ao C1q ativa o complemento, resultando no influxo de células inflamatórias. Também se sugere que a subclasse IgG possa ser um determinante da resposta inflamatória induzida pela deposição de imunocomplexos. As subclasses IgG1 e IgG3 são as que fixam complemento e induzem inflamação (97).

A deposição de imunocomplexos pode ativar outros braços da resposta inflamatória. A ativação das moléculas de adesão endotelial pode resultar no recrutamento de leucócitos pró-inflamatórios (98). Células glomerulares ativadas, macrófagos infiltrantes e células T produzem citocinas inflamatórias, incluindo fator de necrose tumoral alfa (*Tumor Necrosis Factor alpha* - TNF- $\alpha$ ), Interleucina 6 (IL-6), fator transformador de crescimento tumoral beta (*Transforming Growth Factor Beta* - TGF- $\beta$ ), interferon gama (IFN-  $\gamma$ ), quimiocinas e fator de crescimento derivado de plaquetas. Todos estes mediadores inflamatórios têm o potencial de aumentar o dano renal (99–101). As plaquetas ativadas podem também contribuir para a proliferação de células mesangiais (102).

Para determinar se existe algum anticorpo sérico que se correlacione ou seja capaz de prever doença renal em humanos com LES, estudos clínicos compararam a especificidade de anticorpos no soro de pacientes com e sem nefrite. Estes estudos mostraram que os anticorpos que se ligam aos glomérulos são mais comumente vistos no soro de pacientes lúpicos com nefrite e que se correlacionam com a presença de anticorpos anti-dsDNA, porém, possuem características heterogêneas e podem não refletir totalmente as características daqueles anticorpos que realmente depositam-se no rim. Embora as medições dos níveis séricos de componentes do complemento e dos níveis de uma variedade de autoanticorpos, incluindo antinucleossomos, anti-dsDNA e anti-C1q, sejam frequentemente anormais, tais estudos não conseguiram estabelecer com clareza qualquer um destes biomarcadores como medidores confiáveis de atividade da doença em pacientes com NL (103). Relatos recentes sugerem que os níveis de anti-C3b podem identificar pacientes com tendência a exacerbação da atividade da doença renal (104). A figura 3 resume os principais mecanismos de lesão causadores de NL.



**Figura 3. Mecanismos de lesão na nefrite lúpica. IFN: interferon; IL: interleucina; PDGF: *platelet-derived growth factor*; ROS: reactive oxygen species; TGF- $\beta$ : *transforming growth factor beta*; TNF: *tumor necrosis factor*; VEGF: *vascular endothelial growth factor*. Modificado de Flores-Mendoza. Trends Mol Med. 2018 Apr;24(4):364-378 (299).**

## 2.5 Tratamento da nefrite lúpica

A escolha do tratamento para indivíduos com NL deve levar em conta a apresentação clínica, as alterações laboratoriais, as características demográficas e, sempre que possível, os achados histopatológicos da biópsia renal. Os objetivos gerais do tratamento são a manutenção da função renal a longo prazo, a prevenção de recidivas, a mínima toxicidade medicamentosa e a melhora da qualidade de vida e da sobrevivência. Prevenir a doença renal terminal é importante devido à morbidade e à mortalidade

associadas com seu tratamento: diálise ou transplante renal.

Um estudo de coorte brasileiro publicado em 2013 encontrou menor sobrevida em 5 anos em pacientes com LES e em diálise, quando comparados com pacientes dialíticos sem esta patologia (105). Estudos recentes avaliando o desfecho de transplante renal em pacientes com LES comparados com aqueles sem a doença mostraram melhora da sobrevida do enxerto nos pacientes com LES, com taxas de mortalidade e falha do transplante semelhantes nos dois grupos (106), sendo que recorrência de NL é a causa da falha do enxerto em menos de 10% dos casos (28).

Algumas medidas devem ser iniciadas para pacientes com NL e devem ser mantidas nas fases de indução e manutenção do tratamento, independentemente de sua classe histológica. Orientações dietéticas objetivando a prevenção e o controle de dislipidemia, diabetes, obesidade, hipertensão arterial sistêmica e osteoporose devem ser fornecidas. Deve-se considerar a suplementação de vitamina D e cálcio quando indicados, principalmente para os pacientes em uso de corticoide. Evitar o uso de medicamentos nefrotóxicos, especialmente os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) (107).

Deve-se estimular a suspensão do tabagismo e estabelecer controle rigoroso da pressão arterial, objetivando níveis pressóricos iguais ou inferiores a 130/80 mmHg. Há preferência para o uso de inibidores da enzima de conversão da angiotensina (iECA) ou bloqueadores do receptor da angiotensina II, cujas eficácias já estão bem estabelecidas para as nefropatias crônicas de outras etiologias (108) e pelos seus efeitos renoprotetores e antiproteinúricos, motivos pelos quais estes agentes devem ser usados mesmo com níveis normais de pressão arterial.

Sempre que não houver contraindicação, deve-se iniciar o uso de hidroxicloroquina, a qual está associada a taxas mais altas de resposta ao tratamento, à menor frequência de recidivas, à menor intensidade de dano renal, à redução de eventos tromboembólicos e ao aumento da sobrevida. O tratamento da dislipidemia com estatinas deve ser recomendado para pacientes com colesterol *Low density lipoprotein* (LDL)

>100mg/dL (109).

A terapia imunossupressora geralmente não está indicada para pacientes com NL mesangial mínima e proliferativa mesangial (classes I e II). Estes pacientes não necessitam de terapia específica, sendo que a hidroxicloroquina e a prednisona devem ser administradas de acordo com o grau de atividade clínica extrarrenal.

Os pacientes que apresentarem nefrite membranosa (classe V) associada a nefrites proliferativas (classes III e IV) devem receber o tratamento adequado para o manejo das formas proliferativas, as quais apresentam pior prognóstico. A indicação de terapia imunossupressora para pacientes com NL classe V pura é baseada principalmente na opinião de especialistas. A maioria dos autores considera seu uso para pacientes que apresentem um ou mais dos fatores de pior prognóstico a seguir: persistência de proteinúria >3,5g/dia, elevação progressiva da creatinina sérica, lesões com crescentes na biópsia renal. O micofenolato mofetil (MMF) pode ser usado em combinação com corticoides como terapia inicial (110,111). A ciclofosfamida e os inibidores da calcineurina (ciclosporina ou tacrolimus) podem ser usados como alternativas ao MMF (110,111). Para o tratamento de manutenção, um agente imunossupressor, preferencialmente azatioprina ou MMF deve ser iniciado, associado a doses progressivamente menores de prednisona (111,112).

O tratamento das nefrites proliferativas (classe III e IV) é urgente e deve ser intensivo, pois há elevado risco de evolução para insuficiência renal (111). O alvo a ser alcançado durante o período de indução, que geralmente dura seis meses, é a remissão completa. A ciclofosfamida (CCF) é superior ao corticoide em monoterapia (113), sendo que seu uso por tempo prolongado foi mais eficaz para a prevenção de recidivas e manutenção da função renal (114). A CCF pode ser usada em doses baixas (esquema *Euro-Lupus Trial*), que consiste na administração de 500 mg, intravenosa, a cada duas semanas, por 3 meses (dose total de 3 g) (115) ou em doses altas (esquema clássico do *National Institutes of Health*), na dose de 0,5 a 1,0 mg/m<sup>2</sup> de superfície corpórea,

intravenosa, em intervalos mensais, por 6 meses, seguido de aplicações em intervalos trimestrais por 18 meses (113). Estudos de metanálise mostraram que a CCF e o MMF têm eficácia comparável para o tratamento de indução (116–118), com o MMF apresentando perfil de segurança mais favorável. Em análises de subgrupos, os afrodescendentes e os hispânicos parecem apresentar melhor resposta ao MMF do que à CCF e os asiáticos, mais efeitos colaterais ao MMF, sendo que sua dose não deve ultrapassar 2g/dia nessa população (119).

Recomenda-se o uso de metilprednisolona na dose de 0,5 a 1 g/dia, intravenosa, por 3 dias, mantendo-se prednisona na dose de 0,5 a 1mg/Kg/dia por 3 a 4 semanas, seguida de redução progressiva, tendo como meta alcançar a dose de 5 a 10 mg/dia, em 6 meses. Após seis meses de tratamento de indução, se não tiverem sido alcançadas remissão completa (RC) ou pelo menos remissão parcial (RP), considera-se a NL refratária e recomenda-se uma nova terapia de indução com metilprednisolona e substituição da CCF por MMF ou do MMF pela CCF ou por um inibidor da calcineurina ou rituximabe (*off label*). A NL também é considerada refratária quando não for observada nenhuma resposta ou piora dos parâmetros até o terceiro mês de tratamento (111,120).

A modificação do esquema terapêutico para o da fase de manutenção depende do alcance da RC ou RP. A principal meta do tratamento imunossupressor é a resolução da atividade inflamatória e imunológica, ou seja, a remissão completa (RC) da NL, a qual está associada a melhor prognóstico a longo prazo (121,122) e é caracterizada pela redução da proteinúria, redução ou estabilização da creatinina sérica e ausência de hematúria, leucocitúria ou cilindros celulares. Uma resposta clínica completa não é necessariamente sinônimo de remissão histológica, a qual só pode ser verificada através de biópsias renais seriadas, porém, esta conduta não é viável na prática clínica. A avaliação da resposta terapêutica é feita, portanto, através do acompanhamento de medidas clínicas, tais como a creatinina sérica, o IPC e o EQU. As definições de RC e RP

variam conforme os principais consensos, sendo resumidas na tabela 2.

Tabela 2. Principais definições de remissão completa e parcial de nefrite lúpica.

	Remissão completa	Remissão parcial
EULAR, (111)	IPC<0,5 (<500 mg de proteinúria/24 horas) e TFG normal ou quase normal (redução $\leq$ 10% do valor prévio do paciente ou do limite superior da normalidade do método)	Redução da proteinúria $\geq$ 50% (atingindo níveis subnefróticos) e TFG normal ou quase normal
ACR, (123)	IPC<0,2, TGF >90ml/minuto/1,73m <sup>2</sup> e urinálise normal	0,2>IPC<2,0
SBR, (120)	IPC<0,5 (<500 mg de proteinúria/24 horas) e TFG normal ou quase normal (redução $\leq$ 10% do valor prévio do paciente ou do limite superior da normalidade do método) e urinálise normal	Redução da proteinúria $\geq$ 50% (atingindo níveis subnefróticos) e TFG normal ou quase normal e urinálise normal

ACR: *American College of Rheumatology*; EULAR: *European League Against Rheumatism*; IPC: índice proteinúria/creatinúria em amostra; SBR: Sociedade Brasileira de Reumatologia; TFG: taxa de filtração glomerular.

A RP deve ser atingida preferencialmente dentro de 6 meses após o início do tratamento e, caso isso não seja possível, em período não superior a 12 meses. Embora a RP esteja associada a um pior prognóstico, ela pode ser uma meta aceitável quando todos os tratamentos tenham sido esgotados ou quando não possam ser utilizados devido a elevados riscos individuais referentes à toxicidade.

Faltam estudos controlados que tenham abordado a duração da fase de manutenção, mas a maioria dos autores concorda que ela deva durar entre 24 a 48 meses. Tanto a *European League Against Rheumatism* (EULAR) (111) quanto o *American College of Rheumatology* (ACR) (112) recomendam o uso de azatioprina ou MMF como opções para esta fase do tratamento, associados à prednisona em baixas doses (5 a

10mg/dia). A escolha entre azatioprina ou MMF deve ser avaliada caso a caso, e alguns autores sugerem que a azatioprina poderia ser usada preferencialmente em indivíduos eurodescendentes (124) e o MMF em afrodescendentes (119).

## 2.6 Índices de atividade de doença

O LES é uma doença multisistêmica complexa, caracterizada pela alternância entre períodos de atividade e de remissão. Na rotina de acompanhamento clínico, bem como em estudos, os pacientes apresentam-se com sinais e sintomas que podem resultar de diferentes processos, como atividade de doença, dano crônico irreversível, reações adversas às medicações ou comorbidades. A identificação destas situações bem como sua atribuição causal correta é importante para garantir que o paciente não seja tratado de forma insuficiente ou exagerada (28). É importante quantificar e classificar a atividade da doença para orientar as decisões de tratamento, avaliar a resposta a qualquer intervenção e comparar a atividade entre os grupos e/ou ao longo do tempo. No entanto, nenhuma medida laboratorial ou clínica isolada demonstrou refletir com precisão a atividade global de doença inflamatória no LES. Neste sentido, vários instrumentos foram desenvolvidos em um esforço para medir e avaliar objetivamente a atividade da doença.

O “*Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index – 2000*” (SLEDAI 2K) versão 30 dias (125) - ANEXO VI, é um índice global de atividade de doença composto por descritores clínicos e laboratoriais com pesos diferentes que pontuam de 1 a 8 cada e que avalia a atividade de doença nos últimos 30 dias. O escore varia de 0 a 105, sendo o LES classificado como inativo (zero), atividade leve (1 a 5), atividade moderada (6 a 10), atividade alta (11 a 19) e atividade muito alta ( $\geq 20$ ). Mostrou-se sensível a variações ao longo do tempo e capaz de prever mortalidade e dano acumulado. Os componentes que avaliam a atividade renal do LES (SLEDAI renal): cilindros urinários, hematúria, proteinúria e leucocitúria, podem ser analisados como um índice à parte, com escore



variando de zero a 16.

O “*Revised SLE Activity Measure*” renal (rSLAM-R) (9,126,127) – ANEXO VII é uma modificação do SLAM-R utilizada para avaliar a atividade renal de doença, na qual o sedimento urinário é graduado (escores de 0 a 3) bem como a creatinina sérica ou a TFG (escores de 0 a 3). Ele pode variar de zero (sem atividade de doença renal) a um escore máximo de 6. A NL é considerada ativa quando o escore é  $> 0$ . Uma creatinina sérica ou TFG alteradas são pontuadas apenas se o sedimento urinário também estiver ativo.

O “*Systemic Lupus International Collaborating Clinics Renal Activity/Response Exercise*” (SLICC renal) (128,129) – ANEXO VIII é um índice de avaliação de atividade renal de doença no qual a proteinúria, a hematúria e a leucocitúria são pontuadas. Este escore varia de zero a 15 sendo que uma pontuação  $\geq 4$  é indicativa de doença renal ativa.

O “*Systemic lupus international collaborating clinics/American College of Rheumatology damage index*” (SLICC/ACR damage index) (130) – ANEXO IX descreve o dano acumulado ocorrido desde o início da doença em 12 diferentes sistemas. Ele inclui 41 itens para os quais a atribuição ao LES não é necessária, podendo ser resultantes de atividade de doença, do tratamento, de comorbidades ou de um evento não relacionado (uma amputação, por exemplo). Para pontuar, o item deve estar presente por pelo menos 6 meses. Alguns itens podem pontuar entre 2 e 3 para eventos recorrentes (por exemplo, necrose avascular) ou danos graves (por exemplo, doença renal em estágio terminal). O escore total varia de 0 a 49, embora os pacientes raramente pontuem acima de 10. Este índice também é preditor de mortalidade.

## **2.7 Biomarcadores de nefrite lúpica**

O termo biomarcador refere-se a um evento biológico, bioquímico ou molecular,

que pode ser avaliado quantitativa e qualitativamente através de técnicas laboratoriais. Os níveis do biomarcador devem fornecer informações sobre o status biológico do indivíduo. A fonte mais específica de um biomarcador é o tecido que está apresentando o dano, no caso da NL, o parênquima renal, melhor avaliado através da biópsia. Contudo, sua realização requer um procedimento invasivo, com riscos e comorbidades associadas. A biópsia renal não está amplamente disponível e, além disso, um número limitado de glomérulos geralmente é obtido, levantando a questão de quão representativa ela realmente é em relação à atividade e à cronicidade da NL. Por isso, buscar alternativas não-invasivas capazes de identificar ou prever períodos de atividade de doença, avaliar prognóstico, determinar o tratamento mais apropriado e monitorar a resposta terapêutica tem sido o objetivo de muitos estudos atuais.

Os compartimentos não-invasivos que podem ser potencialmente informativos da NL são o plasma, os leucócitos e a urina. No contexto da NL, os biomarcadores urinários podem ser mais específicos de dano renal que os biomarcadores séricos, particularmente em pacientes com doença sistêmica em atividade, além disso, são mais acessíveis (6).

O biomarcador ideal para NL deve ser eliminado na urina em uma taxa constante e permanecer estável no interior da bexiga por períodos variáveis, sob variações de pH. Além disso, deve apresentar boa correlação com a atividade renal, ser sensível a mudanças para que seja útil na monitorização seriada de atividade de doença e definição de resposta ao tratamento/remissão clínica. Deve ser capaz de prever períodos de atividade de doença antes que ocorra uma alteração óbvia dos parâmetros clínicos convencionais para que estratégias de tratamento precoce ou preventivas possam ser iniciadas. Deve ser específico para nefrite, não ocorrendo alterações em períodos de atividade extrarrenal da doença. Além disso, deve ser de fácil realização, ampla disponibilidade, simples interpretação e custo razoável. O biomarcador deve ser avaliado através de estudos longitudinais, em um número grande de pacientes e ter seus resultados

confirmados por grupos independentes de investigadores.

### **2.7.1 Biomarcadores tradicionais de nefrite lúpica**

Atualmente, os exames feitos de rotina para a avaliação de nefrite em pacientes com LES incluem a análise urinária quanto à presença de hematúria, leucocitúria, cilindrúria e quantificação de proteinúria em urina de 24 horas ou através do índice proteinúria/creatinúria em amostra isolada, a avaliação da taxa de filtração glomerular estimada, do anti-dsDNA e dos complementos séricos. Contudo, estes parâmetros não são preditores acurados da classe histológica e da gravidade da nefropatia e também não se mostraram confiáveis na avaliação da resposta ao tratamento (131). A tabela 3 mostra a performance dos biomarcadores tradicionais na detecção de NL em atividade.

Tabela 3. Performance dos biomarcadores tradicionais na detecção de nefrite lúpica em atividade

Teste	Sensibilidade	Especificidade
Anti-dsDNA	53-100%	50-69%
C3	56-79%	51-64%
C4	53-74%	64-65%
Anti-C1q	53-81%	64-71%

C: complemento; anti-dsDNA: anti-double stranded DNA.(32,33,132)

#### **2.7.1.1 Anti-dsDNA**

A presença do anti-dsDNA no soro de pacientes com LES foi documentada há cerca de 60 anos (133,134), porém, ela não é exclusiva desta patologia, podendo ser encontrada em outras doenças reumatológicas, neoplasias, infecções, endocrinopatias e até mesmo em indivíduos hígidos (135–137). Níveis séricos são detectáveis precedendo o diagnóstico clínico em até aproximadamente 2,2 anos (138,139).

Pacientes com anti-dsDNA positivo tem elevação do seu título precedendo períodos de exacerbação da doença (140), sendo que níveis >200 IU/ml são preditores de atividade de doença dentro de 1 ano (141). Com o tratamento da doença, ocorre redução significativa dos títulos do anti-dsDNA (142) e a sua normalização por 8 semanas correlaciona-se com risco reduzido de atividade grave de doença. Contudo, a avaliação dos níveis séricos do anti-dsDNA em pacientes com LES sorologicamente ativo e clinicamente quiescente não encontrou correlação com atividade de doença atual ou subsequente (143).

O anti-dsDNA está associado com atividade da NL (144–146) e é preditor da forma proliferativa (147), podendo ocorrer elevação de seus níveis cerca de até 2,7 anos antes do diagnóstico (148). O anti-dsDNA correlaciona-se também com a melhora da proteinúria na NL (149).

### **2.7.1.2 Complementos**

O sistema complemento é o componente chave na imunidade inata. Podemos encontrar complemento baixo em deficiências congênitas, infecções, insuficiência hepática, pancreatite aguda, crioglobulinemia, queimaduras térmicas e no LES (150). Os depósitos de complemento são evidenciados no tecido renal, hepático, esplênico e cardíaco de pacientes com LES (151). Alguns dos fatores de risco genético mais fortes

para LES resultam na deficiência de proteínas do complemento, como C1q, C1r, C4, C2 e C3 (152). Além disso, a ineficiente eliminação de células apoptóticas devido à deficiência de proteínas da cascata do complemento é um dos mecanismos propostos na patogênese do LES (153,154).

O consumo de complemento, com redução dos níveis de C1q, C3 e C4 pode preceder e correlacionar-se com atividade de doença clinicamente evidente (155,156). Anticorpos contra o C1q são preditores de atividade renal em pacientes com NL proliferativa (157). Níveis séricos de C1q reduzidos correlacionam-se com atividade de doença renal e persistência de níveis baixos após o tratamento são indicadores de pior desfecho. O consumo de C3 correlaciona-se com índices de atividade na biópsia renal, com doença renal persistentemente ativa e com doença renal terminal, já a sua normalização a longo prazo, correlaciona-se com melhor prognóstico (28).

### **2.7.1.3 Proteinúria**

A proteinúria ainda é o principal biomarcador urinário utilizado na investigação de NL (158,159). Porém, não existem recomendações de como essa monitorização deve ser feita nem de qual método deve ser empregado.

A proteinúria em urina de 24 horas coletada de forma acurada é o padrão ouro para a avaliação da proteinúria, porém, apresenta a desvantagem de ser incômoda e pouco praticável, havendo frequentemente coletas inadequadas. A avaliação da proteinúria através do multistix mostrou-se inacurada quando comparada com a proteinúria em urina de 24 horas, devendo seu uso ser desencorajado (160).

O IPC mostrou boa correlação com a proteinúria de 24 horas em pacientes com glomerulopatias primárias (161) e na nefropatia diabética.

O subcomitê de doenças renais do ACR recomenda o uso do IPC em coleta de

amostra da primeira urina da manhã como método de investigação de proteinúria em pacientes com nefrite (123). O *Joint European League Against Rheumatism and European Renal Association – European Dialysis and Transplant Association* (EULAR/ERA-EDTA) considera o IPC um método válido e conveniente na monitorização de proteinúria em pacientes adultos e pediátricos com NL (111). Contudo, em níveis de proteinúria subnefróticos, o IPC parece ser fracamente correlacionado com a proteinúria em urina de 24 horas (162).

Existem relativamente poucos trabalhos avaliando o uso do IPC em pacientes com NL, com resultados controversos (163–167), devendo este método ser usado preferencialmente em pacientes com dificuldades em realizar uma coleta adequada de urina de 24 horas.

A microalbuminúria, definida como taxa de excreção de albumina na urina entre 30-299mg/g de creatinina, poderia ser usada para detectar precocemente NL em pacientes com níveis de proteinúria ainda baixos, contudo, ela não se correlacionou com resultados de biópsia renal nos pacientes que subsequentemente desenvolveram nefrite (168,169).

### ***2.7.2 Biomarcadores urinários de nefrite lúpica***

Diversos biomarcadores já foram descritos na urina de pacientes com NL. Em muitos casos, eles não são específicos de LES, refletindo uma série de processos celulares em nível glomerular ou tubular, podendo ser devidos a processos inflamatórios, fibróticos ou isquêmicos renais (170). Dentro do grupo de biomarcadores urinários, existem estudos relacionados a citocinas, quimiocinas, adipocinas, além de diversas proteínas, entre outros (170,171). A tabela 4 mostra o resumo dos principais biomarcadores urinários já identificados e seus potenciais usos na NL.

Tabela 4. Principais biomarcadores urinários identificados e seus potenciais usos na nefrite lúpica

<b>Biomarcador</b>	<b>Correlação com atividade renal de doença</b>	<b>Correlação com dano renal histológico</b>	<b>Preditor de atividade renal de doença</b>	<b>Monitorar resposta ao tratamento</b>	<b>Preditor da histologia</b>
Adiponectina	+ (172,173)	NE	+ (173)	+ (172)	+ (172)
AGP	+ (174)	+ (174)	+ (174)	+ (175)	+ (176,177)
CD4 T cell	+ (178–180)	NE	NE	+ (179)	(179)
Ceruloplasmina	+ (174)	- (174)	- (174)	+ (175)	+ (177)
CXCL-16	+ (8)	NE	NE	NE	NE
FLC	- (181) + (182)	+ (181)	NE	+ (181)	+ (181)
Hepcidina 20	NE	NE	+ (183)	- (183)	NE
Hepcidin 25	NE	+ (182)	- (183)	+ (183)	NE
IL-6	+ (184,185)	+ (185)	NE	+ (184)	+ (185,186)
IL-17	+ (187)	+ (188)	+ (189)	NE	+ (182)
IP-10	+ (190–192)	+ (193)	NS	+ (194)	+ (172,194)
L-PGDS	+ (174)	+ (174)	+ (174)	+ (175)	+ (177)
MCP-1	+ (192,195,196)	+ (171,196)	+ (171,196)	+ (196,197)	+ (171)
NGAL	+ (198)	+ (199)	+ (198)	+ (199)	+ (200)
PGDS	+ (201)	+ (193)	+ (193)	+ (193)	- (193)
TGF- $\beta$ 1	- (188) + (187)	+ (182)	+ (182)	+ (182)	+ (182)
Transferrina	+ (174)	+ (174)	+ (174)	+ (175)	+ (176,177)
TWEAK	+ (202)	+ (203)	+ (204)	+ (204)	- (204)
Marcadores genéticos relacionados à Célula T tipo 1	+ (191,192)	NE	NE	NE	NE

VCAM-1	+ (8–10,12,205– 207)	(12,205–207)	NE	NE	+ (11,12,205– 207)
--------	-------------------------	--------------	----	----	--------------------------

AGP: *alfa-1 acid glycoprotein*; CD: *cluster of differentiation*; CXCL: *chemokine ligand CXC motif*; FLC: *urinary free light chain*; IL: *interleucina*; IP-10: *interferon inducible protein 10* também conhecida como *Chemokine CXCL10*; L-PGDS: *prostaglandin D synthase type lipocalin*; MCP-1: *monocyte chemotatic protein-1* também conhecida como *CCL-2: chemokine (C-C motif) ligand 2*; NGAL: *neutrophil gelatinase-associated lipocalin*; PGDS: *prostaglandin H(2)D-isomerase*; TGF- $\beta$ 1: *transforming growth factor beta 1*; TWEAK: *apoptosis inducer similar to tumor necrosis factor*; VCAM-1: *vascular cell adhesion molecule 1*.

Referências entre parênteses. (+) denota uma relação positiva e estatisticamente significativa encontrada nos artigos referenciados; (-) denota ausência de significância estatística; NE: não estudado - ausência de estudos com este biomarcador específico com base em uma pesquisa no MEDLINE no momento desta revisão. Modificado de Gasparin AA. *Lupus*.2019;28(3):265-272 (208).

## 2.8 Inflamação e moléculas de adesão celular

Para que os leucócitos circulantes consigam acessar um sítio de inflamação, eles devem sofrer uma série de interações com o endotélio microvascular. Primeiro, ocorre o processo de “rolagem” do leucócito e, posteriormente, ele se prende na superfície endotelial. Subsequentemente, os leucócitos aderentes sofrem alterações na sua conformação, associadas ao aumento da adesão e aos passos preliminares da migração transendotelial. Estas interações são mediadas por glicoproteínas adesivas expressas tanto por leucócitos circulantes quanto por células endoteliais (209). Sob condições patológicas, a infiltração de leucócitos pode resultar de alterações na expressão e na função de moléculas de adesão em células endoteliais ou em leucócitos circulantes (210,211).

O endotélio vascular tem um papel importante na patogênese da inflamação. Os termos “disfunção” ou “ativação” endotelial são usados para descrever mudanças nos mecanismos de controle homeostático do endotélio. Esta condição patofisiológica está associada ao aumento da expressão de moléculas de adesão, como a molécula de adesão intercelular-1 (*Intercellular Adhesion Molecule 1* - ICAM-1), a VCAM-1 e a E-selectina e ao aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- $\alpha$ , a IL-1, a IL-6



e o INF- $\gamma$ . A ativação endotelial também está associada à produção de fatores pró-trombóticos, ao aumento do estresse oxidativo e à modulação anormal do tônus vascular (212).

Após ser estimulado por citocinas ou por produtos bacterianos, o endotélio ativado aprisiona leucócitos na microvasculatura em locais próximos aos sítios de inflamação, tornando-os leucócitos ativados, os quais aderem mais firmemente ao endotélio e, posteriormente, migram através do vaso. O leucócito, fora do vaso sanguíneo, é capaz de seguir um gradiente quimioatrator em direção ao patógeno incitante (213).

Existem três classes de moléculas de adesão presentes nos leucócitos e no endotélio: integrinas, selectinas e proteínas de superfície celular membros da superfamília de imunoglobulinas. As integrinas e as selectinas presentes nos leucócitos medeiam sua adesão ao endotélio. As selectinas e os membros da superfamília de imunoglobulinas presentes no endotélio, medeiam a sua “viscosidade” aos leucócitos (214).

Os membros da superfamília de imunoglobulinas são moléculas de adesão que se caracterizam pela presença de uma ou mais regiões homólogas de imunoglobulina, cada uma consistindo de uma ponte dissulfeto em circuito com diversos fios beta-plissados dispostos em duas folhas. Há três tipos de regiões homólogas (C, V e H), cada uma com seu comprimento típico e seus resíduos de aminoácidos em posições chave relacionadas a pontes dissulfeto cisteína-cisteína. Membros da superfamília de imunoglobulinas que estão envolvidas na adesão parecem possuir predominantemente domínios do tipo “H”. Dois membros da superfamília de imunoglobulinas, VCAM-1 e ICAM-1, são ligantes de integrinas de leucócitos.

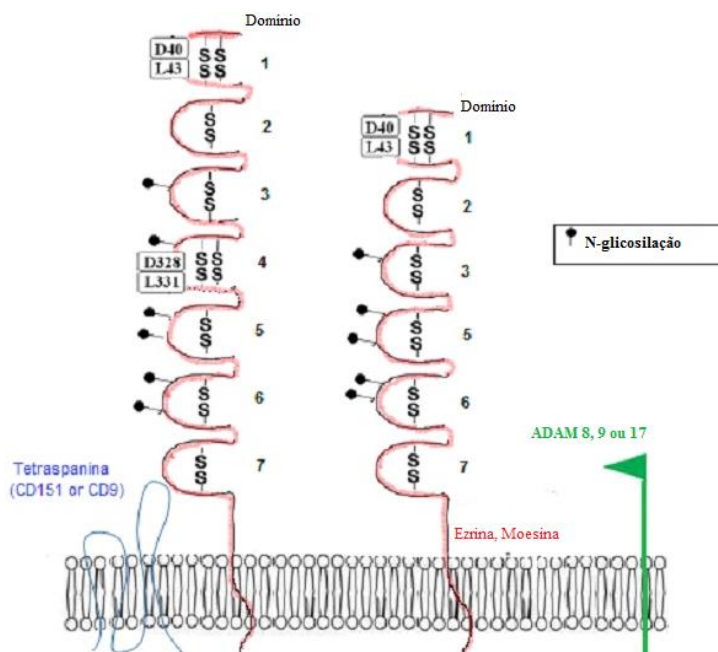
O ICAM-1 é constitutivamente expresso em células endoteliais e em células circulantes, incluindo linfócitos, e tem sua expressão aumentada pela inflamação ou pela ativação imune. Já a expressão da VCAM-1 e da E-selectina em tecidos normais é mínima

ou indetectável (215,216).

### **2.9 A molécula de adesão celular vascular -1 (VCAM-1)**

A molécula de adesão celular vascular 1 (VCAM-1) é um receptor de adesão da célula endotelial, membro da superfamília de imunoglobulinas (Ig), composta por diversos domínios extracelulares semelhantes à imunoglobulina, uma região transmembrana e um domínio citoplasmático de 19 aminoácidos carboxi-terminal (216,217). Em células endoteliais ativadas, a VCAM-1 está localizada em uma plataforma “*lipid-raft-like*” com as tetraspaninas CD9 e CD151, nos chamados microdomínios enriquecidos de tetraspanina, os quais parecem permitir a expressão e a função da VCAM-1 na superfície endotelial (218–220). A região terminal intracelular da VCAM-1 é conectada ao citoesqueleto de actina através da Ezrina e Moesina (221,222).

Existem duas variantes de ligação da VCAM-1 humana, resultando em um receptor com sete domínios (7d) extracelulares proteicos semelhantes à imunoglobulina ou com seis (6d), ao qual falta o domínio “4”. Ambas as variantes humanas da VCAM-1 se ligam à  $\alpha 4\beta 1$  integrina (*Very late antigen-4* - VLA-4) (223,224), nos domínios 1 e 4 (225,226), mas podem, também, ligar-se a outras integrinas, tais como a  $\alpha 4\beta 7$  e  $\alpha \beta 2$  (227). Estas integrinas são expressas por eosinófilos, basófilos, linfócitos, mastócitos e monócitos (228–230). A figura 4 ilustra as variantes humanas de VCAM-1.



**Figura 4. Variantes humanas de VCAM-1.** A VCAM-1 humana apresenta duas variantes, uma contendo 6 domínios semelhantes à imunoglobulina, na qual o domínio 4 está faltante e outra contendo 7 domínios. Os domínios 1 e 4 contêm os sítios de ligação à integrina. A galectina 3 liga-se ao VCAM-1 nos sítios de N-glicosilação. A VCAM-1 também se coimunoprecipita com a ezrina e a moesina. A expressão da VCAM-1 na superfície celular requer a associação com o CD151 ou CD9 da tetraspanina. A VCAM-1 pode ser clivada e liberada da superfície celular na sua forma solúvel através da ação da ADAM 8,9 ou 17. VCAM-1: *vascular cell adhesion molecule-1*; ADAM: a *desintegrin and metalloproteinase*. Modificado de Gasparin AA. *Lupus*.2019;28(3):265-272 (208).

A ligação à VCAM-1 é regulada pelo estado de ativação das integrinas (227,231): as com baixa afinidade promovem o rolamento, já as com elevada afinidade medeiam a adesão celular firme ao endotélio, capaz de resistir ao fluxo sanguíneo (228,232). A ligação da integrina ao domínio 1 ou ao 4 da VCAM-1 também é modulada pelo grau de ativação da  $\alpha 4\beta 1$  integrina (231). Além das integrinas, a VCAM-1 liga-se à galectina-3.

A VCAM-1 funciona em conjunto com outras moléculas de adesão para regular a vigilância imune e a inflamação. Sua expressão é induzida por citocinas produzidas nos tecidos, altos níveis de espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species* – ROS), LDL oxidada, 25-hidroxicolesterol, estresse de cisalhamento, glicose elevada, e estímulo

dos *toll-like receptor* (TLR) da célula endotelial por agentes microbianos (233–239). A ativação da expressão gênica da VCAM-1 é regulada pelo fator de transcrição nuclear B (NFκB), SP-1, AP-1 e fator regulador do interferon-1.

A adesão relativamente seletiva de leucócitos à VCAM-1 pode promover o acúmulo de células mononucleares durante a transição da fase aguda para a fase crônica da inflamação. Da mesma forma, a expressão de VCAM-1 no endotélio pode ser responsável pelo acúmulo de eosinófilos. Alguns estudos sugerem também um papel da VCAM-1 na aterosclerose: VCAM-1 é expressa pelo endotélio arterial sobrepondo-se a lesões de aterosclerose inicial em um modelo de aterosclerose murino (ratos *Watanabe*) e pode ser responsável pela atração de monócitos à lesão aterosclerótica em desenvolvimento (240).

A VCAM-1 pode também ser liberada da superfície endotelial através da clivagem por uma desintegrina e metaloproteinase 17 (ADAM17) (241) e, como alguns estudos mostram, também pela ADAM8 (242,243) ou ADAM9 (244,245). Por isso, a VCAM-1 apresenta-se no plasma e na urina em sua forma solúvel e é usada como biomarcador preditor de doenças (246–248). Níveis plasmáticos de VCAM-1 aumentam com a ativação endotelial em múltiplas patologias (249–252). Acredita-se que a VCAM-1 solúvel, através da sua ligação com os leucócitos circulantes, limite a ligação da integrina leucocitária à VCAM-1 endotelial (253,254). As moléculas de adesão nas suas formas solúveis mantêm suas funções (255). Como a medida quantitativa de moléculas de adesão ligadas a membranas é difícil, pode ser realizada a medida de moléculas de adesão solúveis através da técnica ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), um útil marcador substituto de sua expressão (256).

Além das células endoteliais, a VCAM-1 é também expressa em células dendríticas linfoides (257), em células estromais da medula óssea (258), em macrófagos localizados no baço e timo, na sinóvia (259), focalmente no epitélio tubular renal (260) e

nas células de Kupffer hepáticas sob condições não-inflamatórias (220). Devido a sua ampla distribuição em órgãos e tecidos, a VCAM-1 participa em diversos processos fisiopatológicos, como doenças autoimunes, cardiovasculares e infecções (220).

### **2.10 VCAM-1 e o lúpus eritematoso sistêmico**

No LES, a deposição de imunocomplexos leva à ativação da cascata do complemento, resultando em ativação endotelial com a conseqüente quimioatração de células imunocompetentes. Estes eventos induzem a superexpressão de moléculas de adesão promovendo a transmigração de células inflamatórias através da parede endotelial levando, eventualmente, ao dano orgânico.

Em pacientes com LES, ocorre uma alteração na expressão de moléculas específicas de adesão celular em certos tecidos. A expressão de E-selectina, VCAM-1 e ICAM-1 está aumentada na pele (261) e em biópsias de músculo esquelético (262) de pacientes com LES em comparação com controles, com elevação mais marcada durante períodos de exacerbação da doença. As moléculas VCAM-1 e ICAM-1 são fracamente expressas nas células epiteliais tubulares e endoteliais glomerulares em rins normais (263,264), porém, sua expressão aumenta na presença de NL proliferativa, correlacionando-se com atividade de doença (263–266).

O estrógeno pode ser um fator envolvido no aumento da expressão de moléculas de adesão celular (267). A presença de anticorpos anti-dsDNA também pode aumentar a expressão das moléculas de adesão celular (268). Contudo, trabalhos realizados para tentar demonstrar que linfócitos de pacientes com LES ativo são mais aderentes às células endoteliais mostraram resultados conflitantes (269). Enquanto não foi verificada uma alteração fundamental no processo de rolagem e adesão nos pacientes com LES, a disseminação de leucócitos pós-adesão, um passo crítico na progressão para a transmigração, parece estar aumentada nestes pacientes e associa-se com nefrite ativa

(270).

Foi verificado o aumento de VCAM-1 no mesângio de glomérulos e no endotélio de modelos murinos com nefrite lúpica (271). A VCAM-1 também está elevada na urina de ratos com nefrite imune induzida experimentalmente, mostrando boa correlação com a atividade da doença (8), sendo que as linhagens que desenvolveram doença renal mais grave também apresentaram níveis urinários mais elevados de VCAM-1 (272–274).

Estudos em humanos também correlacionaram a atividade do LES com a elevação de VCAM-1 sérico (sVCAM-1). Alguns trabalhos mostraram que a sVCAM-1 aumenta paralelamente à atividade de doença durante a exacerbação do LES (256,275). Outros estudos encontraram correlação positiva entre os níveis de sVCAM-1 e sICAM-1 e a concentração de anticorpos anti-dsDNA (276,277), escore de atividade de doença (SLEDAI) (277) e correlação negativa com a concentração sérica dos componentes do complemento C3 e C4 em pacientes com LES (276). Além disso, os níveis de sVCAM-1 foram mais elevados em pacientes com NL do que nos pacientes com LES mas sem nefrite (276,278). Níveis de sVCAM-1, mas não de sICAM-1 ou E-selectina, também correlacionam-se com gravidade de doença em biópsias renais de pacientes com NL (279). Pacientes com nefrite classe III e IV apresentam níveis significativamente mais elevados de sVCAM-1 comparados com pacientes com nefrite classe II. (276)

Lewis e colaboradores, em estudo prospectivo recente, verificaram que os níveis absolutos de sVCAM-1 foram menos úteis como ferramenta diagnóstica para identificar pacientes com doença ativa em relação aos marcadores convencionais (anti-dsDNA e C3), porém, a variação da sVCAM-1 em relação ao nível basal foi um marcador superior de resposta clínica, acessada pela redução do escore ECLAM (280). Além disso, os níveis de sVCAM-1 correlacionaram-se significativamente com o número de células B de memória ativadas CD95<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>, de plasmoblastos CD95<sup>+</sup> e de células plasmáticas circulantes em pacientes com LES, sugerindo um importante papel da VCAM-1 na sobrevivência e na maturação dos linfócitos B na medula óssea e nos tecidos linfóides

secundários (280).

A sVCAM-1 aumenta em pacientes com síndrome do anticorpo antifosfolípido primária ou associada com LES, havendo correlação com eventos trombóticos graves e com doença renal (281). Em um estudo com 133 pacientes com LES e 40 controles, a sVCAM-1 correlacionou-se com LES neuropsiquiátrico e com trombose venosa profunda (282). Diversos grupos concordam que moléculas de adesão celular solúveis séricas podem permanecer persistentemente elevadas em pacientes com LES que estão em remissão clínica (283).

### **2.11 Níveis urinários de VCAM-1 solúvel e nefrite lúpica**

Estudos prévios demonstraram que moléculas de adesão solúveis urinárias são confiáveis marcadores de rejeição de aloenxertos renais (284,285), sugerindo que seu nível urinário seja um reflexo da ativação endotelial renal. Em rins normais, a VCAM-1 é discretamente expressa no endotélio dos vasos glomerulares, peritubulares e intersticiais e na cápsula de Bowman (264,266,286). Esta expressão, no entanto, é intensificada em pacientes com glomerulonefrite ativa, como por exemplo, na NL (263–265,286). Em um modelo murino de NL usando camundongos MRL-lpr, a VCAM-1 apresentou aumento de síntese e expressão induzida por citocinas pró-inflamatórias, como o TNF, e foi associada com o aumento da adesividade leucocitária ao endotélio glomerular (287). Outro trabalho demonstrou expressão proeminente de VCAM-1 nos túbulos distais, nas células intersticiais, no endotélio glomerular e nas células epiteliais parietais em pacientes com NL classe IV (288).

Em um pequeno estudo de caso controle com apenas 6 pacientes com NL ativa comprovada por biópsia, sendo 5 pacientes com nefrite classe III e 1 paciente com nefrite classe IV, e 9 controles saudáveis, observou-se níveis séricos e urinários de VCAM-1 significativamente mais elevados no grupo NL ativa (289).

Em um estudo de caso-controle que incluiu 24 pacientes com LES e 7 controles saudáveis, Molad e colaboradores encontraram nível urinário de VCAM-1 solúvel significativamente elevado em pacientes com LES em comparação com os controles. A VCAM-1 apresentou correlação significativa com atividade de doença global (SLEDAI), dano (SLICC/ACR), taxa de filtração glomerular e nível sérico de C3. Contudo, neste trabalho a VCAM-1 não se correlacionou com marcadores de nefrite (proteinúria, hematúria, anti-dsDNA), o que pode ter se devido ao pequeno número de pacientes em cada grupo (7).

Wu e colaboradores realizaram um interessante estudo com o objetivo de monitorizar os níveis urinários de VCAM-1, P-selectina, receptor solúvel do fator de necrose tumoral 1 (*soluble tumor necrosis factor receptor 1* – sTNFR-1) e CXCL16 em diferentes linhagens de camundongos com NL espontânea. Eles observaram que tanto os níveis séricos quanto urinários de VCAM-1 solúvel aumentaram significativamente em relação aos prévios à nefrite, correlacionando-se bem com a proteinúria, sendo que a elevação dos níveis urinários foi mais significativa, sugerindo que a VCAM-1 possa ser parcialmente produzida no rim. Além disso, a VCAM-1 foi expressa em capilares peritubulares, feixes vasculares, endotélio, células glomerulares, bem como em células inflamatórias intersticiais de camundongos *MRL.lpr* com NL, o que não é observado em rins normais (8).

Na segunda parte deste trabalho, foi realizado um estudo caso-controle avaliando os níveis séricos e urinários das mesmas moléculas em 38 pacientes com LES (18 com NL ativa), 6 pacientes com artrite reumatoide e 15 controles saudáveis. A VCAM-1 solúvel encontrou-se significativamente elevada na urina de pacientes com LES em comparação com pacientes com artrite reumatoide e controles saudáveis, mostrando excelente correlação com o IPC e com o SLEDAI. Este trabalho mostrou também níveis significativamente mais elevados de VCAM-1 urinária em pacientes com SLEDAI elevado e NL em comparação com outro grupo com SLEDAI semelhante, porém, sem



nefrite. Este foi o primeiro estudo correlacionando uVCAM-1 e nefrite ativa. Os níveis urinários da VCAM-1 solúvel foram mais elevados em relação aos séricos, reproduzindo os achados observados nos camundongos (8).

Abd-Elkareem e colaboradores realizaram um estudo de caso-controle com o objetivo de avaliar se mudanças nos níveis urinários de VCAM-1 e ICAM-1 refletiriam dano tecidual na NL. Este trabalho incluiu 30 pacientes com NL, 20 pacientes com LES sem nefrite e 20 controles saudáveis. Não foi verificada diferença significativa dos níveis urinários de VCAM-1 e de ICAM-1 solúveis entre os grupos. Porém, ao se dividir o grupo LES com nefrite em dois subgrupos: com alterações histológicas leves (16 pacientes com nefrite classe I e II) e com alterações histológicas avançadas (8 pacientes com nefrite classe III; 5 com classe IV e 1 com classe V), este último subgrupo apresentou níveis de VCAM-1 e de ICAM-1 solúveis urinários significativamente mais elevados em relação aos outros grupos. Além disso, o grupo com alterações histológicas avançadas também apresentou correlação negativa com os níveis séricos de complemento (11). Estes achados sugerem um possível papel da VCAM-1 na patogênese do dano glomerular em pacientes com NL. Os mecanismos que justificam esta associação não são bem conhecidos. Uma possível explicação seria de que a ativação da cascata do complemento através da via clássica com formação local e deposição de imunocomplexos causaria a ativação das células endoteliais, resultando no aumento da expressão das moléculas de adesão. Estas, por sua vez, levariam ao aumento da adesão e migração de células mononucleares, transmigração de monócitos e linfócitos e subsequente dano tecidual (11).

Howe e colaboradores, em um estudo de caso-controle com 121 pacientes asiáticos com LES (33 com NL ativa) e 19 controles saudáveis, encontraram níveis urinários de VCAM-1 significativamente mais elevados em pacientes com NL ativa, correlacionando-se com a atividade da doença renal avaliada através do rSLAM-R (9).

Singh e colaboradores, realizaram um estudo de caso-controle com o objetivo de investigar se os níveis urinários de VCAM-1, *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-

1) e *CXC ligand 16* (CXCL16) seriam preditores da classe da glomerulopatia bem como dos índices de atividade e cronicidade da biópsia renal. Este estudo incluiu 74 pacientes com NL, sendo que destes, 24 possuíam biópsia renal e amostra urinária coletada na mesma data (4 pacientes com NL classe II, 5 classe III, 11 classe IV e 4 classe V), 22 controles com outras nefropatias (6 pacientes com vasculite associada ao anticorpo anti-citoplasma de neutrófilos (*Antineutrophil cytoplasmic antibodies* – ANCA), 6 com glomeruloesclerose segmentar focal (GESF), 7 com nefropatia membranosa e 3 com nefropatia por lesões mínimas), além de 13 controles hígidos. Neste trabalho, os níveis urinários de VCAM-1 correlacionaram-se com os níveis de proteinúria em pacientes com NL e com o SLEDAI. Além disso, os níveis de uVCAM-1 foram significativamente mais elevados em pacientes com biópsia renal apresentando NL classe IV, com correlação positiva com o índice de atividade histopatológica e negativa com o índice de cronicidade. Neste estudo, a elevação de VCAM-1 não foi específica de NL, sendo que pacientes com glomerulonefrite associada ao ANCA, GESF e nefropatia membranosa apresentaram níveis urinários de VCAM-1 semelhantes aos dos pacientes com NL (12).

Kiani e colaboradores realizaram um estudo com 107 pacientes participantes da “*Hopkins Lupus Cohort*”, com o objetivo de relacionar os níveis de uVCAM-1 e a proteinúria (objetivo primário), o SLICC renal, o SLEDAI renal e os índices de atividade e cronicidade da biópsia renal. Este trabalho incluiu de forma consecutiva um grupo de pacientes que apresentava biópsia renal nos últimos 6 meses comprovando o diagnóstico de NL ou apenas presença de proteinúria e outro grupo com pacientes sem estes achados, e os acompanhou por um período médio de 23 meses, com visitas trimestrais. Não está claro o número de indivíduos com nefrite ativa, porém, os autores informam que o SLICC renal foi  $\geq 4$  em 64 observações e o IPC foi  $\geq 0,5$  em 76 observações. Este estudo também não explorou a variação dos níveis urinários do VCAM-1 após o tratamento em pacientes com NL ativa. Neste trabalho, os níveis urinários de VCAM-1 associaram-se fortemente com o *Physician global estimate of disease activity* (PGA), a escala analógica-visual de

atividade renal, o SLICC renal e o IPC, porém, não foi verificada correlação com os índices de atividade e cronicidade em biópsia renal (205).

Wu e colaboradores, realizaram um estudo de caso-controle com o objetivo de determinar os níveis urinários de VCAM-1 e ICAM-1 solúveis em pacientes com NL e de explorar sua correlação com a atividade de doença renal. Este trabalho incluiu 92 pacientes com NL comprovada por biópsia renal e 20 controles hígidos e encontrou níveis urinários de VCAM-1 significativamente elevados em pacientes com NL em relação aos controles. Pacientes com NL ativa apresentaram níveis de VCAM-1 mais elevados e aumento da sua expressão intrarrenal quando comparados a pacientes com NL em remissão. Houve forte correlação positiva entre os níveis de uVCAM-1 e a expressão intrarrenal desta molécula (10).

Soliman e colaboradores realizaram um estudo transversal com o objetivo de investigar a relação entre os níveis urinários de VCAM-1 e de angiostatina e achados histológicos específicos em biópsias renais pareadas com a coleta da amostra urinária em pacientes com NL. Este trabalho incluiu 54 pacientes com NL (9,3% classe II, 42,6% classe III, 35,2% classe IV, 13% classe V). O nível urinário de VCAM-1 foi excelente preditor de índice de atividade  $\geq 7$  na biópsia renal (o qual está associado a pior prognóstico a longo prazo). VCAM-1 também se associou significativamente com crescentes celulares e necrose fibrinoide. O nível urinário de VCAM-1 também apresentou correlação significativa com o SLEDAI, SLEDAI renal, TFG e IPC. Não foi verificada associação do nível urinário de VCAM-1 com C3, C4, anti-dsDNA, sedimento urinário ativo e com o índice de cronicidade na biópsia renal. O grupo NL proliferativa (classe III e IV) apresentou níveis urinários de VCAM-1 significativamente mais elevados em relação ao grupo NL não-proliferativa (classe II e V) (206).

Mok e colaboradores realizaram um estudo transversal com o objetivo de avaliar a performance dos níveis urinários de angiostatina, CXCL4 e VCAM-1 como preditores de atividade de nefrite e compará-los com os marcadores tradicionais, em uma população

chinesa. Este estudo incluiu pacientes com LES inativo (n=80), com LES ativo não-renal (n=67), com LES ativo renal (n=80) e controles saudáveis (n=53). O nível urinário de VCAM-1 foi significativamente mais elevado em pacientes com doença renal ativa em comparação com doença ativa não-renal, LES inativo e controles. O nível urinário de VCAM-1 apresentou correlação significativa com o SLEDAI total, o PGA e o IPC. Sessenta e oito pacientes realizaram biópsia renal e coleta de amostras urinárias dentro de 6 semanas. Nestes pacientes, os níveis urinários de VCAM-1 não apresentaram diferença significativa entre pacientes com nefrite proliferativa (classes III, IV, ±V) e outras classes histológicas (I, II e V pura). Os níveis urinários de VCAM-1 apresentaram correlação significativa com o índice de atividade na biópsia renal, mas não apresentou correlação com o índice de cronicidade (207).

*Wither* e colaboradores realizaram um estudo longitudinal que incluiu 21 pacientes com NL comprovada por biópsia renal e os acompanhou por um período mínimo de 2 anos após o início do tratamento. Não foi observada diferença significativa nos níveis urinários de VCAM-1 entre pacientes com resposta renal completa e pacientes com resposta renal parcial ou falha ao tratamento após 3-6 meses em relação ao basal. Contudo, em 1 ano após o início do tratamento, o VCAM-1 urinário demonstrou diferença significativa em relação ao *baseline* em pacientes com resposta renal completa (n=12) comparada aos que falharam ao tratamento (n=5). Este é o único estudo até o momento avaliando os níveis urinários de VCAM-1 como preditores de resposta ao tratamento da NL e foi publicado apenas como resumo no Congresso Europeu de Reumatologia (EULAR), em 2016 (290).

A tabela 5 resume os principais artigos publicados relacionando níveis de uVCAM-1 e NL.

Tabela 5. Resumo dos principais artigos publicados relacionando os níveis de uVCAM-1 e nefrite lúpica

Estudo (ref)	Pacientes	Objetivos	Resultados
Molad et al, 2002 (7)	Caso-controle: 24 LES e 7 controles	Determinar níveis urinários de VCAM-1 e ICAM-1 em pacientes com LES e verificar sua relação com características clínicas e laboratoriais, grau de atividade e dano	Elevados níveis urinários de VCAM-1 em pacientes com LES em comparação com controles saudáveis, correlacionando-se significativamente com redução de C3, SLEDAI, SLICC/ACR <i>damage index</i> e TFG. Ausência de correlação com nefrite
Wu et al, 2007 (8)	Caso-controle: 38 LES (18 com nefrite ativa), 6 AR e 15 controles hígidos	Avaliar níveis séricos e urinários de VCAM-1, P-selectina, TNFR-1 e CXCL16 e correlacioná-los com LES e nefrite ativa	Correlação positiva da VCAM-1 urinária com o IPC e com o SLEDAI. Níveis significativamente mais elevados de VCAM-1 urinária em pacientes com LES e NL em comparação com LES sem NL com SLEDAI semelhantes
Abd-Elkareem et al, 2010 (11)	Caso-controle: 30 NL, 20 LES sem nefrite e 20 controles saudáveis	Avaliar se as alterações nos níveis de VCAM-1 e ICAM-1 urinários refletem dano tecidual na NL	Níveis de VCAM-1 e de ICAM-1 urinários significativamente mais elevados no grupo LES com nefrite e alterações histológicas avançadas (classes III, IV e V) em comparação com o grupo sem alterações histológicas avançadas (classes I e II), LES sem nefrite e controles saudáveis. O grupo com alterações histológicas avançadas apresentou correlação negativa com os níveis séricos de complemento
Howe et al, 2012 (9)	Caso-controle: 121 LES (33 NL ativa) e 19 controles saudáveis	Avaliar a relação entre os níveis urinários de VCAM-1 e ICAM-1 em pacientes com LES com e sem nefrite e explorar sua correlação com a atividade da doença renal	Níveis mais elevados de VCAM-1 e ICAM-1 urinários nos casos em relação aos controles. Níveis significativamente mais altos de VCAM-1 em pacientes com LES e NL ativa, com correlação com rSLAM-R
Singh et al, 2012 (12)	Caso-controle: 74 NL com BX renal, (24 com amostra urinária concomitante), 22 com outras glomerulopatias e 13 controles saudáveis	Investigar se os níveis urinários de CXCL16, MCP-1 e VCAM-1 em pacientes com NL são preditores de características particulares da patologia na biópsia renal	O VCAM-1 apresentou correlação positiva com o índice de atividade na BX renal e nefrite classe IV, e correlação negativa com o índice de cronicidade. O VCAM-1 urinário também está elevado em pacientes com GN ANCA-associada, GESF e nefropatia membranosa, não sendo específico de NL
Kiani et al, 2012 (205)	Coorte de 107 pacientes: NL comprovada por BX renal ou proteinúria e pacientes sem estas condições	Relacionar os níveis de VCAM-1 e NGAL urinários com os níveis de proteinúria e índices histopatológicos de atividade e cronicidade. Visitas trimestrais, 23 meses de acompanhamento	VCAM-1 urinário associou-se fortemente com o PGA, a escala análogo-visual renal, o IPC e o SLICC renal. Associou-se também com $IPC \geq 0,5$ . O NGAL não apresentou associação significativa com nenhuma dessas medidas

Wu et al, 2015 (10)	Caso-controle: 92 NL com BX e 20 controles saudáveis	Determinar os níveis urinários de ICAM-1 e VCAM-1 em pacientes com NL e explorar sua correlação com atividade de doença renal	Os níveis urinários de VCAM-1 e ICAM-1 foram significativamente mais elevados em pacientes com NL ativa. Correlação positiva forte foi encontrada entre a expressão intrarrenal e os níveis urinários de VCAM-1 e ICAM-1
Soliman et al, 2017 (206)	Estudo transversal: 54 NL com BX, amostras urinárias coletadas dentro de 5 dias da BX renal	Avaliar a relação dos níveis urinários de VCAM-1 e de angiostatina com características histológicas específicas da NL	VCAM-1 foi excelente preditor de índice de atividade na BX renal $\geq 7$ (associado com mau prognóstico a longo prazo) comparado às métricas tradicionais. VCAM-1 foi significativamente associado a crescentes fibrosos
Mok et al, 2018 (207)	Estudo transversal: 80 LES inativo, 67 LES ativo não-renal, 80 LES ativo renal e 53 controles saudáveis	Avaliar a performance dos níveis urinários de angiostatina, CXCL4 e VCAM-1 como preditores de atividade de doença renal em comparação com os marcadores tradicionais, em população chinesa	O nível urinário de VCAM-1 foi significativamente mais elevado em pacientes com doença renal ativa em comparação com doença não-renal, LES inativo e controles saudáveis

ANCA: *antineutrophil cytoplasmic antibodies*; AR: artrite reumatoide; BX: biópsia; CXCL: *CXC ligand*; GESF: glomeruloesclerose segmentar e focal; GN: glomerulonefrite; ICAM: *intercellular adhesion molecule*; IPC: índice proteinúria/creatinúria em amostra de urina; LES: lúpus eritematoso sistêmico; MCP: *monocyte chemoattractant protein*; NGAL: *neutrophil gelatinase-associated lipocalin*; NL: nefrite lúpica; PGA: *Physician global estimate of disease activity*; SLAM: *Systemic Lupus Activity Measure*; SLEDAI: *Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index*; SLICC/ACR: *Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology*; TFG: taxa de filtração glomerular; TNFR: *tumor necrosis factor receptor*; VCAM: *Vascular cell adhesion molecule*.

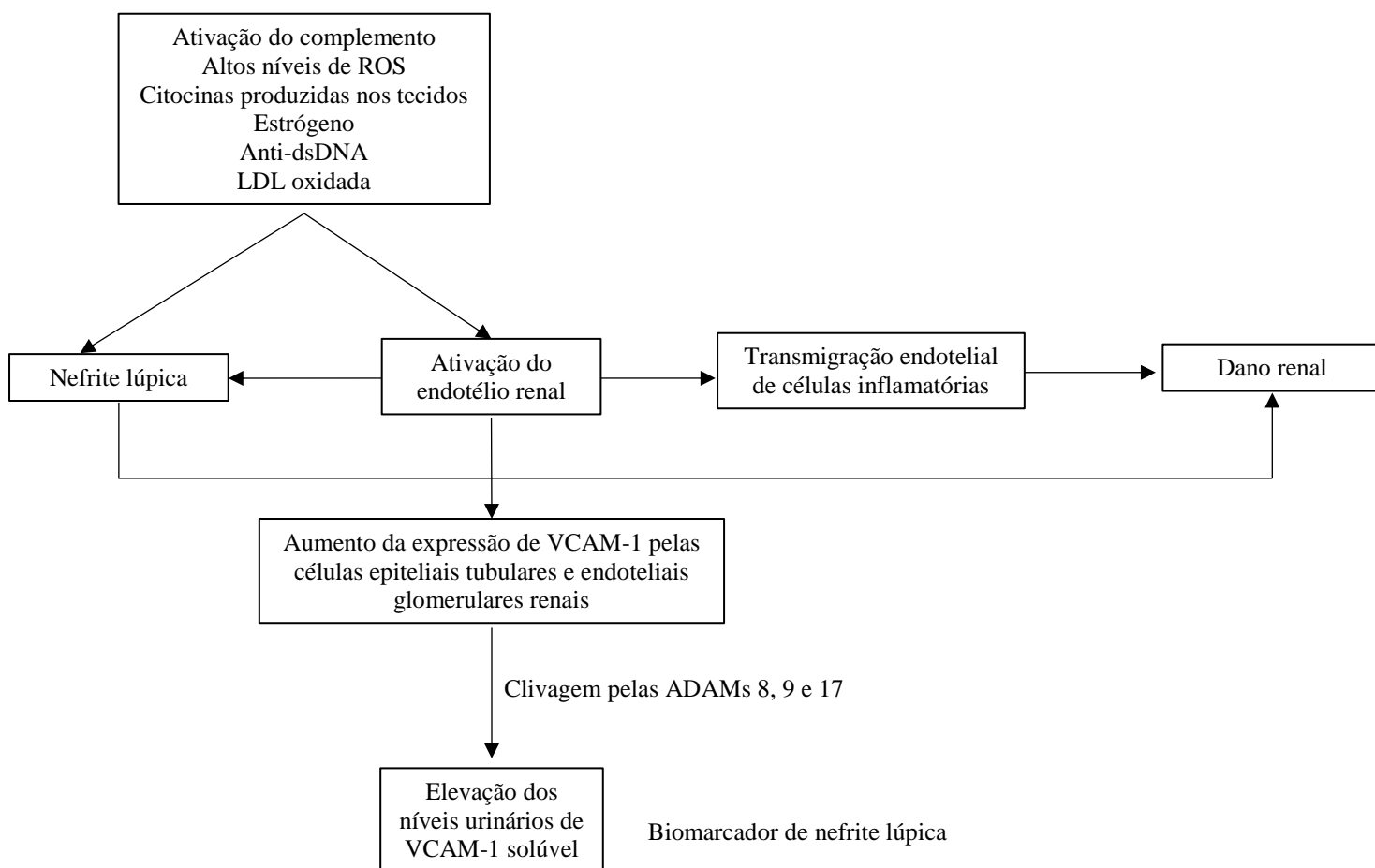
### 3 MARCO CONCEITUAL

Diversos fatores como a ativação do complemento e depósito de imunocomplexos, a formação de altos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a produção de citocinas no tecido renal, participam da patogênese da NL. Estes fatores, ao mesmo tempo, contribuem para que ocorram mudanças nos mecanismos de controle homeostático do endotélio renal, estado conhecido como “ativação endotelial”.

Durante a ativação endotelial, ocorre um aumento da expressão de moléculas de adesão, como VCAM-1, o que favorece a interação dos leucócitos com o endotélio vascular e sua transmigração para o sítio de inflamação. Além dos leucócitos, outras células e fragmentos celulares também participam da resposta inflamatória, como as células dendríticas, os fibroblastos, as células endoteliais e as plaquetas, entre outras. Os

leucócitos, uma vez ativados, liberam produtos que podem também agredir os tecidos, ocasionando um processo inflamatório exacerbado que acaba resultando, no caso da NL, em dano renal.

Com o aumento da expressão de VCAM-1 pelas células epiteliais tubulares e endoteliais glomerulares renais acaba aumentando também sua clivagem através da ação das ADAMs 8,9 e 17. Como resultado, observamos a elevação dos níveis urinários de VCAM-1 solúvel, o que justifica a investigação da utilidade desta molécula como biomarcador de atividade da NL e de resposta ao seu tratamento. A figura 5 ilustra o marco conceitual desse projeto.



**Figura 5. Marco conceitual: níveis urinários de VCAM-1 solúvel como biomarcador de atividade da nefrite lúpica e de resposta ao tratamento. ADAM: *a desintegrin and metalloproteinase*; LDL: *low density lipoprotein*; ROS: *reactive oxygen species*; VCAM: *vascular cell adhesion molecule*.**

#### 4 JUSTIFICATIVA

A NL é uma das principais causas de morbidade e de mortalidade em pacientes com LES, afetando até 60% dos pacientes durante o curso da doença (291,292). O acometimento renal pode não ser diagnosticado até o desenvolvimento de síndrome nefrótica ou nefrítica, o que contribui para o atraso do tratamento e o aumento do risco de evolução para doença renal terminal (293). A monitorização renal adequada é importante no sentido de tentar prever ou detectar precocemente a NL e assim iniciar o tratamento mais cedo, reduzindo o dano renal a longo prazo. Os exames laboratoriais atualmente usados para monitorizar a atividade renal da doença, incluindo a proteinúria, a creatinina sérica e os níveis de complementos, apresentam pobre sensibilidade e especificidade (32,294). A biópsia renal pode ser mais específica, mas é invasiva, geralmente indicada apenas quando o paciente já apresenta dano renal significativo e não é usada no acompanhamento da doença.

No contexto da NL, os biomarcadores urinários podem ser mais específicos de dano renal do que os séricos e, além disso, são mais acessíveis (6). A VCAM-1 é uma molécula de adesão celular envolvida na migração e recrutamento de células inflamatórias através da sua interação com uma integrina (VLA-4). Diversos estudos já foram realizados e correlacionaram os níveis urinários de VCAM-1 solúvel com o IPC, com a atividade de doença geral (SLEDAI) (7,8) e com a presença de NL ativa (9,10), sendo que os pacientes com alterações histológicas mais avançadas (nefrite classe III, IV e V) apresentaram os valores mais elevados (11,12). O papel do VCAM-1 na monitorização do tratamento da NL e seu valor como preditor de atividade renal de doença ainda não estão estabelecidos, o que justifica a realização deste trabalho.



## 5 OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo primário

Avaliar o desempenho dos níveis de uVCAM-1 em pacientes com LES como biomarcador de atividade de NL e de resposta ao tratamento.

### 5.2 Objetivos secundários

Avaliar a performance do nível urinário de VCAM-1 no diagnóstico de NL, estabelecendo seu melhor ponto de corte capaz de diferenciar ente doença ativa e inativa, através da *receiver operating characteristic curve* (ROC) e compará-lo com os biomarcadores usados tradicionalmente.

Avaliar a correlação entre os níveis de uVCAM-1 e biomarcadores tradicionais de NL (anti-dsDNA, C3, C4 e IPC, taxa de filtração glomerular, creatinina sérica, leucocitúria, hematúria e cilindrúria).

Avaliar a correlação entre os níveis de uVCAM-1 e escores de atividade renal de NL (“*Systemic Lupus International Collaborating Clinics (SLICC) Renal Activity*” (295)

(SLICC renal); SLEDAI renal (composto pelos 4 itens do SLEDAI referentes à atividade renal); “*The renal Systemic Lupus Activity Measure Revised*” (rSLAM-R) (126)).

Avaliar a correlação entre os níveis de uVCAM-1 e o “*The Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index 2000*” (SLEDAI-2K) (296) para avaliação da atividade global do LES e com o “*The Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College Of Rheumatology Damage Index*” (SLICC ACR DAMAGE INDEX) (130) para avaliação de dano.

## 6 REFERÊNCIAS

1. Swaak a. JG, Huysen V, Nossent JC, Smeenk RJT. Antinuclear antibody profiles in relation to specific disease manifestations of systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol.* 1990;9(1 Supplement):82–95.
2. Beck LH, Salant DJ. Treatment of membranous lupus nephritis: where are we now? *J Am Soc Nephrol.* 2009;20(4):690–1.
3. Danila MI, Pons-Estel GJ, Zhang J, Vilá LM, Reveille JD, Alarcón GS. Renal damage is the most important predictor of mortality within the damage index: Data from LUMINA LXIV, a multiethnic US cohort. *Rheumatology.* 2009;48(5):542–5.
4. Bomback AS, Appel GB. Updates on the treatment of lupus nephritis. *J Am Soc Nephrol.* 2010;21(12):2028–35.
5. Coremans IEM, Spronk PE, Bootsma H, Daha MR, van der Voort EAM, Kater L, et al. Changes in antibodies to C1q predict renal relapses in systemic lupus erythematosus. *Am J Kidney Dis.* 1995;26(4):595–601.
6. Reyes-Thomas J, Blanco I, Putterman C. Urinary Biomarkers in Lupus Nephritis. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2010;40(3):138–50.

7. Molad Y, Miroshnik E, Sulkes J, Pitlik S, Weinberger A, Monselise Y. Urinary soluble VCAM-1 in systemic lupus erythematosus: A clinical marker for monitoring disease activity and damage. *Clin Exp Rheumatol*. 2002;20(3):403–6.
8. Wu T, Xie C, Wang HW, Zhou XJ, Schwartz N, Calixto S, et al. Elevated urinary VCAM-1, P-selectin, soluble TNF receptor-1, and CXC chemokine ligand 16 in multiple murine lupus strains and human lupus nephritis. *J Immunol*. 2007;179(10):7166–75.
9. Howe HS, Kong KO, Thong BY, Law WG, Chia FLA, Lian TY, et al. Urine sVCAM-1 and sICAM-1 levels are elevated in lupus nephritis. *Int J Rheum Dis*. 2012;15(1):13–6.
10. Wu C, Yang M, Zhou Z, Feng X, Zhong X, Cui S, et al. Urinary soluble intercellular adhesion molecule-1 and vascular cellular adhesion molecule-1: potential biomarkers of active lupus nephritis. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 2015;35(9):1272–6, 1282.
11. Abd-Elkareem MI, Al Tamimy HM, Khamis OA, Abdellatif SS, Hussein MRA. Increased urinary levels of the leukocyte adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1 in human lupus nephritis with advanced renal histological changes: Preliminary findings. *Clin Exp Nephrol*. 2010;14(6):548–57.
12. Singh S, Wu T, Xie C, Vanarsa K, Han J, Mahajan T, et al. Urine VCAM-1 as a marker of renal pathology activity index in lupus nephritis. *Arthritis Res Ther*. 2012;14(4):R164.
13. Michet CJ, McKenna CH, Elveback LR, Kaslow RA, Kurland LT. Epidemiology of systemic lupus erythematosus and other connective tissue diseases in Rochester, Minnesota, 1950 through 1979. *Mayo Clin Proc*. 1985;60(2):105–13.
14. Siegel M, Lee SL. The epidemiology of systemic lupus erythematosus. *Semin Arthritis Rheum*. 1973;3(1):1–54.
15. Vilar MJP, Rodrigues JM, Sato EI. Incidência de lúpus eritematoso sistêmico em Natal, RN - Brasil. *Rev Bras Reumatol*. 2003;43(6):347–51.
16. Hochberg MC, Perlmuter DL, Medsger TA, Steen V, Weisman MH, White B, et al. Prevalence of self-reported physician-diagnosed systemic lupus erythematosus in the USA. *Lupus*. 1995;4(6):454–6.

17. Chakravarty EF, Bush TM, Manzi S, Clarke AE, Ward MM. Prevalence of adult systemic lupus erythematosus in California and Pennsylvania in 2000: Estimates obtained using hospitalization data. *Arthritis Rheum.* 2007;56(6):2092–4.
18. 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(2):113–24.
19. Kasitanon N, Magder LS, Petri M. Predictors of Survival in Systemic Lupus Erythematosus. *Medicine (Baltimore).* 2006;85(3):147–56.
20. Feldman CH, Hiraki LT, Liu J, Fischer MA, Solomon DH, Alarcón GS, et al. Epidemiology and sociodemographics of systemic lupus erythematosus and lupus nephritis among US adults with Medicaid coverage, 2000–2004. *Arthritis Rheum.* 2013;65(3):753–63.
21. Alarcon GS, McGwin Jr. G, Petri M, Reveille JD, Ramsey-Goldman R, Kimberly RP. Baseline characteristics of a multiethnic lupus cohort: PROFILE. *Lupus.* 2002;11(2):95–101.
22. Wang F, Wang CL, Tan CT, Manivasagar M. Systemic lupus erythematosus in Malaysia: a study of 539 patients and comparison of prevalence and disease expression in different racial and gender groups. *Lupus.* 1997;6(3):248–53.
23. Cervera R, Khamashta MA, Font J, Sebastiani GD, Gil A, Lavilla P, et al. Morbidity and mortality in systemic lupus erythematosus during a 10-year period: a comparison of early and late manifestations in a cohort of 1,000 patients. *Mortality.* 2003;82(5):299–308.
24. Seligman VA, Lum RF, Olson JL, Li H, Criswell LA. Demographic differences in the development of lupus nephritis: A retrospective analysis. *Am J Med.* 2002;112(9):726–9.
25. Bastian HM, Roseman JM, McGwin G, Alarcón GS, Friedman AW, Fessler BJ, et al. Systemic lupus erythematosus in three ethnic groups. XII. Risk factors for lupus nephritis after diagnosis. *Lupus.* 2002;11(3):152–60.
26. Contreras G, Lenz O, Pardo V, Borja E, Cely C, Iqbal K, et al. Outcomes in African Americans and Hispanics with lupus nephritis. *Kidney Int.* 2006;69(10):1846–51.

27. Nossent HC, Henzen-Logmans SC, Vroom TM, Berden JHM, Swaak TJG. Contribution of renal biopsy data in predicting outcome in lupus nephritis. Analysis of 116 patients. *Arthritis Rheum.* 1990;33:970–7.
28. Wallace D, Bevara H. *Dubois' Lupus Erythematosus and Related Syndromes.* 9th ed. Elsevier; 2018. 816 p.
29. Hochberg MC. Updating the American college of rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1997;40(9):1725–1725.
30. Petri M, Orbai AM, Alarcón GS, Gordon C, Merrill JT, Fortin PR, et al. Derivation and validation of the systemic lupus international collaborating clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2012;64(8):2677–86.
31. Rovin BH, Birmingham DJ, Nagaraja HN, Yu CY, Hebert LA. Biomarker discovery in human SLE nephritis. *Bull NYU Hosp Jt Dis.* 2007;65(3):187–93.
32. Moroni G, Radice A, Giammarresi G, Quaglini S, Gallelli B, Leoni A, et al. Are laboratory tests useful for monitoring the activity of lupus nephritis? A 6-year prospective study in a cohort of 228 patients with lupus nephritis. *Ann Rheum Dis.* 2009;68(2):234–7.
33. Esdaile JM, Joseph L, Abrahamowicz M, Li Y, Danoff D, Clarke a E. Routine immunologic tests in systemic lupus erythematosus: is there a need for more studies? *J Rheumatol.* 1996;23(11):1891–6.
34. Esdaile JM, Abrahamowicz M, Joseph L, MacKenzie T, Li Y, Danoff D. Laboratory tests as predictors of disease exacerbations in systemic lupus erythematosus: Why some tests fail. *Arthritis Rheum.* 1996;39(3):370–8.
35. Ho A, Barr SG, Magder LS, Petri M. A decrease in complement is associated with increased renal and hematologic activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2001;44(10):2350–7.
36. Ho A, Magder LS, Barr SG, Petri M. Decreases in anti-double-stranded DNA levels are associated with concurrent flares in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2001;44(10):2342–9.

37. Lee LC, Lam KK, Lee C Te, Chen JB, Tsai TH, Huang SC. "Full house" proliferative glomerulonephritis: An unreported presentation of subacute infective endocarditis. *J Nephrol.* 2007;20(6):745–9.
38. Haas M, Kaul S, Eustace J a. HIV-associated immune complex glomerulonephritis with "lupus-like" features: a clinicopathologic study of 14 cases. *Kidney Int.* 2005;67(4):1381–90.
39. Ramos-Casals M, Font J, García-Carrasco M, Cervera R, Jiménez S, Trejo O, et al. Hepatitis C virus infection mimicking systemic lupus erythematosus: study of hepatitis C virus infection in a series of 134 Spanish patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2000;43(12):2801–6.
40. Smet A De, Kuypers D, Evenepoel P, Maes B, Messiaen T, Damme B Van, et al. Case Report " Full house " positive immunohistochemical membranoproliferative glomerulonephritis in a patient with portosystemic shunt. *Nephrol Dial Transplant.* 2001;16:2258–62.
41. Rich SA. De novo synthesis and secretion of a 36-kD protein by cells that form lupus inclusions in response to  $\alpha$ -interferon. *J Clin Invest.* 1995;95(1):219–26.
42. Weening JANJ, Agati VDD, Schwartz MM, Seshan S V, Alpers CE, Appel GB, et al. The Classification of Glomerulonephritis in Systemic Lupus Erythematosus Revisited. 2004;1982(1):241–50.
43. Furness PN, Taub N. Interobserver reproducibility and application of the ISN/RPS classification of lupus nephritis-a UK-wide study. *Am J Surg Pathol.* 2006;30(8):1030–5.
44. Huong DL, Papo T, Beaufils H, Wechsler B, Blétry O, Baumelou A, et al. Renal involvement in systemic lupus erythematosus. A study of 180 patients from a single center. *Medicine (Baltimore).* 1999;78:148–66.
45. Najafi CC, Korbet SM, Lewis EJ, Schwartz MM, Reichlin M, Evans J. Significance of histologic patterns of glomerular injury upon long-term prognosis in severe lupus glomerulonephritis. *Kidney Int.* 2001;59(6):2156–63.
46. Lu J, Tam LS, Lai FMM, Kwan BCH, Choi PCL, Li EKM, et al. Repeat renal biopsy in lupus nephritis: A change in histological pattern is common. *Am J Nephrol.* 2011;34(3):220–5.

47. Schwartz MM, Kawala KS, Corwin HL, Lewis EJ. The prognosis of segmental glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus. *Kidney Int.* 1987;32(2):274–9.
48. Schwartz MM, Lan SP, Bonsib SM, Gephardt GN, Sharma HM. Clinical outcome of three discrete histologic patterns of injury in severe lupus glomerulonephritis. *Am J Kidney Dis.* 1989;13(4):273–83.
49. Lloyd W, SCHUR PH. Immune complexes, complement, and anti-DNA in exacerbations of systemic lupus erythematosus (SLE). *Medicine (Baltimore).* 1981;60(3):208–17.
50. Akashi Y, Oshima S, Takeuchi A, Kubota T, Shimizu J, Shimizu E, et al. Identification and analysis of immune cells infiltrating into the glomerulus and interstitium in lupus nephritis. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi.* 1995;18(5):545–51.
51. Davis JC, Tassiulas IO, Boumpas DT. Lupus nephritis. *Curr Opin Rheumatol.* 1996;8(5):415–23.
52. Caster DJ, Korte EA, Nanda SK, McLeish KR, Oliver RK, G'Sell RT, et al. ABIN1 Dysfunction as a Genetic Basis for Lupus Nephritis. *J Am Soc Nephrol.* 2013;24(11):1743–54.
53. Iwamoto T, Niewold TB. Genetics of human lupus nephritis. *Clin Immunol. Elsevier B.V.*; 2017;185:32–9.
54. Salmon JE, Millard S, Schachter LA, Arnett FC, Ginzler EM, Gourley MF, et al. Fc gamma RIIA alleles are heritable risk factors for lupus nephritis in African Americans. *J Clin Invest.* 1996;97(5):1348–54.
55. Gelmetti AP, Freitas AC, Woronik V, Barros RT, Bonfá E, Monteiro RC. Polymorphism of the Fcγ<sub>2</sub>RIIα IgG receptor in patients with lupus nephritis and glomerulopathy. *J Rheumatol.* 2006;33(3):523–30.
56. Karassa FB, Trikalinos TA, Ioannidis JPA. Role of the Fcγ receptor IIa polymorphism in susceptibility to systemic lupus erythematosus and lupus nephritis: A meta-analysis. *Arthritis Rheum.* 2002;46(6):1563–71.

57. Karassa FB, Trikalinos TA, Ioannidis JPA, De Haas M, Edberg JC, Kimberly R, et al. The Fc $\gamma$ RIIIA-F158 allele is a risk factor for the development of lupus nephritis: A meta-analysis. *Kidney Int.* 2003;63(4):1475–82.
58. Aitman TJ, Dong R, Vyse TJ, Norsworthy PJ, Johnson MD, Smith J, et al. Copy number polymorphism in Fcgr3 predisposes to glomerulonephritis in rats and humans. *Nature.* 2006;439(February):851–5.
59. Freedman BI, Langefeld CD, Andringa KK, Croker JA, Williams AH, Garner NE, et al. End-stage renal disease in African Americans with lupus nephritis is associated with APOL1. *Arthritis Rheumatol (Hoboken, NJ).* 2014;66(2):390–6.
60. Chung S a, Brown EE, Williams AH, Ramos PS, Berthier CC, Bhangale T, et al. Lupus Nephritis Susceptibility Loci in Women with Systemic Lupus Erythematosus. *J Am Soc Nephrol.* 2014; 25(12):2859-70.
61. Bolin K, Sandling JK, Zickert A, Jönsen A, Sjöwall C, Svenungsson E, et al. Association of STAT4 polymorphism with severe renal insufficiency in lupus nephritis. *PLoS One.* 2013;8(12): e84450.
62. Taylor KE, Chung SA, Graham RR, Ortmann WA, Lee AT, Langefeld CD, et al. Risk alleles for systemic lupus erythematosus in a large case-control collection and associations with clinical subphenotypes. *PLoS Genet.* 2011;7(2): e1001311.
63. Niu Z, Zhang P, Tong Y. Value of HLA-DR genotype in systemic lupus erythematosus and lupus nephritis: A meta-analysis. *Int J Rheum Dis.* 2015;18(1):17–28.
64. Yang W, Zhao M, Hirankarn N, Lau CS, Mok CC, Chan TM, et al. ITGAM is associated with disease susceptibility and renal nephritis of systemic lupus erythematosus in Hong Kong Chinese and Thai. *Hum Mol Genet.* 2009;18(11):2063–70.
65. Kim-Howard X, Maiti AK, Anaya J-M, Bruner GR, Brown E, Merrill JT, et al. ITGAM coding variant (rs1143679) influences the risk of renal disease, discoid rash and immunological manifestations in patients with systemic lupus erythematosus with European ancestry. *Ann Rheum Dis.* 2010;69(7):1329–32.
66. Sanchez E, Nadig A, Richardson BC, Freedman BI, Kaufman KM, Kelly JA, et al. Phenotypic associations of genetic susceptibility loci in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis.* 2011;70(10):1752–7.



67. Zuniga R, Markowitz GS, Arkachaisri T, Imperatore EA, D'Agati VD, Salmon JE. Identification of IgG subclasses and C-reactive protein in lupus nephritis: The relationship between the composition of immune deposits and Fc gamma receptor type IIA alleles. *Arthritis Rheum.* 2003;48(2):460–70.
68. Wu J, Edberg JC, Redecha PB, Bansal V, Guyre PM, Coleman K, et al. A novel polymorphism of Fc gammaRIIIa (CD16) alters receptor function and predisposes to autoimmune disease. *J Clin Invest.* 1997;100(5):1059–70.
69. Seligman VA, Suarez C, Lum R, Inda SE, Lin D, Li H, et al. The Fc gamma receptor IIIA-158F allele is a major risk factor for the development of lupus nephritis among Caucasians but not non-Caucasians. *Arthritis Rheum.* 2001;44(3):618–25.
70. Jönsen A, Gunnarsson I, Gullstrand B, Svenungsson E, Bengtsson AA, Nived O, et al. Association between SLE nephritis and polymorphic variants of the CRP and FcγRIIIa genes. *Rheumatology.* 2007;46(9):1417–21.
71. Alarcón GS, McGwin G, Petri M, Ramsey-Goldman R, Fessler BJ, Vilá LM, et al. Time to renal disease and end-stage renal disease in PROFILE: A multiethnic lupus cohort. *PLoS Med.* 2006;3(10):1949–56.
72. Kawasaki A, Ito S, Furukawa H, Hayashi T, Goto D, Matsumoto I, et al. Association of TNFAIP3 interacting protein 1, TNIP1 with systemic lupus erythematosus in a Japanese population: a case-control association study. *Arthritis Res Ther.* 2010;12(5):R174.
73. Taylor KE, Remmers EF, Lee AT, Ortmann WA, Plenge RM, Tian C, et al. Specificity of the STAT4 genetic association for severe disease manifestations of systemic lupus erythematosus. *PLoS Genet.* 2008;4(5): e1000084.
74. Zhou XJ, Cheng FJ, Qi YY, Zhao MH, Zhang H. A replication study from Chinese supports association between lupus-risk allele in TNFSF4 and renal disorder. *Biomed Res Int.* 2013;2013: 597921.
75. Krishnan MR, Wang C, Marion TN. Anti-DNA autoantibodies initiate experimental lupus nephritis by binding directly to the glomerular basement membrane in mice. *Kidney Int.* 2012;82(2):184–92.
76. Lech M, Anders H-J. The Pathogenesis of Lupus Nephritis. *J Am Soc Nephrol.* 2013;24:1357–66.

77. Liu Y, Anders HJ. Lupus nephritis: From pathogenesis to targets for biologic treatment. *Nephron - Clin Pract.* 2014;128:224–31.
78. Schwartz N, Goilav B, Putterman C. The pathogenesis, diagnosis and treatment of lupus nephritis. *Curr Opin Rheumatol.* 2014;29(6):997–1003.
79. Van der Vlag J, Berden JHM. Lupus Nephritis: Role of Antinucleosome Autoantibodies. *Semin Nephrol.* 2011;31(4):376–89.
80. Bruschi M, Galetti M, Sinico RA, Moroni G, Bonanni A, Radice A, et al. Glomerular Autoimmune Multicomponents of Human Lupus Nephritis In Vivo (2): Planted Antigens. *J Am Soc Nephrol.* 2015;26(8):1905–24.
81. Couser WG. Basic and Translational Concepts of Immune-Mediated Glomerular Diseases. *J Am Soc Nephrol.* 2012;23:381–99.
82. Moroni G, Quaglini S, Gravellone L, Gallelli B, Leoni A, Messa P, et al. Membranous Nephropathy in Systemic Lupus Erythematosus: Long-Term Outcome and Prognostic Factors of 103 Patients. *Semin Arthritis Rheum.* 2012;41(5):642–51.
83. Song YS, Min KW, Kim JH, Kim GH, Park MH. Differential diagnosis of lupus and primary membranous nephropathies by IgG subclass analysis. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2012;7(12):1947–55.
84. Sam R, Joshi A, James S, Jen KY, Amani F, Hart P, et al. Lupus-like membranous nephropathy: Is it lupus or not? *Clin Exp Nephrol.* 2014;19(3):395–402.
85. Rezende G, Viana V, Malheiros D, Borba E, Silva N, Silva C, et al. Podocyte injury in pure membranous and proliferative lupus nephritis: distinct underlying mechanisms of proteinuria? *Lupus.* 2014;23:255–62.
86. Wallace DJ, Hahn BH. *Dubois' Lupus Erythematosus and Related Syndromes.* 8th ed. Philadelphia; 2012.
87. Mannik M, Merrill CE, Stamps LD, Wener MH. Multiple autoantibodies form the glomerular immune deposits in patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 2003;30(7):1495–504.

88. Mjelle JE, Rekvig OP, Van Der Vlag J, Fenton K a. Nephritogenic antibodies bind in glomeruli through interaction with exposed chromatin fragments and not with renal cross-reactive antigens. *Autoimmunity*. 2011;44(5):373–83.
89. Bagavant H, Fu SM. Pathogenesis of kidney disease in systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol*. 2009;21(5):489–94.
90. Vlahakos D V, Foster MH, Adams S, Katz M, Ucci a a, Barrett KJ, et al. Anti-DNA antibodies form immune deposits at distinct glomerular and vascular sites. *Kidney Int*. 1992;41(6):1690–700.
91. Valle RR, Eaton RB, Schnneider G, Schur PH. Complement activation by antibodies to DNA in systemic lupus erythematosus measured by enzyme immunoassay. *Clin Immunol Immunopathol*. 1985;34(3):345–54.
92. Gilkeson GS, Bernstein K, Phippen AM, Clarke SH, Marion T, Pisetsky DS, et al. The influence of variable-region somatic mutations on the specificity and pathogenicity of murine monoclonal anti-DNA antibodies. *Clin Immunol Immunopathol*. 1995;76(1 Pt 1):59–1229.
93. Du H, Chen M, Zhang Y, Zhao M-H, Wang H-Y. Cross-reaction of anti-DNA autoantibodies with membrane proteins of human glomerular mesangial cells in sera from patients with lupus nephritis. *Clin Exp Immunol*. 2006;145(1):21–7.
94. Yung S, Tsang RCW, Leung JKH, Chan TM. Increased mesangial cell hyaluronan expression in lupus nephritis is mediated by anti-DNA antibody-induced IL-1beta. *Kidney Int*. 2006;69(2):272–80.
95. Seelen MA, Trouw LA, Daha MR. Diagnostic and prognostic significance of anti-C1q antibodies in systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2003;12(6):619–24.
96. Marto N, Bertolaccini ML, Calabuig E, Hughes GR V, Khamashta MA. Anti-C1q antibodies in nephritis: correlation between titres and renal disease activity and positive predictive value in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*. 2005;64(3):444–8.
97. Schur P.H., Monroe M. RN. The gammaG subclass of antinuclear and antinucleic acid antibodies. *Arthritis Rheum*. 1972;15:174–82.

98. Belmont HM, Abramson SB, Lie JT. Pathology and pathogenesis of vascular injury in systemic lupus erythematosus. Interactions of inflammatory cells and activated endothelium. *Arthritis Rheum.* 1996;39(1):9–22.
99. Malide D, Russo P, Bendayan M. Presence of tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 in renal mesangial cells of lupus nephritis patients. *Hum Pathol.* 1995;26(5):558–64.
100. Balomenos D, Rumold R, Theofilopoulos AN. Interferon-gamma is required for lupus-like disease and lymphoaccumulation in MRL-lpr mice. *J Clin Invest.* 1998;101(2):364–71.
101. Vielhauer V, Anders HJ, Schlöndorff D. Chemokines and Chemokine Receptors as Therapeutic Targets in Lupus Nephritis. *Semin Nephrol.* 2007;27(1):81–97.
102. Delmas Y, Viallard JF, Solanilla A, Villeneuve J, Pasquet JM, Belloc F, et al. Activation of mesangial cells by platelets in systemic lupus erythematosus via a CD154-dependent induction of CD40. *Kidney Int.* 2005;68(5):2068–78.
103. Yin Y, Wu X, Shan G, Zhang X. Diagnostic value of serum anti-C1q antibodies in patients with lupus nephritis: a meta-analysis. *Lupus.* 2012;21(10):1088–97.
104. Birmingham DJ, Bitter JE, Ndukwe EG, Dials S, Gullo TR, Conroy S, et al. Relationship of circulating anti-C3b and anti-C1q IgG to lupus nephritis and its flare. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2016;11(1):47–53.
105. Ribeiro FM, Fabris CL, Bendet I, Lugon JR. Survival of lupus patients on dialysis: A Brazilian cohort. *Rheumatol (United Kingdom).* 2013;52(3):494–500.
106. Ward MM. Outcomes of renal transplantation among patients with end-stage renal disease caused by lupus nephritis. *Kidney Int.* 2000;57(5):2136–43.
107. Praga M. Slowing the progression of renal failure. *Kidney Int Suppl.* 2002;61(80):18–22.
108. Mann JFE. What's new in hypertension 2010? *Nephrol Dial Transplant.* 2011;26(1):50–5.
109. Plazak W, Pasowicz M, Kostkiewicz M, Podolec J, Tomkiewicz-Pajak L, Musial J, et al. Influence of chronic inflammation and autoimmunity on coronary

- calcifications and myocardial perfusion defects in systemic lupus erythematosus patients. *Inflamm Res*. 2011;60(10):973–80.
110. Chapter 10: Immunoglobulin A nephropathy. *Kidney Int Suppl*. 2012;2(2):209–17.
  111. Bertias GK, Tektonidou M, Amoura Z, Aringer M, Bajema I, Berden JHM, et al. Joint European League Against Rheumatism and European Renal Association-European Dialysis and Transplant Association (EULAR/ERA-EDTA) recommendations for the management of adult and paediatric lupus nephritis. *Ann Rheum Dis*. 2012;71(11):1771–82.
  112. Hahn BH, McMahon MA, Wilkinson A, Wallace WD, Daikh DI, Fitzgerald JD, et al. American College of Rheumatology guidelines for screening, treatment, and management of lupus nephritis. *Arthritis Care Res*. 2012;64(6):797–808.
  113. Austin HA, Klippel JH, Balow JE, le Riche NG, Steinberg AD, Plotz PH, et al. Therapy of lupus nephritis. Controlled trial of prednisone and cytotoxic drugs. *N Engl J Med*. 1986;314(10):614–9.
  114. Illei GG, Austin HA, Crane M, Collins L, Gourley MF, Yarboro CH, et al. Combination therapy with pulse cyclophosphamide plus pulse methylprednisolone improves long-term renal outcome without adding toxicity in patients with lupus nephritis. *Ann Intern Med*. 2001;135(4):248–57.
  115. Houssiau FA, Vasconcelos C, D’Cruz D, Sebastiani GD, De Ramon Garrido E, Danieli MG, et al. Early response to immunosuppressive therapy predicts good renal outcome in lupus nephritis: Lessons from long-term followup of patients in the euro-lupus nephritis trial. *Arthritis Rheum*. 2004;50(12):3934–40.
  116. Mak A, Cheak AAC, Tan JYS, Su HC, Ho RCM, Lau CS. Mycophenolate mofetil is as efficacious as, but safer than, cyclophosphamide in the treatment of proliferative lupus nephritis: A meta-analysis and meta-regression. *Rheumatology*. 2009;48(8):944–52.
  117. Touma Z, Gladman DD, Urowitz MB, Beyene J, Uleryk EM, Shah PS. Mycophenolate mofetil for induction treatment of lupus nephritis: a systematic review and metaanalysis. *J Rheumatol*. 2011;38(1):69–78.

118. Liu LL, Jiang Y, Wang LN, Yao L, Li ZL. Efficacy and safety of mycophenolate mofetil versus cyclophosphamide for induction therapy of lupus nephritis: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Drugs*. 2012;72(11):1521–33.
119. Isenberg D, Appel GB, Contreras G, Dooley MA, Ginzler EM, Jayne D, et al. Influence of race/ethnicity on response to lupus nephritis treatment: the ALMS study. *Rheumatology (Oxford)*. 2010;49(1):128–40.
120. Klumb EM, Silva CAA, Lanna CCD, Sato EI, Borba EF, Brenol JCT, et al. Consenso da Sociedade Brasileira de Reumatologia para o diagnóstico, manejo e tratamento da nefrite lúpica. *Rev Bras Reumatol*. 2015;55(1):1–21.
121. Nived O, Hallengren CS, Alm P, Jönsen A, Sturfelt G, Bengtsson AA. An observational study of outcome in SLE patients with biopsy-verified glomerulonephritis between 1986 and 2004 in a defined area of southern Sweden: the clinical utility of the ACR renal response criteria and predictors for renal outcome. *Scand J Rheumatol*. 2013;42(5):383–9.
122. Mok CC, Ying KY, Ng WL, Lee KW, To CH, Lau CS, et al. Long-term outcome of diffuse proliferative lupus glomerulonephritis treated with cyclophosphamide. *Am J Med*. 2006;119(4).
123. Liang MH, Schur PH, Fortin P, St.Clair EW, Balow JE, Costenbader K, et al. The American college of rheumatology response criteria for proliferative and membranous renal disease in systemic lupus erythematosus clinical trials. *Arthritis Rheum*. 2006;54(2):421–32.
124. Boumpas DT, Bertias GK, Balow JE. A decade of mycophenolate mofetil for lupus nephritis: is the glass half-empty or half-full? *Ann Rheum Dis*. 2010;69(12):2059–61.
125. Touma Z, Urowitz MB, Gladman DD. SLEDAI-2K for a 30-day window. *Lupus*. 2010;19(1):49–51.
126. Bae SC, Koh HK, Chang DK, Kim MH, Park JK, Kim SY. Reliability and validity of systemic lupus activity measure-revised (SLAM-R) for measuring clinical disease activity in systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2001;10(6):405–9.
127. Liang MH, Socher SA, Larson MG, Schur PH. Reliability and validity of six systems for the clinical assessment of disease activity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1989;32(9):1107–18.

128. Petri M, Kasitanon N, Singh S, Link K, Magder L, Bae SC, et al. Systemic lupus international collaborating clinics renal activity/response exercise: Comparison of agreement in rating renal response. *Arthritis Rheum.* 2008;58(6):1789–95.
129. Erratum. *Arthritis & Rheum.* 2008;58:2823.
130. Gladman, DD Urowitz, MB Goldsmith H. 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(5):809–13.
131. Appel GB, Silva FG, Pirani CL, Meltzer JI, Estes D. Renal involvement in systemic lupus erythematosus (SLE): a study of 56 patients emphasizing histologic classification. *Medicine (Baltimore).* 1978;57(5):371–410.
132. Oelzner P, Deliyiska B, Fünfstück R, Hein G, Herrmann D, Stein G. Anti-C1q antibodies and antiendothelial cell antibodies in systemic lupus erythematosus - relationship with disease activity and renal involvement. *Clin Rheumatol.* 2003;22(4-5):271–8.
133. Ceppellini R, Polli E, Celada F. A DNA-Reacting Factor in Serum of a Patient with Lupus Erythematosus Diffusus. *Proceeding Soc Exp Biol Med.* 1957;96(3):572–4.
134. Robbins WC, Holman HR, Deicher H, Kunkel HG. Complement Fixation with Cell Nuclei and DNA in Lupus Erythematosus. *Proceeding Soc Exp Biol Med.* 1957;96(3):575–9.
135. Attar SM, Koshak EA. Medical conditions associated with a positive anti-doublestranded deoxyribonucleic acid. *Saudi Med J.* 2010;31(7):781–7.
136. Lv S, Zhang J, Wu J, Zheng X, Chu Y, Xiong S. Origin and anti-tumor effects of anti-dsDNA autoantibodies in cancer patients and tumor-bearing mice. *Immunol Lett.* 2005;99(2):217–27.
137. Ruffatti A, Calligaro A, Del Ross T, Bertoli MT, Doria A, Rossi L, et al. Anti-double-stranded DNA antibodies in the healthy elderly: Prevalence and characteristics. *J Clin Immunol.* 1990;10(6):300–3.
138. Arbuckle MR, McClain MT, Rubertone M V., Scofield RH, Dennis GJ, James JA, et al. Development of Autoantibodies before the Clinical Onset of Systemic Lupus Erythematosus. *N Engl J Med.* 2003;349(16):1526–33.

139. Arbuckle MR, James JA, Kohlhase KF, Rubertone M V., Dennis GJ, Harley JB. Development of anti-dsDNA autoantibodies prior to clinical diagnosis of systemic lupus erythematosus. *Scand J Immunol.* 2001;54(1-2):211–9.
140. Ter Borg EJ, Horst G, Hummel EJ, Limburg PC, Kallenberg CGM. Measurement of increases in anti-double-stranded dna antibody levels as a predictor of disease exacerbation in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1990;33(5):634–43.
141. Van Vollenhoven RF, Petri MA, Cervera R, Roth DA, Ji BN, Kleoudis CS, et al. Belimumab in the treatment of systemic lupus erythematosus: high disease activity predictors of response. *Ann Rheum Dis.* 2012;71(8):1343–9.
142. Petri MA, Van Vollenhoven RF, Buyon J, Levy RA, Navarra S V., Cervera R, et al. Baseline predictors of systemic lupus erythematosus flares: Data from the combined placebo groups in the phase III belimumab trials. *Arthritis Rheum.* 2013;65(8):2143–53.
143. Steiman AJ, Urowitz MB, Ibañez D, Li TT, Gladman DD, Wither J. Anti-dsDNA and antichromatin antibody isotypes in serologically active clinically quiescent systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 2015;42(5):810–6.
144. Bastian HM, Roseman JM, Mcgwin G, Alarcón GS, Friedman AW, Fessler BJ, et al. Systemic lupus erythematosus in three ethnic groups. XII. Risk factors for lupus nephritis after diagnosis. *Lupus.* 2002;11(3):152–60.
145. Alba P, Bento L, Cuadrado MJ, Karim Y, Tungekar MF, Abbs I, et al. Anti-dsDNA, anti-Sm antibodies, and the lupus anticoagulant: significant factors associated with lupus nephritis. *Ann Rheum Dis.* 2003;62:556–60.
146. Font J, Cervera R, Ramos-Casals M, García-Carrasco M, Sentís J, Herrero C, et al. Clusters of Clinical and Immunologic Features in Systemic Lupus Erythematosus: Analysis of 600 Patients from a Single Center. *Semin Arthritis Rheum.* 2004;33(4):217–30.
147. Cortés-Hernández J, Ordi-Ros J, Labrador M, Buján S, Balada E, Segarra A, et al. Antihistone and anti-double-stranded deoxyribonucleic acid antibodies are associated with renal disease in systemic lupus erythematosus. *Am J Med.* 2004;116(3):165–73.



148. Olson SW, Lee JJ, Prince LK, Baker TP, Papadopoulos P, Edison J, et al. Elevated subclinical double-stranded DNA antibodies and future proliferative lupus nephritis. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2013;8(10):1702–8.
149. Rovin BH, Furie R, Latinis K, Looney RJ, Fervenza FC, Sanchez-Guerrero J, et al. Efficacy and safety of rituximab in patients with active proliferative lupus nephritis: the Lupus Nephritis Assessment with Rituximab study. *Arthritis Rheum*. 2012;64(4):1215–26.
150. Hebert LA, Cosio FG, Neff JC. Diagnostic significance of hypocomplementemia. *Kidney International*. 1991;39(5):811–21.
151. Koffler D, Paronetto F. Immunofluorescent localization of immunoglobulins, complement, and fibrinogen in human diseases. II. Acute, subacute, and chronic glomerulonephritis. *J Clin Invest*. 1965;44(10):1665–71.
152. Bryan AR, Wu EY. Complement deficiencies in systemic lupus erythematosus. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2014;14(7):448.
153. Botto M, Dell’Agnola C, Bygrave AE, Thompson EM, Cook HT, Petry F, et al. Homozygous C1q deficiency causes glomerulonephritis associated with multiple apoptotic bodies. *Nat Genet*. 1998;19(1):56–9.
154. Taylor PR, Carugati A, Fadok VA, Cook HT, Andrews M, Carroll MC, et al. A Hierarchical Role for Classical Pathway Complement Proteins in the Clearance of Apoptotic Cells in Vivo. *J Exp Med*. 2000;192(3):359–66.
155. Swaak AJG, Aarden LA, Staius Eps LWV, Feltkamp TEW. Anti-dsDNA and complement profiles as prognostic guides in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1979;22(3):226–35.
156. Swaak AJ, Groenwold J, Bronsveld W. Predictive value of complement profiles and anti-dsDNA in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*. 1986;45(5):359–66.
157. Son M, Diamond B, Santiago-Schwarz F. Fundamental role of C1q in autoimmunity and inflammation. *Immunol Res*. 2015;63(1-3):101–6.
158. Cameron JS. Lupus nephritis. *J Am Soc Nephrol*. 1999;10(2):413–24.

159. Balow JE. Clinical presentation and monitoring of lupus nephritis. *Lupus*. 2005;14(1):25–30.
160. Siedner MJ, Gelber AC, Rovin BH, McKinley AM, Christopher-Stine L, Astor B, et al. Diagnostic accuracy study of urine dipstick in relation to 24-hour measurement as a screening tool for proteinuria in lupus nephritis. *J Rheumatol*. 2008;35(1):84–90.
161. Antunes VVH, Veronese FJV, Morales JV. Diagnostic accuracy of the protein/creatinine ratio in urine samples to estimate 24-h proteinuria in patients with primary glomerulopathies: A longitudinal study. *Nephrol Dial Transplant*. 2008;23(7):2242–6.
162. Shidham G, Hebert LA. Timed urine collections are not needed to measure urine protein excretion in clinical practice. *Am J Kidney Dis*. 2006;47(1):8–14.
163. Birmingham DJ, Rovin BH, Shidham G, Nagaraja HN, Zou X, Bissell M, et al. Spot urine protein/creatinine ratios are unreliable estimates of 24 h proteinuria in most systemic lupus erythematosus nephritis flares. *Kidney Int*. 2007;72(7):865–70.
164. Hebert LA, Birmingham DJ, Shidham G, Rovin B, Nagaraja HN, Yu CY. Random spot urine protein/creatinine ratio is unreliable for estimating 24-hour proteinuria in individual systemic lupus erythematosus nephritis patients. *Nephron - Clin Pract*. 2009;113(3).
165. Leung Y., Szeto CC, Tam LS. Urine protein-to-creatinine ratio in an untimed urine collection is a reliable measure of proteinuria in lupus nephritis. *Rheumatology*. 2007;46:649–52.
166. Marques MG, Cotovio P, Ferrer F, Silva C, Botelho C, Lopes K, et al. Random spot urine protein/creatinine ratio: A reliable method for monitoring lupus nephritis? *Clin Kidney J*. 2013;6(6):590–4.
167. Matar HE, Peterson P, Sangle S, D’Cruz DP. Correlation of 24-hour urinary protein quantification with spot urine protein:creatinine ratio in lupus nephritis. *Lupus*. 2012;21(8):836–9.
168. Batlle-Gualda E, Martínez AC, Guerra RA, Pascual E. Urinary albumin excretion in patients with systemic lupus erythematosus without renal disease. *Ann Rheum Dis*. 1997;56(6):386–9.

169. Valente de Almeida R, Rocha de Carvalho JG, de Azevedo VF, Mulinari RA, Ioshhi SO, da Rosa Utiyama S, et al. Microalbuminuria and renal morphology in the evaluation of subclinical lupus nephritis. *Clin Nephrol.* 1999;52(4):218–29.
170. Mok CC. Biomarkers for lupus nephritis: A critical appraisal. *J Biomed Biotechnol.* 2010;2010: 638413.
171. Rovin BH. Urine Chemokines as Biomarkers of Human Systemic Lupus Erythematosus Activity. *J Am Soc Nephrol.* 2005;16(2):467–73.
172. Landolt-Marticorena C, Prokopec SD, Morrison S, Noamani B, Bonilla D, Reich H, et al. A discrete cluster of urinary biomarkers discriminates between active systemic lupus erythematosus patients with and without glomerulonephritis. *Arthritis Res Ther.* 2016;18(1).
173. Rovin BH, Song H, Hebert LA, Nadasdy T, Nadasdy G, Birmingham DJ, et al. Plasma, urine, and renal expression of adiponectin in human systemic lupus erythematosus. *Kidney Int.* 2005;68(4):1825–33.
174. Suzuki M, Wiers K, Brooks EB, Greis KD, Haines K, Klein-Gitelman MS, et al. Initial validation of a novel protein biomarker panel for active pediatric lupus nephritis. *Pediatr Res.* 2009;65(5):530–6.
175. Brunner HI, Bennett MR, Gulati G, Abulaban K, Klein-Gitelman MS, Ardoin SP, et al. Urine Biomarkers to Predict Response to Lupus Nephritis Therapy in Children and Young Adults. *J Rheumatol.* 2017;44(8):1239–48.
176. Varghese SA, Powell TB, Budisavljevic MN, Oates JC, Raymond JR, Almeida JS, et al. Urine biomarkers predict the cause of glomerular disease. *J Am Soc Nephrol.* 2007;18(3):913–22.
177. Das L, Suzuki M, Devarajan P, Rovin BH, Ying J, Brunner HI. Candidate urinary biomarkers may predict histological features on lupus nephritis biopsy. *Arthritis Rheum.* 2009;60(S750).
178. Kopetschke K, Klocke J, Griebßbach AS, Humrich JY, Biesen R, Dragun D, et al. The cellular signature of urinary immune cells in Lupus nephritis: New insights into potential biomarkers. *Arthritis Res Ther.* 2015;17(1):1–9.

179. Enghard P, Rieder C, Kopetschke K, Klocke JR, Undeutsch R, Biesen R, et al. Urinary CD4 T cells identify SLE patients with proliferative lupus nephritis and can be used to monitor treatment response. *Ann Rheum Dis*. 2014;73(1):277–83.
180. Enghard P, Humrich JY, Rudolph B, Rosenberger S, Biesen R, Kuhn A, et al. CXCR3+CD4+ T cells are enriched in inflamed kidneys and urine and provide a new biomarker for acute nephritis flares in systemic lupus erythematosus patients. *Arthritis Rheum*. 2009;60(1):199–206.
181. Hanaoka M, Gono T, Kawaguchi Y, Uchida K, Koseki Y, Katsumata Y, et al. Urinary free light chain is a potential biomarker for ISN/RPS class III/IV lupus nephritis. *Rheumatol (United Kingdom)*. 2013;52(12):2149–57.
182. Soliman S, Mohan C. Lupus nephritis biomarkers. *Clin Immunol*. 2017;185:10–20.
183. Zhang X, Jin M, Wu H, Nadasdy T, Nadasdy G, Harris N, et al. Biomarkers of lupus nephritis determined by serial urine proteomics. *Kidney Int*. 2008;74(6):799–807.
184. Tsai C-Y, Wu T-H, Yu C-L, Lu J-Y, Tsai Y-Y. Increased excretions of beta2-microglobulin, IL-6, and IL-8 and decreased excretion of Tamm-Horsfall glycoprotein in urine of patients with active lupus nephritis. *Nephron*. 2000;85(3):207–14.
185. El-Shereef RR, Lotfi A, Abdel-Naeam EA, Tawfik H. Serum and urinary interleukin-6 in assessment of renal activity in egyptian patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Med Insights Arthritis Musculoskelet Disord*. 2016;9:29–36.
186. Iwano M, Dohi K, Hirata E, Kurumatani N, Horii Y, Shiiki H, et al. Urinary levels of IL-6 in patients with active lupus nephritis. *Clin Nephrol*. 1993;40(1):16–21.
187. Wu H, Zeng J, Yin J, Peng Q, Zhao M, Lu Q. Organ-specific biomarkers in lupus. *Autoimmun Rev*. 2017;16(4):391–7.
188. Susianti H, Iriane VM, Dharmanata S, Handono K, Widijanti A, Gunawan A, et al. Analysis of urinary TGF- $\beta$ 1, MCP-1, NGAL, and IL-17 as biomarkers for lupus nephritis. *Pathophysiology*. 2015;22(1):65–71.
189. Szeto C-C. Urinary mRNA and lupus disease flare. *Nephrology*. 2017;22:27–30.

190. Narumi S, Takeuchi T, Kobayashi Y, Konishi K. Serum levels of ifn-inducible PROTEIN-10 relating to the activity of systemic lupus erythematosus. *Cytokine*. 2000;12:1561–5.
191. Klocke J, Kopetschke K, Griebbach AS, Langhans V, Humrich JY, Biesen R, et al. Mapping urinary chemokines in human lupus nephritis: Potentially redundant pathways recruit CD4+and CD8+T cells and macrophages. *Eur J Immunol*. 2017;47(1):180–92.
192. Jakiela B, Kosalka J, Plutecka H, Węgrzyn a. S, Bazan-Socha S, Sanak M, et al. Urinary cytokines and mRNA expression as biomarkers of disease activity in lupus nephritis. *Lupus*. 2018;27(8):1259–70.
193. Misra R, Gupta R. Biomarkers in lupus nephritis. *Int J Rheum Dis*. 2015;18(2):219–32.
194. Avihingsanon Y, Phumesin P, Benjachat T, Akkasilpa S, Kittikowit V, Praditpornsilpa K, et al. Measurement of urinary chemokine and growth factor messenger RNAs: a noninvasive monitoring in lupus nephritis. *Kidney Int*. 2006;69(4):747–53.
195. Wada T, Yokoyama H, Su SB, Mukaida N, Iwano M, Dohi K, et al. Monitoring urinary levels of monocyte chemoattractant and activating factor reflects disease activity of lupus nephritis. *Kidney Int*. 1996;49(3):761–7.
196. Lee YH, Song GG. Urinary MCP-1 as a biomarker for lupus nephritis: a meta-analysis. *Z Rheumatol*. 2017;76(4):357–63.
197. Noris M, Bernasconi S, Casiraghi F, Sozzani S, Gotti E, Remuzzi G, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 is excreted in excessive amounts in the urine of patients with lupus nephritis. *Lab Invest*. 1995;73(0023-6837 (Print)):804–9.
198. Elewa EA, El Tokhy MA, Fathy SE, Talaat AM. Predictive role of urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin in lupus nephritis. *Lupus*. 2015;24(2):138–46.
199. Kuwabara T, Mori K, Mukoyama M, Kasahara M, Yokoi H, Saito Y, et al. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin levels reflect damage to glomeruli, proximal tubules, and distal nephrons. *Kidney Int*. 2009;75:285–94.

200. Hammad A, Mosaad Y, Elhanbly S, Youssef H, Refaaey AE, Elhusseini F, et al. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a marker of severe lupus nephritis in children. *Lupus*. 2013;22(5):486–91.
201. Somparn P, Hirankarn N, Leelahavanichkul A, Khovidhunkit W, Thongboonkerd V, Avihingsanon Y. Urinary proteomics revealed prostaglandin H2D-isomerase, not Zn- $\alpha$ 2-glycoprotein, as a biomarker for active lupus nephritis. *J Proteomics*. 2012;75(11):3240–7.
202. Schwartz N, Su L, Burkly LC, Mackay M, Aranow C, Kollaros M, et al. Urinary TWEAK and the activity of lupus nephritis. *J Autoimmun*. 2006;27(4):242–50.
203. Reyes-Martínez F, Pérez-Navarro M, Rodríguez-Matías A, Soto-Abraham V, Gutierrez-Reyes G, Medina-Avila Z, et al. Evaluación de los niveles urinarios de TWEAK en pacientes mexicanos con nefritis lúpica sin tratamiento farmacológico: Estudio exploratorio. *Nefrología*. 2018;38(2):220–1.
204. Schwartz N, Rubinstein T, Burkly LC, Collins CE, Blanco I, Su L, et al. Urinary TWEAK as a biomarker of lupus nephritis: a multicenter cohort study. *Arthritis Res Ther*. 2009;11(5):R143.
205. Kiani AN, Wu T, Fang H, Zhou XJ, Ahn CW, Magder LS, et al. Urinary vascular cell adhesion molecule, but not neutrophil gelatinase-associated lipocalin, is associated with lupus nephritis. *J Rheumatol*. 2012;39(6):1231–7.
206. Soliman S, Mohamed FA, Ismail FM, Stanley S, Saxena R, Mohan C. Urine angiostatin and VCAM-1 surpass conventional metrics in predicting elevated renal pathology activity indices in lupus nephritis. *Int J Rheum Dis*. 2017;20(11):1714–27.
207. Mok CC, Soliman S, Ho LY, Mohamed FA, Mohamed FI, Mohan C. Urinary angiostatin, CXCL4 and VCAM-1 as biomarkers of lupus nephritis. *Arthritis Res Ther*. 2018;20(1).
208. Gasparin AA, Pamplona Bueno de Andrade N, Hax V, Tres GL, Veronese F V., Monticielo OA. Urinary biomarkers for lupus nephritis: the role of the vascular cell adhesion molecule-1. *Lupus*. 2019;28(3):265–72.
209. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(9):678–89.

210. Ibbotson GC, Doig C, Kaur J, Gill V, Ostrovsky L, Fairhead T, et al. Functional alpha4-integrin: a newly identified pathway of neutrophil recruitment in critically ill septic patients. *Nat Med.* 2001;7(4):465–70.
211. McHale JF, Harari O a, Marshall D, Haskard DO. TNF-alpha and IL-1 sequentially induce endothelial ICAM-1 and VCAM-1 expression in MRL/lpr lupus-prone mice. *J Immunol.* 1999;163(7):3993–4000.
212. Murdaca G, Colombo BM, Cagnati P, Gulli R, Spanò F, Puppo F. Endothelial dysfunction in rheumatic autoimmune diseases. *Atherosclerosis.* Elsevier Ltd; 2012;224(2):309–17.
213. Messadi D V, Pober JS, Fiers W, Gimbrone MA, Murphy GF. Induction of an activation antigen on postcapillary venular endothelium in human skin organ culture. *J Immunol.* 1987;139(5):1557–62.
214. Cronstein BN, Weissmann G. The adhesion molecules of inflammation. *Arthritis Rheum.* 1993;36(2):147–57.
215. Bevilacqua MP, Pober JS, Mendrick DL, Cotran RS, Gimbrone MA. Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84(24):9238–42.
216. Osborn L, Hession C, Tizard R, Vassallo C, Lühowskyj S, Chi-Rosso G, et al. Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes. *Cell.* 1989;59(6):1203–11.
217. Kumar AG, Dai XY, Kozak CA, Mims MP, Gotto AM, Ballantyne CM. Murine VCAM-1. Molecular cloning, mapping, and analysis of a truncated form. *J Immunol.* 1994;153(9):4088–98.
218. Barreiro O, Yáñez-Mó M, Sala-Valdés M, Gutiérrez-López MD, Ovalle S, Higginbottom A, et al. Endothelial tetraspanin microdomains regulate leukocyte firm adhesion during extravasation. *Blood.* 2005;105(7):2852–61.
219. Hemler ME. Tetraspanin functions and associated microdomains. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005;6(10):801–11.
220. Cook-Mills JM, Marchese ME, Abdala-Valencia H. Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Expression and Signaling During Disease: Regulation by Reactive Oxygen Species and Antioxidants. *Antioxid Redox Signal.* 2011;15(6):1607–38.

221. Wójciak-Stothard B, Williams L, Ridley AJ. Monocyte adhesion and spreading on human endothelial cells is dependent on Rho-regulated receptor clustering. *J Cell Biol.* 1999;145(6):1293–307.
222. Barreiro O, Yáñez-Mó M, Serrador JM, Montoya MC, Vicente-Manzanares M, Tejedor R, et al. Dynamic interaction of VCAM-1 and ICAM-1 with moesin and ezrin in a novel endothelial docking structure for adherent leukocytes. *J Cell Biol.* 2002;157(7):1233–45.
223. Alon R, Kassner PD, Carr MW, Finger EB, Hemler ME, Springer TA. The integrin VLA-4 supports tethering and rolling in flow on VCAM-1. *J Cell Biol.* 1995;128(6):1243–53.
224. Needham LA, Van DS, Pigott R, Edwards RM, Shepherd M, Hemingway I, et al. Activation dependent and independent VLA-4 binding sites on vascular cell adhesion molecule-1. 1994;2:87–99.
225. Pepinsky B, Hession C, Chen LL, Moy P, Burkly L, Jakubowski A, et al. Structure/function studies on vascular cell adhesion molecule-1. *J Biol Chem.* 1992;267(25):17820–6.
226. Osborn L, Vassallo C, Benjamin CD. Activated endothelium binds lymphocytes through a novel binding site in the alternately spliced domain of vascular cell adhesion molecule-1. *J Exp Med.* 1992;176(1):99–107.
227. Chan BMC, Elices MJ, Murphy E, Hemler ME. Adhesion to vascular cell adhesion molecule 1 and fibronectin. Comparison of  $\alpha 4\beta 1$  (VLA-4) and  $\alpha 4\beta 7$  on the human B cell line JY. *J Biol Chem.* 1992;267(12):8366–70.
228. Weber C, Alon R, Moser B, Springer TA. Sequential regulation of  $\alpha 4\beta 1$  and  $\alpha 5\beta 1$  integrin avidity by CC chemokines in monocytes: Implications for transendothelial chemotaxis. *J Cell Biol.* 1996;134(4):1063–73.
229. Boyce J a, Mellor E a, Perkins B, Lim Y-C, Luscinskas FW. Human mast cell progenitors use alpha4-integrin, VCAM-1, and PSGL-1 E-selectin for adhesive interactions with human vascular endothelium under flow conditions. *Blood.* 2002;99(8):2890–6.
230. Bochner BS, Luscinskas FW, Gimbrone M a, Newman W, Sterbinsky S a, Derse-Anthony CP, et al. Adhesion of human basophils, eosinophils, and neutrophils to



- interleukin 1-activated human vascular endothelial cells: contributions of endothelial cell adhesion molecules. *J Exp Med.* 1991;173(June):1553–7.
231. Kilger G, Needham LA, Nielsen PJ, Clements J, Vestweber D, Holzmann B. Differential regulation of alpha 4 integrin-dependent binding to domains 1 and 4 of vascular cell adhesion molecule-1. *J Biol Chem.* 1995;270(11):5979–84.
  232. Gerszten RE, Luscinskas FW, Ding HT, Dichek DA, Stoolman LM, Gimbrone Jr. MA, et al. Adhesion of memory lymphocytes to vascular cell adhesion molecule-1-transduced human vascular endothelial cells under simulated physiological flow conditions in vitro. *CircRes.* 1996;79(0009-7330 (Print)):1205–15.
  233. Yoshida N, Manabe H, Terasawa Y, Nishimura H, Enjo F, Nishino H, et al. Inhibitory effects of vitamin E on endothelial-dependent adhesive interactions with leukocytes induced by oxidized low density lipoprotein. 2000;13:279–88.
  234. Marui N, Offermann MK, Swerlick R, Kunsch C, Rosen CA, Ahmad M, et al. Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) gene transcription and expression are regulated through an antioxidant-sensitive mechanism in human vascular endothelial cells. *J Clin Invest.* 1993;92(4):1866–74.
  235. Naito Y, Shimosawa M, Kuroda M, Nakabe N, Manabe H, Katada K, et al. Tocotrienols reduce 25-hydroxycholesterol-induced monocyte-endothelial cell interaction by inhibiting the surface expression of adhesion molecules. *Atherosclerosis.* 2005;180(1):19–25.
  236. Piga R, Naito Y, Kokura S, Handa O, Yoshikawa T. Inhibitory effect of serotonin derivatives on high glucose-induced adhesion and migration of monocytes on human aortic endothelial cells. *Br J Nutr.* 2009;102(2):264–72.
  237. Reinhardt PH, Kubes P. Differential leukocyte recruitment from whole blood via endothelial adhesion molecules under shear conditions. *Blood.* 1998;92(12):4691–9.
  238. Luo S-F, Fang R-Y, Hsieh H-L, Chi P-L, Lin C-C, Hsiao L-D, et al. Involvement of MAPKs and NF-kappaB in tumor necrosis factor alpha-induced vascular cell adhesion molecule 1 expression in human rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum.* 2010;62(1):105–16.

239. Hortelano S, López-Fontal R, Través PG, Villa N, Grashoff C, Boscá L, et al. ILK mediates LPS-induced vascular adhesion receptor expression and subsequent leucocyte trans-endothelial migration. *Cardiovasc Res.* 2010;86(2):283–92.
240. Cybulsky MI, Gimbrone MA. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science.* 1991;251(4995):788–91.
241. Garton KJ, Gough PJ, Philalay J, Wille PT, Blobel CP, Whitehead RH, et al. Stimulated shedding of vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) is mediated by tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (ADAM 17). *J Biol Chem.* 2003;278(39):37459–64.
242. Matsuno O, Miyazaki E, Nureki S, Ueno T, Ando M, Ito K, et al. Elevated soluble ADAM8 in bronchoalveolar lavage fluid in patients with eosinophilic pneumonia. *Int Arch Allergy Immunol.* 2007;142(4):285–90.
243. Matsuno O, Miyazaki E, Nureki S, Ueno T, Kumamoto T, Higuchi Y. Role of ADAM8 in experimental asthma. *Immunol Lett.* 2006;102(1):67–73.
244. Guaiquil V, Swendeman S, Yoshida T, Chavala S, Campochiaro P a, Blobel CP. ADAM9 is involved in pathological retinal neovascularization. *Mol Cell Biol.* 2009;29(10):2694–703.
245. Peduto L. ADAM9 as a potential target molecule in cancer. *Curr Pharm Des.* 2009;15(20):2282–7.
246. Arora S, Gunther A, Wennerblom B, Ueland T, Andreassen AK, Gude E, et al. Systemic markers of inflammation are associated with cardiac allograft vasculopathy and an increased intimal inflammatory component. *Am J Transplant.* 2010;10(6):1428–36.
247. Verdejo H, Roldan J, Garcia L, Del Campo A, Becerra E, Chiong M, et al. Systemic vascular cell adhesion molecule-1 predicts the occurrence of post-operative atrial fibrillation. *Int J Cardiol.* 2011;150(3):270–6.
248. Yamada Y, Arao T, Matsumoto K, Gupta V, Tan W, Fedynyshyn J, et al. Plasma concentrations of VCAM-1 and PAI-1: A predictive biomarker for post-operative recurrence in colorectal cancer. *Cancer Sci.* 2010;101(8):1886–90.
249. Campbell DJ, Woodward M, Chalmers JP, Colman SA, Jenkins AJ, Kemp BE, et al. Soluble vascular cell adhesion molecule 1 and N-terminal pro-B-type natriuretic

- peptide in predicting ischemic stroke in patients with cerebrovascular disease. *Arch Neurol.* 2006;63(1):60–5.
250. Cheung ATW, Tomic MM, Chen PCY, Miguelino E, Li CS, Devaraj S. Correlation of microvascular abnormalities and endothelial dysfunction in Type-1 diabetes mellitus (T1DM): A real-time intravital microscopy study. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2009;42(4):285–95.
  251. Oymar K, Bjercknes R. Differential patterns of circulating adhesion molecules in children with bronchial asthma and acute bronchiolitis. *PediatrAllergy Immunol.* 1998;9(0905-6157 (Print)):73–9.
  252. Peter K, Weirich U, Nordt TK, Ruef J, Bode C. Soluble vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) as potential marker of atherosclerosis. *Thromb Haemost.* 1999;82(SUPPL. 1):38–43.
  253. Kitani a, Nakashima N, Izumihara T, Inagaki M, Baoui X, Yu S, et al. Soluble VCAM-1 induces chemotaxis of Jurkat and synovial fluid T cells bearing high affinity very late antigen-4. *J Immunol.* 1998;161(9):4931–8.
  254. Tokuhira M, Hosaka S, Volin M V, Haines GK, Katschke KJ, Kim S, et al. Soluble vascular cell adhesion molecule 1 mediation of monocyte chemotaxis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2000;43(5):1122–33.
  255. Dunlop LC, Skinner MP, Bendall LJ, Favaloro EJ, Castaldi PA, Gorman JJ, et al. Characterization of GMP-140 (P-selectin) as a circulating plasma protein. *J Exp Med.* 1992;175(4):1147–50.
  256. Janssen BA, Luqmani RA, Gordon C, Hemingway IH, Bacon PA, Gearing AJ, et al. Correlation of blood levels of soluble vascular cell adhesion molecule-1 with disease activity in systemic lupus erythematosus and vasculitis. *Br J Rheumatol.* 1994;33(12):1112–6.
  257. Freedman AS, Munro JM, Rice GE, Bevilacqua MP, Morimoto C, McIntyre BW, et al. Adhesion of human B cells to germinal centers in vitro involves VLA-4 and INCAM-110. *Science (80- ).* 1990;249(4972):1030–3.
  258. Miyake K, Weissman IL, Greenberger JS, Kincade PW. Evidence for a role of the integrin VLA-4 in lympho-hemopoiesis. *J Exp Med.* 1991;173(3):599–607.

259. Koch AE, Burrows JC, Haines GK, Carlos TM, Harlan JM, Leibovich SJ. Immunolocalization of endothelial and leukocyte adhesion molecules in human rheumatoid and osteoarthritic synovial tissues. *Lab Invest.* 1991;64(3):313–20.
260. Rice GE, Munro JM, Corless C, Bevilacqua MP. Vascular and nonvascular expression of INCAM-110. A target for mononuclear leukocyte adhesion in normal and inflamed human tissues. *Am J Pathol.* 1991;138(2):385–93.
261. Belmont HM, Buyon J, Giorno R, Abramson S. Up-regulation of endothelial cell adhesion molecules characterizes disease activity in systemic lupus erythematosus. The Shwartzman phenomenon revisited. *Arthritis Rheum.* 1994;37(3):376–83.
262. Pallis M, Robson DK, Haskard DO, Powell RJ. Distribution of cell adhesion molecules in skeletal muscle from patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis.* 1993;52(9):667–71.
263. Brady H. Leukocyte adhesion molecules and kidney diseases. *Kidney Int.* 1994;45:1285–300.
264. Hillis G, Duthie L, Brown P, Simpson J, Macleod A, Haites N. Upregulation and co-localization of connexin 43 and cellular adhesion molecules in inflammatory renal disease. *J Pathol.* 1997;182:373–9.
265. Muller G, Markovic-Lipkovski J, Muller C. Intercellular adhesion molecule-a expression in human kidneys with glomerulonephritis. *Clin Nephrol.* 1991;36:203–8.
266. Seron D, Cameron J, Haskard D. Expression of VCAM-1 in the normal and diseased kidney. *Nephrol Dial Transpl.* 1991;6:917–22.
267. Faas MM, Bakker WW, Valkhof N, van der Horst MC, Schuiling GA. Reproductive condition and the low-dose endotoxin-induced inflammatory response in rats. Glomerular influx of inflammatory cells and expression of adhesion molecules. *Biol Reprod.* 1997;56(6):1400–6.
268. Lai KN, Leung JC, Lai KB, Wong KC, Lai CK. Upregulation of adhesion molecule expression on endothelial cells by anti-DNA autoantibodies in systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol Immunopathol.* 1996;81(3):229–38.
269. Haskard DO, Cavender D, Maliakkal D, Ziff M. T-cell adhesion to endothelial cells in systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int.* 1989;9(1):33–7.

270. Cheng Q, Hoi A, Hickey MJ, Morand EF. Lymphocytes from systemic lupus erythematosus patients display increased spreading on VCAM-1, an effect associated with active renal involvement. *Lupus*. 2012;21(6):632–41.
271. Wuthrich RP. Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) expression in murine lupus nephritis. *Kidney Int*. 1992;42(4):903–14.
272. Xie C, Zhou XJ, Liu X, Mohan C. Enhanced susceptibility to end-organ disease in the lupus-facilitating NZW mouse strain. *Arthritis Rheum*. 2003;48(4):1080–92.
273. Xie C, Sharma R, Wang H, Zhou XJ, Mohan C. Strain distribution pattern of susceptibility to immune-mediated nephritis. *J Immunol*. 2004;172(15):5047–55.
274. Wu T, Xie C, Bhaskarabhatla M, Yan M, Leone A, Chen SS, et al. Excreted urinary mediators in an animal model of experimental immune nephritis with potential pathogenic significance. *Arthritis Rheum*. 2007;56(3):949–59.
275. Spronk PE, Bootsma H, Huitema MG, Limburg PC, Kallenberg CG. Levels of soluble VCAM-1, soluble ICAM-1, and soluble E-selectin during disease exacerbations in patients with systemic lupus erythematosus (SLE); a long term prospective study. *Clin Exp Immunol*. 1994;97(3):439–44.
276. Ilić T, Mitić I, Durdević-Mirković T, Vucković B, Milić B, Popović M. Correlation between sera levels of sICAM-1 and sVCAM-1 and severity of kidney lesions in patients with lupus nephritis. *Med Pregl*. 2007;60 Suppl 2:128–32.
277. Pizarro S, Monárrez Espino J, Ruiz A, Jara LJ, Nava A, Riebeling-Navarro C. Soluble vascular cell adhesion molecule-1 indicates SLE disease activity and specific organ involvement. *Rev Alerg Mex*. 2007;54(6):189–95.
278. Skeoch, S.; Haque, S.; Pemberton, P.; Bruce IN. Cell adhesion molecules as potential biomarkers of nephritis, damage and accelerated atherosclerosis in patients with SLE. *Lupus*. 2014;23:819–24.
279. Ikeda Y, Fujimoto T, Ameno M, Shiiki H, Dohi K. Relationship between lupus nephritis activity and the serum level of soluble VCAM-1. *Lupus*. 1998;7(5):347–54.
280. Lewis, M. J.; Vyse, S.; Shields, A. M.; Zou, L.; Khamashta, M.; Gordon, P. A.; Pitzalis, C.; Vyse, T. J.; D’Cruz DP. Improved monitoring of clinical response in Systemic Lupus Erythematosus by longitudinal trend in soluble vascular cell

- adhesion molecule-1. *Arthritis Res Ther. Arthritis Research & Therapy*; 2016;18(5):1–11.
281. Kaplanski G, Cacoub P, Farnarier C, Marin V, Gregoire R, Gatel A, et al. Increased soluble vascular cell adhesion molecule 1 concentrations in patients with primary or systemic lupus erythematosus-related antiphospholipid syndrome: correlations with the severity of thrombosis. *Arthritis Rheum.* 2000;43(1):55–64.
  282. Zaccagni H, Fried J, Cornell J, Padilla P, Brey RL. Soluble adhesion molecule levels, neuropsychiatric lupus and lupus-related damage. *Front Biosci.* 2004;9:1654–9.
  283. Wais T, Fierz W, Stoll T, Villiger PM. Subclinical disease activity in systemic lupus erythematosus: Immunoinflammatory markers do not normalize in clinical remission. *J Rheumatol.* 2003;30(10):2133–9.
  284. Kanagawa K, Seki T, Nishigaki F. Measurement of soluble ICAM-1 after renal transplantation. *Transplant Proc.* 1994;26:2103–5.
  285. Bechtel U, Scheuer R, Landgraf R, Koning A, Feucht H. Assessment of soluble adhesion molecules (sICAM-1, sVCAM-1, sELAM-1) and complement cleavage products (sC4d, sC5b-9) in urine. Clinical monitoring of renal allograft recipients. *Transplantation.* 1994;58:905–11.
  286. Lhotta K, Neumayer HP, Joannidis M, Geissler D, Konig P. Renal expression of intercellular adhesion molecule-1 in different forms of glomerulonephritis. *Clin Sci.* 1991;81(4):477–81.
  287. Wuthrich RP. Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) expression in murine lupus nephritis. *Kidney Int.* 1992;42(4):903–14.
  288. Chen X, Xu Q, Tang L. Expression of intercellular adhesion molecule-1 and vascular adhesion molecule-1 in kidney of patients with lupus nephritis and membranoproliferative glomerulonephritis. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi.* 1995;24(3):149–51.
  289. Tesář V, Mašek Z, Rychlik I, Merta M, Bartůňková J, Stejskalová A, et al. Cytokines and adhesion molecules in renal vasculitis and lupus nephritis. *Nephrol Dial Transplant.* 1998;13(7):1662–7.

290. Wither J, Prokopec S, Noamani B, Bonilla D, Touma Z, Avila-Casado C, et al. FRI0307 Changes in Urinary Biomarker Levels Can Predict Treatment Responses in Lupus Nephritis. *Ann Rheum Dis*. 2016;75(Suppl 2):546.2–546.
291. Walport M, Davies K, Botto M. C1q and systemic lupus erythematosus. *Immunobiology*. 1998;199(2):265–85.
292. Berden J. Lupus nephritis. *Kidney Int*. 1997;52(2):538–58.
293. Ortega LM, Schultz DR, Lenz O, Pardo V, Contreras GN. Review: Lupus nephritis: pathologic features, epidemiology and a guide to therapeutic decisions. *Lupus*. 2010;19(5):557–74.
294. Christopher-Stine L, Siedner M, Lin J, Haas M, Parekh H, Petri M, et al. Renal biopsy in lupus patients with low levels of proteinuria. *J Rheumatol*. 2007;34(2):332–5.
295. Petri M, Kasitanon N, Singh S, Link K, Magder L, Bae SC, et al. Systemic lupus international collaborating clinics renal activity/response exercise: Comparison of agreement in rating renal response. *Arthritis Rheum*. 2008;58(6):1789–95.
296. Touma Z. SLEDAI-2K for a 30-day window. 2010;49–50.
297. Weening JJ, D'Agati VD, Schwartz MM, Seshan S V., Alpers CE, Appel GB, et al. The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited. *Kidney Int*. 2004;65(2):521–30.
298. Churg J, Sobin L. Renal disease: classification and atlas of glomerular disease. Renal disease. New York/Tokyo; 1982.
299. Flores-Mendoza G, Sansón SP, Rodríguez-Castro S, Crispín JC, Rosetti F. Mechanisms of Tissue Injury in Lupus Nephritis. *Trends Mol Med*. 2018;24(4):364–78.

## 7 ARTIGOS EM INGLÊS


### 7.1 Artigo de revisão

Lupus (2019) 28, 265–272

[journals.sagepub.com/home/lup](http://journals.sagepub.com/home/lup)

### REVIEW

## Urinary biomarkers for lupus nephritis: the role of the vascular cell adhesion molecule-1

AA Gasparin , N Pamplona Bueno de Andrade, V Hax, G Levi Tres, FV Veronese and OA Monticielo  
Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

### Abstract

Renal involvement is one of the main complications of systemic lupus erythematosus, causing a significant impact on patients' morbidity and mortality. Renal biopsy is still the gold standard of diagnosis, but it has many limitations. In this sense, several recent studies aim to identify biomarkers that not only predict disease activity and renal histology, but also lead to earlier treatment. In previous studies, the soluble vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) measured in urine showed a strong association with the presence of lupus nephritis (LN), with clinical and histological activity indexes of the disease and with more severe renal lesions. This paper reviews the main urinary biomarkers of LN that have been studied, with special emphasis on VCAM-1 results.

**Keywords:** lupus nephritis, urinary biomarkers, VCAM-1.



## **Introduction**

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a chronic autoimmune disease, heterogeneous, of unknown etiology characterized by the production of autoantibodies and the involvement of multiple organ systems. Renal involvement occurs in up to 60% of patients (1) and is a major predictor of morbidity and mortality (2). Early diagnosis is extremely important since the delay in initiating the treatment is associated with a higher risk of renal failure and chronic end-stage renal disease.

There are different histological subtypes of lupus nephritis (LN) and the appropriate treatment varies according to the histological class, differing in the proliferative lesions and the membranous form, for example. Although clinical presentation, qualitative urine test and urinary sediment assessment, and renal function estimation may suggest a specific subtype, the renal biopsy is still the gold standard to confirm the diagnosis and the LN correct classification. Besides being an invasive procedure with a risk of complications, the renal biopsy is only available in more complex care centers, which limits its use. In addition, a limited number of glomeruli is generally obtained, raising the matter of how representative the biopsy really is in relation to LN activity and chronicity. Currently, anti-double-stranded DNA (anti-dsDNA), proteinuria and serum complements are the non-invasive biomarkers routinely used to monitor renal activity in patients with LN (3). However, they do not fully reflect renal damage and its extent, nor do they have accurate prognostic value.

Therefore, finding non-invasive alternatives capable of identifying or predicting periods of the disease activity, assessing prognosis, determining the most appropriate treatment, and monitoring the therapeutic response has been the goal of many current studies.

## **Urinary biomarkers for lupus nephritis**

Several urinary biomarkers have already been described and investigated in patients with LN. In many cases, they are not specific to SLE, reflecting a series of cellular processes at the glomerular or tubular level, and their levels may be elevated as a result of inflammatory, fibrotic or renal ischemic processes. Within the group of urinary biomarkers, there are studies related to cytokines, chemokines, adipokines, several proteins, and, more recently, urine sediment gene expression biomarkers, among others. Table 1 shows the summary of the main urinary biomarkers already identified and their potential uses in LN. Table 2 shows the results of the ROC analysis for diagnosis of active lupus nephritis of some new and traditional biomarkers. These tables are not intended to exhaust the subject, so that there are other markers/methods besides the detection of urinary proteins, which may not have been contemplated in this review.

**Table 1.** Principal identified urinary biomarkers and their potential uses in lupus nephritis

<b>Biomarker</b>	<b>Correlation with disease activity</b>	<b>Correlation with histological renal damage</b>	<b>Predict disease activity</b>	<b>Monitor response to the treatment</b>	<b>Predict histology</b>
Adiponectin	+ (4,5)	NS	+ (5)	+ (4)	+ (4)
AGP	+ (6)	+ (6)	+ (6)	+ (7)	+ (8,9)
CD4 T cell	+ (10–12)	NS	NS	+ (11)	+ (11)
Ceruloplasmin	+ (6)	- (6)	- (6)	+ (7)	+ (9)
CXCL-16	+ (13)	NS	NS	NS	NS
FLC	- (14) + (15)	+ (14)	NS	+ (14)	+ (14)
Hepcidin 20	NS	NS	+ (16)	- (16)	NS
Hepcidin 25	NS	+ (15)	- (16)	+ (16)	NS
IL-6	+ (17,18)	+ (18)	NS	+ (17)	+ (18,19)
IL-17	+ (20)	+ (21)	+ (22)	NS	+ (15)
IP-10	+ (23–25)	+ (26)	NS	+ (27)	+ (4,27)
L-PGDS	+ (6)	+ (6)	+ (6)	+ (7)	+ (9)

MCP-1	+ (25,28,29)	+ (29,30)	+ (29,30)	+ (29,31)	+ (30)
NGAL	+ (32)	+ (33)	+ (32)	+ (33)	+ (34)
PGDS	+ (35)	+ (26)	+ (26)	+ (26)	- (26)
TGF- $\beta$ 1	- (21) + (20)	+ (15)	+ (15)	+ (15)	+ (15)
Transferrin	+ (6)	+ (6)	+ (6)	+ (7)	+ (8,9)
TWEAK	+ (36)	+ (37)	+ (38)	+ (38)	- (38)
Type-1 T-cell-related gene markers	+ (24,25)	NS	NS	NS	NS
VCAM-1	+ (13)	+ (39-41)	NS	NS	+ (40-42)

AGP: alfa-1 acid glycoprotein; CD: cluster of differentiation ; CXCL: chemokine ligand CXC motif; FLC: urinary free light chain; IL-6: interleukin 6; IL-17: interleukin 17; IP-10: interferon inducible protein 10 also known as Chemokine CXCL10; L-PGDS: prostaglandin D synthase type lipocalin; MCP-1: monocyte chemotactic protein-1 also known as CCL-2: chemokine (C-C motif) ligand 2; NGAL: neutrophil gelatinase-associated lipocalin; PGDS: prostaglandin H(2)D-isomerase; TGF- $\beta$ 1: transforming growth factor beta 1; TWEAK: apoptosis inducer similar to tumor necrosis factor; VCAM-1: vascular cell adhesion molecule 1

(+) denotes a positive and statistically significant relationship found in the referenced articles; (-) denotes an absence of statistical significance; NS: not studied - absence of studies with this particular biomarker based upon a MEDLINE search at the time of this review.

**Table 2.** Results of the ROC analysis for diagnosis of active lupus nephritis

Biomarker	Number of subjects					AUC	Sensitivity	Specificity	Reference
	ALN	ANLN	RNL	NNL	Controls				
Adiponectin	33	16	30	-	24	0.88	0.77	0.92	(4)
AGP	26	-	36	36	30	0.76	NA	NA	(6)
Anti-dsDNA	33	16	30	-	24	0.48	0.30	0.80	(4)
C3	33	16	30	-	24	0.57	0.57	0.72	(4)
C4	26	-	36	36	30	0.60	0.48	0.71	(6)
Ceruloplasmin	26	-	36	36	30	0.68	NA	NA	(6)

Creatinine	33	16	30	-	24	0.76	0.58	0.96	(4)
CXCL-16	16	-	41	37		0.90	0.88	0.84	(24)
IL-6	17	-	16	-	18	0.77	0.58	93.8	(25)
IL-17	50	-	-	-	20	0.71	0.66	0.72	(21)
IP-10	17	-	16	-	18	0.93	0.88	0.81	(25)
L-PGDS	26	36	-	36	30	0.71	NA	NA	(6)
MCP-1	33	16	30	-	24	0.81	0.75	0.84	(4)
NGAL	33	16	30	-	24	0.69	0.85	0.48	(4)
PGDS	30	-	26	-	8	0.79	0.78	0.73	(35)
Proteinuria	17	-	16	-	18	0.99	0.88	1.00	(25)
TGF- $\beta$ 1	50	-	-	-	20	0.66	0.64	0.68	(21)
Transferrin	26	-	36	36	30	0.80	NA	NA	(6)
TWEAK	33	16	30	-	24	0.73	0.47	0.96	(4)
TBX21*	17	-	16	-	18	0.91	0.84	0.93	(25)
CD3G*	17	-	16	-	18	0.84	1.00	0.68	(25)
CD4*	17	-	16	-	18	0.84	0.64	0.93	(25)
VCAM-1	33	16	30	-	24	0.81	0.83	0.76	(4)

AGP: alfa-1 acid glycoprotein; ALN: active LN; ANLN: active SLE patients without LN; CD: cluster of differentiation; CXCL: chemokine ligand CXC motif; IL-6: interleukin 6; IL-17: interleukin 17; IP-10: interferon inducible protein 10 also known as Chemokine CXCL10; LN: lupus nephritis; L-PGDS: prostaglandin D synthase type lipocalin; MCP-1: monocyte chemotactic protein-1 also known as CCL-2: chemokine (C-C motif) ligand 2; NA: not available; NGAL: neutrophil gelatinase-associated lipocalin; NNL: never had LN; PGDS: prostaglandin H(2)D-isomerase; RNL: remission NL; TBX21: T-box transcription factor; TGF- $\beta$ 1: transforming growth factor beta 1; TWEAK: apoptosis inducer similar to tumor necrosis factor; VCAM-1: vascular cell adhesion molecule 1.

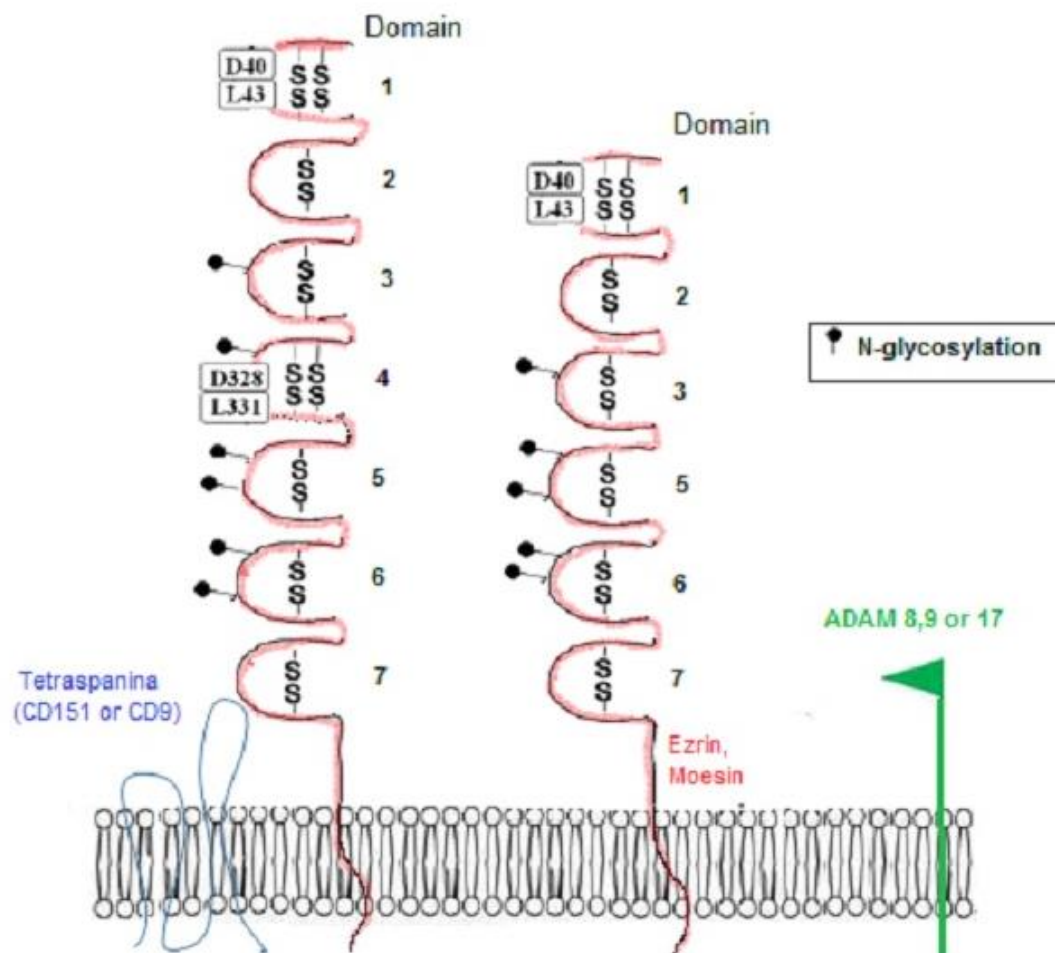
\* Type-1 T-cell-related gene markers.

### **The vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)**

The vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) is an adhesion receptor of the endothelial cell member of the immunoglobulin (Ig) superfamily, composed of several immunoglobulin-like extracellular domains, a transmembrane region and a cytoplasmic domain of 19 amino acids carboxy-terminus. In activated endothelial cells, VCAM-1 is located on a lipid-raft-like platform with tetraspanins CD9 and CD151, in the so-called tetraspanin enriched microdomains, which seem to allow the expression and function of VCAM-1 on the endothelial surface (43). The intracellular terminal region of VCAM-1 is connected to the actin cytoskeleton via Ezrin and Moesin.

There are two binding variants in the human VCAM-1, resulting in a receptor with seven (7d) immunoglobulin-like protein extracellular domains or six (6d) in which the domain “4” is lacking. Both human variants of VCAM-1 bind to  $\alpha 4\beta 1$  integrin (VLA-4) in domains 1 and 4, but may also bind to other integrins, such as  $\alpha 4\beta 7$  and  $\alpha d\beta 2$  (44). These integrins are expressed by eosinophils, basophils, lymphocytes, mast cells and monocytes (figure 1).

Figure 1. Human VCAM-1 variants



The human VCAM-1 has two variants, one containing 6 immunoglobulin-like domains in which domain 4 is lacking, and another containing 7 domains. The domains 1 and 4 contain the integrin binding sites. Galectin 3 binds to the VCAM-1 N-glycosylation sites. VCAM-1 also coimmunoprecipitates with ezrin and moesin. The VCAM-1 expression on the cell surface requires association with the CD151 or CD9 tetraspanins. VCAM-1 can be cleaved from the cell surface and released in a soluble form by the action of ADAM 8, 9 or 17. VCAM-1: vascular cell adhesion molecule-1; ADAM: disintegrin and metalloproteinase.

The binding to VCAM-1 is regulated by the activation state of the integrins: those with low affinity promote the rolling, while those with high affinity mediate the firm cellular adhesion to the endothelium, resistant even to the blood stream. The integrin binding to the domain 1 or 4 of VCAM-1 is also modulated by the  $\alpha 4\beta 1$  integrin activation degree. In addition to the integrins, VCAM-1 binds to galectin-3 on eosinophil (44,45).

The VCAM-1 works in conjunction with other adhesion molecules with the purpose of regulating immune surveillance and inflammation. Its expression is induced by cytokines produced in tissues, elevated rates of ROS, oxidized LDL, 25-hydroxycholesterol, shear stress, high glucose level, and stimulation of TLR endothelial cell by microbial agents. The activation of the VCAM-1 gene expression is regulated by NF $\kappa$ B (nuclear factor transcription B), SP-1, AP-1 and interferon regulatory factor-1.

The VCAM-1 can also be released from the endothelial surface through cleavage by a disintegrin and metalloproteinase 17 (ADAM 17) and, as some studies show, by ADAM 8 or ADAM 9 as well. For this reason, VCAM-1 appears in a soluble form in the plasma and urine and is used as a disease predictor biomarker (46). The plasma soluble VCAM-1 levels increase with endothelial activation in multiple diseases. It is believed that the soluble VCAM-1, through its binding to circulating leukocytes, limits the binding of the leukocyte integrin to the endothelial VCAM-1. The adhesion molecules preserve their functions in their soluble forms. As the quantitative measure of adhesion molecules bound to the membranes is difficult, the measurement of soluble adhesion molecules can be performed by the ELISA technique (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), a useful substitute marker for its expression (47).

In addition to endothelial cells, VCAM-1 is also expressed in lymphoid dendritic cells, in bone marrow stromal cells, in macrophages located in the spleen and thymus, in synovium, focally in the renal tubular epithelium and in the hepatic Kupffer cells under noninflammatory conditions. Due to its wide distribution in organs and tissues, the

VCAM-1 takes part in several pathophysiological processes, such as autoimmune diseases, cardiovascular diseases, infections and cancer.

### **VCAM-1 and Systemic Lupus Erythematosus**

In SLE, the deposition of immunocomplexes leads to the complement cascade activation, resulting in endothelial activation with the consequent chemoattraction of immunocompetent cells. These events induce the overexpression of adhesion molecules fostering the transmigration of inflammatory cells through the endothelial wall possibly leading to organic damage.

In patients with SLE, there is a change in the expression of specific cell adhesion molecules in certain tissues. The expression of E-selectin, VCAM-1 and intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) is increased in skin and in skeletal muscle biopsies of SLE patients when compared to controls, with more noticeable elevation during periods of disease exacerbation. VCAM-1 and the ICAM-1 are poorly expressed in tubular epithelial and glomerular endothelial cells in normal kidneys, but their expression increases in the presence of proliferative lupus nephritis, correlating themselves with the disease activity (48).

The estrogen may be a factor involved in the augmented expression of cell adhesion molecules. The presence of anti-dsDNA antibodies can also increase the expression of the cell adhesion molecules. However, studies, which tried to demonstrate that lymphocytes from patients with active SLE are more adherent to endothelial cells, have shown conflicting results. While no fundamental change in the rolling process and adherence was observed in SLE patients, post-adhesion leukocyte spreading, a critical step in progression to transmigration, appears to be increased in these patients and is associated with active nephritis.



It has been verified that VCAM-1 increases in the glomeruli mesangium and endothelium of murine lupus nephritis models. VCAM-1 is also elevated in the urine of mice with immune nephritis induced experimentally, showing good correlation with the disease activity (13), and the strains that developed more severe renal disease also had higher soluble VCAM-1 urinary levels.

Studies in humans also correlated the SLE activity with the elevation of the serum VCAM-1. Some studies have shown that the serum VCAM-1 increases in parallel with the disease activity during SLE exacerbation (49). Other studies found a positive correlation between serum levels of VCAM-1 and ICAM-1 and anti-dsDNA antibody concentration (50), disease activity index (SLEDAI) (51), and negative correlation with serum concentrations of complement C3 and C4 in patients with SLE (50). Besides, VCAM-1 serum levels were higher in patients with lupus nephritis than in patients with SLE, but without nephritis (50). The VCAM-1 levels, but not ICAM-1 or E-selectin, also correlate with disease severity in renal biopsies of patients with lupus nephritis (52). The patients with nephritis class III and IV have significantly higher levels of VCAM-1 when compared to patients with nephritis class II (50).

Lewis and colleagues, in a recent prospective study, found that absolute VCAM-1 serum levels were less useful as a diagnostic tool to identify patients with active disease in relation to conventional markers (anti-dsDNA and C3); however, the VCAM-1 variation compared to baseline level ( $\Delta$ VCAM-1) was an upper marker of clinical response, assessed by the ECLAM score reduction (53). Besides, the VCAM-1 serum levels correlated significantly with the number of CD95 + CD27 + activated memory B cells, of CD95 + plasmoblasts and of circulating plasma cells in SLE patients, suggesting an important VCAM-1 role in the B-lymphocytes survival and maturation in bone marrow and secondary lymphoid tissues (53).

The VCAM-1 serum levels increases in patients with primary anti-phospholipid antibody syndrome or associated with SLE, correlating with severe thrombotic events. In a study of 133 patients with SLE and 40 controls, VCAM-1 correlated with neuropsychiatric SLE and with deep venous thrombosis (54). Several groups agree that serum soluble cell adhesion molecules may remain persistently elevated in patients with SLE who are in clinical remission (55).

Previous studies have demonstrated that urinary soluble adhesion molecules are reliable markers of renal allografts rejection (56), suggesting that the urinary level is a reflection of renal endothelial activation. However, to date, we do not have prospective data to assess the performance of urinary VCAM-1 in predicting disease activity as well as monitoring response to treatment. A prospective study evaluating urinary levels of VCAM-1 in patients with active lupus nephritis and in remission over time may determine its clinical utility in addition and in comparison to conventional markers of disease activity. Table 3 summarizes the main published articles relating urinary soluble VCAM-1 and lupus nephritis.

**Table 3.** Summary of main published articles relating urinary soluble VCAM-1 and lupus nephritis

Study (ref)	Patients	Objetives	Results
Molad et al, 2002 (39)	Case-control: 24 SLE and 7 controls	To determine urinary levels of VCAM-1 and ICAM-1 in patients with SLE and to verify its relation with clinical and laboratory characteristics, degree of activity and damage (SLICC/ACR)	High urinary levels of VCAM-1 in SLE patients compared to the healthy controls, correlating significantly with C3 reduction, disease activity (SLEDAI) and damage (SLICC/ACR) as well as with creatinine clearance decrease. Absence of correlation with nephritis
Wu et al, 2007 (13)	Case-control: 38 SLE with or without active nephritis, 6 RA and 15 controls	To assess serum and urinary levels of VCAM-1, P-selectin, TNFR-1 and CXCL16 and correlate them with SLE and active nephritis	Positive correlation of urinary VCAM-1 with urine Pr/Cr and SLEDAI. Significantly higher levels of urinary VCAM-1 in patients with SLE and LN compared to SLE without LN with similar SLEDAI
Abd-Elkareem et al, 2010	Case-control: 30 LN, 20 SLE without nephritis and 20	To assess whether changes in urinary VCAM-1 and ICAM-1 levels reflect tissue damage in LN	Significantly higher urinary VCAM-1 and ICAM-1 levels in the SLE group with nephritis and advanced histological changes (classes III, IV and V) compared to the group without

(42)	healthy controls		severe histological changes (class I and II). The first group also presented a negative correlation with serum complement levels
Howe et al, 2012 (57)	Case-control: 121 SLE (33 active LN and 88 without active LN) e 19 healthy controls	To assess the relation between urinary levels of VCAM-1 and ICAM-1 in patients with SLE with and without nephritis and to explore its correlation with renal disease activity	Higher levels of urinary VCAM-1 and ICAM-1 in SLE compared to controls. Significantly higher levels of VCAM-1 in patients with SLE and active LN, with correlation with rSLAM-R
Singh et al, 2012 (40)	Case-control: 74 LN with renal BX, (24 with concomitante urinary sample), 22 with other glomerulopathies and 13 healthy controls	To investigate whether the urinary levels of CXCL16, MCP-1 and VCAM-1 in patients with LN are predictors of particular pathology characteristics in renal biopsy	The VCAM-1 showed a stronger association with activity index in renal BX and class IV-nephritis but negative correlation with the chronicity index. The urinary VCAM-1 is also elevated in patients with ANCA-associated GN, FSGS and membranous nephropathy, not being LN-specific
Kiani et al, 2012 (41)	Cohort of 107 patients: LN proved by renal BX or proteinuria and patients without these conditions	To correlate the urinary VCAM-1 and NGAL levels with proteinuria levels and histopathological indexes of activity and chronicity. Quarterly Visits	The urinary VCAM-1 was strongly associated with the overall physician estimate about the disease activity, as well as renal analogue-visual scale, urine Pr/Cr, and renal SLICC. It was also associated with urine Pr/Cr $\geq 0.5$ . The NGAL showed no significant association with any of these measures
Wu et al, 2015 (58)	Case-control: 92 LES-LN with BX and 20 healthy controls	To determine the urinary levels of ICAM-1 and VCAM-1 in patients with LN and to explore their correlation with renal disease activity	The urinary levels of VCAM-1 and ICAM-1 were significantly higher in patients with active LN. A positive strong correlation was found between intrarenal expression and urinary levels of VCAM-1 and ICAM-1

ANCA: anti-neutrophil cytoplasmic antibody; BX: biopsy; FSGS: focal segmental and glomerulosclerosis; GN: glomerulonephritis; ICAM-1: intercellular adhesion molecule 1; LN: lupus nephritis; MCP: monocyte chemotactic protein; NGAL: *neutrophil gelatinase-associated lipocalin*; RA: rheumatoid arthritis; SLAM: Systemic Lupus Activity Measure; SLE: systemic lupus erythematosus; SLEDAI: disease activity index; SLICC / ACR: disease chronicity index according to the American College of Rheumatology; TNFR: tumor necrosis factor receptor; urine Pr/Cr: urine protein/creatinine ratio; VCAM-1: endothelial cell adhesion molecule 1.

## Conclusions and future perspectives

Experimental and clinical studies have demonstrated the potential use of urinary biomarkers of LN activity, which have high accuracy to predict disease activity, renal

flare, histological damage and may assist in monitoring the response to immunosuppressive treatment, allowing drug adjustments for both controlling the disease and reducing the exposure and toxicity.

At present time, however, the studies about biomarkers in LN still involve relatively few cohorts with short follow-up, needing to be validated in studies that are more robust. The urinary biomarkers are not superior to renal biopsy, which remains the gold standard to determine LN activity and chronicity, as well as to establish prognosis in patients in whom the disease is not controlled despite the optimization of immunosuppressive regimens. It is postulated that no biomarker has sufficient sensitivity and specificity as an isolated test, and it is necessary to adopt, as a future perspective, the validation of biomarkers panel with more accuracy to detect disease activity, to anticipate renal activity, and to establish prognosis, determining changes in the treatment as regards its intensification or even suspension. In this context, VCAM-1 appears as a biomarker that shows promising results based on several studies published in the last fifteen years.

Acknowledgments: financial support received from the "Research and Events Incentive Fund" (FIPE) of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Conflict of interest statement: the authors explicitly declare that there are no conflicts of interest in relation to this article.

#### Bibliographic References

1. Beck LH, Salant DJ. Treatment of membranous lupus nephritis: where are we now? *J Am Soc Nephrol.* 2009;20(4):690–691.

2. Danila MI, Pons-Estel GJ, Zhang J, Vilá LM, Reveille JD, Alarcón GS. Renal damage is the most important predictor of mortality within the damage index: Data from LUMINA LXIV, a multiethnic US cohort. *Rheumatology*. 2009;48(5):542–545.
3. Coremans IEM, Spronk PE, Bootsma H, et al. Changes in antibodies to C1q predict renal relapses in systemic lupus erythematosus. *Am J Kidney Dis*. 1995;26(4):595–601.
4. Landolt-Marticorena C, Prokopec SD, Morrison S, et al. A discrete cluster of urinary biomarkers discriminates between active systemic lupus erythematosus patients with and without glomerulonephritis. *Arthritis Res Ther*. 2016;18(1).
5. Rovin BH, Song H, Hebert LA, et al. Plasma, urine, and renal expression of adiponectin in human systemic lupus erythematosus. *Kidney Int*. 2005;68(4):1825–1833.
6. Suzuki M, Wiers K, Brooks EB, et al. Initial validation of a novel protein biomarker panel for active pediatric lupus nephritis. *Pediatr Res*. 2009;65(5):530–536.
7. Brunner HI, Bennett MR, Gulati G, et al. Urine Biomarkers to Predict Response to Lupus Nephritis Therapy in Children and Young Adults. *J Rheumatol*. 2017;44(8):1239–1248.
8. Varghese SA, Powell TB, Budisavljevic MN, et al. Urine biomarkers predict the cause of glomerular disease. *J Am Soc Nephrol*. 2007;18(3):913–922.
9. Das L, Suzuki M, Devarajan P, Rovin BH, Ying J, Brunner HI. Candidate urinary biomarkers may predict histological features on lupus nephritis biopsy. *Arthritis Rheum*. 2009;60(S750).
10. Kopetschke K, Klocke J, Griebach AS, et al. The cellular signature of urinary immune cells in Lupus nephritis: New insights into potential biomarkers. *Arthritis Res Ther*. 2015;17(1):1–9.
11. Enghard P, Rieder C, Kopetschke K, et al. Urinary CD4 T cells identify SLE patients with proliferative lupus nephritis and can be used to monitor treatment response. *Ann Rheum Dis*. 2014;73(1):277–283.
12. Enghard P, Humrich JY, Rudolph B, et al. CXCR3+CD4+ T cells are enriched in inflamed kidneys and urine and provide a new biomarker for acute nephritis flares in systemic lupus erythematosus patients. *Arthritis Rheum*. 2009;60(1):199–206.

13. Wu T, Xie C, Wang HW, et al. Elevated urinary VCAM-1, P-selectin, soluble TNF receptor-1, and CXC chemokine ligand 16 in multiple murine lupus strains and human lupus nephritis. *J Immunol.* 2007;179(10):7166–7175.
14. Hanaoka M, Gono T, Kawaguchi Y, et al. Urinary free light chain is a potential biomarker for ISN/RPS class III/IV lupus nephritis. *Rheumatol.* 2013;52(12):2149–2157.
15. Soliman S, Mohan C. Lupus nephritis biomarkers. *Clin Immunol.* 2017;185:10–20.
16. Zhang X, Jin M, Wu H, et al. Biomarkers of lupus nephritis determined by serial urine proteomics. *Kidney Int.* 2008;74(6):799–807.
17. Tsai CY, Wu TH, Yu CL, Lu JY, Tsai YY. Increased excretions of beta2-microglobulin, IL-6, and IL-8 and decreased excretion of Tamm-Horsfall glycoprotein in urine of patients with active lupus nephritis. *Nephron.* 2000;85(3):207–214.
18. El-Shereef RR, Lotfi A, Abdel-Naeam EA, Tawfik H. Serum and urinary interleukin-6 in assessment of renal activity in egyptian patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Med Insights Arthritis Musculoskelet Disord.* 2016;9:29–36.
19. Iwano M, Dohi K, Hirata E, et al. Urinary levels of IL-6 in patients with active lupus nephritis. *Clin Nephrol.* 1993;40(1):16–21.
20. Wu H, Zeng J, Yin J, Peng Q, Zhao M, Lu Q. Organ-specific biomarkers in lupus. *Autoimmunity Reviews.* 2017;16(4): 391–397.
21. Susianti H, Iriane VM, Dharmanata S, et al. Analysis of urinary TGF- $\beta$ 1, MCP-1, NGAL, and IL-17 as biomarkers for lupus nephritis. *Pathophysiology.* 2015;22(1):65–71.
22. Szeto CC. Urinary mRNA and lupus disease flare. *Nephrology.* 2017;22:27–30.
23. Narumi S, Takeuchi T, Kobayashi Y, Konishi K. Serum levels of ifn-inducible PROTEIN-10 relating to the activity of systemic lupus erythematosus. *Cytokine.* 2000;12:1561–1565.
24. Klocke J, Kopetschke K, Griebßbach AS, et al. Mapping urinary chemokines in human lupus nephritis: Potentially redundant pathways recruit CD4+and CD8+T cells and macrophages. *Eur J Immunol.* 2017;47(1):180–192.

25. Jakiela B, Kosalka J, Plutecka H, Węgrzyn a. S, Bazan-Socha S, Sanak M, et al. Urinary cytokines and mRNA expression as biomarkers of disease activity in lupus nephritis. *Lupus*. 2018;27(8):1259–1270.
26. Misra R, Gupta R. Biomarkers in lupus nephritis. *Int J Rheum Dis*. 2015;18(2):219–232.
27. Avihingsanon Y, Phumesin P, Benjachat T, et al. Measurement of urinary chemokine and growth factor messenger RNAs: a noninvasive monitoring in lupus nephritis. *Kidney Int*. 2006;69(4):747–753.
28. Wada T, Yokoyama H, Su SB, et al. Monitoring urinary levels of monocyte chemotactic and activating factor reflects disease activity of lupus nephritis. *Kidney Int*. 1996;49(3):761–767.
29. Lee YH, Song GG. Urinary MCP-1 as a biomarker for lupus nephritis: a meta-analysis. *Z Rheumatol*. 2017;76(4):357–363.
30. Rovin BH. Urine Chemokines as Biomarkers of Human Systemic Lupus Erythematosus Activity. *J Am Soc Nephrol*. 2005;16(2):467–473.
31. Noris M, Bernasconi S, Casiraghi F, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 is excreted in excessive amounts in the urine of patients with lupus nephritis. *Lab Invest*. 1995;73:804–809.
32. Elewa EA, El Tokhy MA, Fathy SE, Talaat AM. Predictive role of urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin in lupus nephritis. *Lupus*. 2015;24(2):138–146.
33. Kuwabara T, Mori K, Mukoyama M, et al. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin levels reflect damage to glomeruli, proximal tubules, and distal nephrons. *Kidney Int*. 2009;75:285–294.
34. Hammad A, Mosaad Y, Elhanbly S, et al. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a marker of severe lupus nephritis in children. *Lupus*. 2013;22(5):486–491.
35. Somparn P, Hirankarn N, Leelahavanichkul A, Khovidhunkit W, Thongboonkerd V, Avihingsanon Y. Urinary proteomics revealed prostaglandin H2D-isomerase, not Zn- $\alpha$ 2-glycoprotein, as a biomarker for active lupus nephritis. *J Proteomics*. 2012;75(11):3240–3247.

36. Schwartz N, Su L, Burkly LC, et al. Urinary TWEAK and the activity of lupus nephritis. *J Autoimmun.* 2006;27(4):242–250.
37. Reyes-Martínez F, Pérez-Navarro M, Rodríguez-Matías A, et al. Evaluación de los niveles urinarios de TWEAK en pacientes mexicanos con nefritis lúpica sin tratamiento farmacológico: Estudio exploratorio. *Nefrología.* 2018;38(2):220–221.
38. Schwartz N, Rubinstein T, Burkly LC, et al. Urinary TWEAK as a biomarker of lupus nephritis: a multicenter cohort study. *Arthritis Res Ther.* 2009;11(5):R143.
39. Molad Y, Miroshnik E, Sulkes J, Pitlik S, Weinberger A, Monselise Y. Urinary soluble VCAM-1 in systemic lupus erythematosus: A clinical marker for monitoring disease activity and damage. *Clin Exp Rheumatol.* 2002;20(3):403–406.
40. Singh S, Wu T, Xie C, et al. Urine VCAM-1 as a marker of renal pathology activity index in lupus nephritis. *Arthritis Res Ther.* 2012;14(4):R164.
41. Kiani AN, Wu T, Fang H, et al. Urinary vascular cell adhesion molecule, but not neutrophil gelatinase-associated lipocalin, is associated with lupus nephritis. *J Rheumatol.* 2012;39(6):1231–1237.
42. Abd-Elkareem MI, Al Tamimy HM, Khamis OA, Abdellatif SS, Hussein MRA. Increased urinary levels of the leukocyte adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1 in human lupus nephritis with advanced renal histological changes: Preliminary findings. *Clin Exp Nephrol.* 2010;14(6):548–557.
43. Hemler ME. Tetraspanin functions and associated microdomains. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2005;6(1): 801–811.
44. Kong DH, Kim YK, Kim MR, Jang JH, Lee S. Emerging roles of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in immunological disorders and cancer. *Int J Mol Sci.* 2018;19(4):13–17.
45. Cook-Mills JM, Marchese ME, Abdala-Valencia H. Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Expression and Signaling During Disease: Regulation by Reactive Oxygen Species and Antioxidants. *Antioxid Redox Signal.* 2011;15(6):1607–1638.
46. Arora S, Gunther A, Wennerblom B, et al. Systemic markers of inflammation are associated with cardiac allograft vasculopathy and an increased intimal inflammatory component. *Am J Transplant.* 2010;10(6):1428–1436.



47. Janssen BA, Luqmani RA, Gordon C, et al. Correlation of blood levels of soluble vascular cell adhesion molecule-1 with disease activity in systemic lupus erythematosus and vasculitis. *Br J Rheumatol*. 1994;33(12):1112–1116.
48. Brady H. Leukocyte adhesion molecules and kidney diseases. *Kidney Int*. 1994;45:1285–1300.
49. Spronk PE, Bootsma H, Huitema MG, Limburg PC, Kallenberg CG. Levels of soluble VCAM-1, soluble ICAM-1, and soluble E-selectin during disease exacerbations in patients with systemic lupus erythematosus (SLE); a long term prospective study. *Clin Exp Immunol*. 1994;97(3):439–444.
50. Ilić T, Mitić I, Durdević-Mirković T, Vucković B, Milić B, Popović M. Correlation between sera levels of sICAM-1 and sVCAM-1 and severity of kidney lesions in patients with lupus nephritis. *Med Pregl*. 2007;60 Suppl 2:128–132.
51. Pizarro S, Monárrez Espino J, Ruiz A, Jara LJ, Nava A, Riebeling-Navarro C. Soluble vascular cell adhesion molecule-1 indicates SLE disease activity and specific organ involvement. *Rev Alerg Mex*. 2007;54(6):189–195.
52. Ikeda Y, Fujimoto T, Ameno M, Shiiki H, Dohi K. Relationship between lupus nephritis activity and the serum level of soluble VCAM-1. *Lupus*. 1998;7(5):347–354.
53. Lewis MJ, Vyse S, Shields AM, et al. Improved monitoring of clinical response in Systemic Lupus Erythematosus by longitudinal trend in soluble vascular cell adhesion molecule-1. *Arthritis Res Ther*. 2016;18(5):1–11.
54. Zaccagni H, Fried J, Cornell J, Padilla P, Brey RL. Soluble adhesion molecule levels, neuropsychiatric lupus and lupus-related damage. *Front Biosci*. 2004;9:1654–1659.
55. Wais T, Fierz W, Stoll T, Villiger PM. Subclinical disease activity in systemic lupus erythematosus: Immunoinflammatory markers do not normalize in clinical remission. *J Rheumatol*. 2003;30(10):2133–2139.
56. Kanagawa K, Seki T, Nishigaki F. Measurement of soluble ICAM-1 after renal transplantation. *Transplant Proc*. 1994;26:2103–2105.
57. Howe HS, Kong KO, Thong BY, et al. Urine sVCAM-1 and sICAM-1 levels are elevated in lupus nephritis. *Int J Rheum Dis*. 2012;15(1):13–16.

5.8 Wu C, Yang M, Zhou Z, et al. Urinary soluble intercellular adhesion molecule-1 and vascular cellular adhesion molecule-1: potential biomarkers of active lupus nephritis. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 2015;35(9):1272–1276, 1282.

## 7.2 Artigo original

### **Urinary soluble VCAM-1 is a useful biomarker of disease activity and treatment response in lupus nephritis**

**Authors:** Andrese Aline Gasparin<sup>1,2</sup>, Nicole Pamplona Bueno de Andrade<sup>1</sup>, Vanessa Hax<sup>1</sup>, Penélope Esther Palominos<sup>1</sup>, Marina Siebert<sup>3</sup>, Rômulo Marx<sup>1</sup>, Pedro Guilherme Schaefer<sup>4</sup>, Francisco Veríssimo Veronese<sup>5</sup>, Odirlei André Monticielo<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Division of Rheumatology, Department of Internal Medicine, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

<sup>2</sup> Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas (PPGCM), Rua Ramiro Barcelos 2400, segundo andar, Porto Alegre, 90035-903, Brazil.

<sup>3</sup> Biotechnology Centre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

<sup>4</sup> Department of Pathology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil.

<sup>5</sup> Division of Nephrology, Department of Internal Medicine, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

## **ABSTRACT**

**Introduction:** Although renal pathology is highly predictive of clinical outcomes in lupus nephritis (LN), it cannot be performed serially because of its invasive nature and associated morbidity. Traditional biomarkers used in the clinical practice are not accurate predictors of LN histological class and severity, nor are they reliable in assessing

treatment response. Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) is involved in the progression of glomerular and tubulointerstitial injury in LN and can be easily assessed in urine.

**Objective:** The aim of this study was to assess urinary soluble VCAM-1 (uVCAM-1) as a biomarker of disease activity and treatment response in LN.

**Methods:** This prospective study enrolled patients with class III, IV or V LN diagnosed within the last three years and divided them in two groups: with and without active nephritis at the inclusion. At each visit, a urine sample was collected for uVCAM-1 evaluation and the nephritis status was accessed.

**Results:** Median uVCAM-1 level was elevated in patients with active compared to inactive LN ( $p<0.001$ ). The ROC curve of uVCAM-1 demonstrated an AUC of 0.84 and a cutoff of 47.2 ng/mgCr yielded a good sensitivity (74.2%) and specificity (74.2%) for the diagnosis of active LN. A significant correlation was found between uVCAM-1 level and renal activity scores and traditional biomarkers of LN. The level of uVCAM-1 dropped in patients with active LN who went into remission ( $p<0.001$ ), increased in patients who went into activity ( $p=0.002$ ) and did not change in patients who remained inactive ( $p=0.797$ ). The level of uVCAM-1 peaked during the flare of LN ( $p<0.05$ ).

**Conclusion:** The uVCAM-1 is a reliable biomarker that reflects renal disease activity and is useful for monitoring individual patients with lupus nephritis over time.

**Keywords:** lupus nephritis, VCAM-1, vascular cell adhesion molecule-1, urinary biomarker.

## Introduction

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a heterogeneous autoimmune disease of unknown etiology characterized by the production of autoantibodies and the involvement of multiple organ systems (1). Kidney involvement occurs in up to 60% of patients (2) and is a major predictor of morbidity and mortality (3). There are different histological

subtypes of lupus nephritis (LN) and the treatment changes according to its subtype (4). Clinical presentation, qualitative urine analysis, renal function estimation and urine protein-creatinine ratio (UPC) may suggest a specific subtype of LN and are currently used to assess treatment response as well as to detect nephritic flares (5). However, they lack sensitivity and specificity for distinguishing renal inflammation and damage, or predicting flare-ups of nephritis (5). Renal damage occurs before the alteration of these parameters, which leads to a delay in the diagnosis and treatment of LN, thus contributing to morbidity and mortality (6).

Kidney biopsy remains the mainstay for diagnosis and correct classification of LN. Nevertheless, it is an invasive procedure and its repetition is not indicated for the follow-up of patients. Currently, anti-double stranded DNA (anti-dsDNA) and serum complements are other non-invasive biomarkers routinely used to monitoring renal activity in patients with LN (7). However, they are not sensitive nor specific enough for detecting ongoing disease activity and early relapse of nephritis (5) and they do not reflect kidney damage nor have prognostic value.

Thus, it is of interest to discover biomarkers capable of anticipating disease activity, predicting renal histology, enabling earlier treatment and reducing undesired outcomes. Urinary biomarkers are directly excreted by the kidney and are easily obtained. They can also differentiate the renal activity of the disease from other organic manifestations more accurately than the serum biomarkers (8).

Recent proteomic studies have identified urinary vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) as a potential urinary biomarker of LN (9–11) VCAM-1 is an integrin and immunoglobulin superfamily group member that is induced on endothelial cells in response to numerous inflammatory cytokines, including tumor necrosis factor (TNF) and interleukin (IL)-1, and bind integrin partners on leukocytes. It has been documented to be

increased within the kidneys, sera and urine of SLE patients (12,13). Soluble versions of VCAM-1 are shed from endothelial cell surfaces and are detectable in urine (uVCAM-1).

Several studies correlated the uVCAM-1 levels with UPC, with general disease activity assessed through the Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index (SLEDAI) (12,13) and with active LN (14,15). Patients with more advanced histological changes (class III, IV and V nephritis with greater kidney biopsy activity) had the highest values (16,17). In addition, a previous study showed that high levels of uVCAM-1 may indicate patients at increased risk of long-term loss of renal function (11). However, prospective studies are needed to determine whether the use of serial uVCAM-1 measurements can assess LN activity and treatment response, which is the aim of this study.

## **Methods**

### **Study design and recruitment**

This prospective study included consecutive patients with class III, IV or V biopsy-proven active LN assessed according to The International Society of Nephrology/Renal Pathology Society (ISN/RPS) guidelines (18) diagnosed between January 2016 and January 2019 and subjects with LN in remission at the moment of inclusion but active within the last 3 years. Patients were recruited from the SLE outpatient clinic of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil. The study was approved by the institutional research ethics committee. All study subjects had diagnosis of SLE with age greater than 18 years old and provided written consent form for study participation. All individuals fulfilled 4 or more of the revised criteria for SLE defined by the American College of Rheumatology (ACR) (19).

To calculate the sample size, WinPEPI version 11.65 software was used, with 80% power, alpha error of 0.05 and considering a correlation of 0.5 (12,17), requiring 30 patients in each group (active or inactive nephritis) to verify correlation between urinary soluble VCAM-1 levels and active nephritis.

The patients with active nephritis were included before they started a new immunosuppressive treatment. Active LN was defined as proteinuria ( $UPC \geq 0.5$ ) plus active urinary sediment (hematuria, leukocyturia or cellular hematic/granular casts) (20). Remission was stratified in complete or partial renal response. Complete renal response was defined as  $UPC < 0.5$  and normal or near normal [within 10% of normal estimated glomerular filtration rate (eGFR) if previously abnormal] eGFR. Partial renal response was defined as  $\geq 50\%$  reduction in proteinuria to subnephrotic levels and normal or near-normal eGFR (21).

Exclusion criteria included patients with neoplasms within the last 12 months, pregnancy and/or lactation within the last three months, diabetes mellitus, chronic or acute infections, cardiovascular diseases (ischemic or thromboembolic events) within the last six months, end-stage renal disease ( $eGFR < 30 \text{ mL/min/1.73 m}^2$ ) or on hemodialysis as well as kidney transplant recipients. Patients with active neuropsychiatric lupus, antiphospholipid syndrome and overlap with other autoimmune diseases except Sjögren's syndrome were also excluded.

#### Data collection

At each visit, a urine sample was collected for soluble VCAM-1 assessment. To access and quantify the renal activity of the disease, we used the following scores: 1) The Systemic Lupus International Collaborating Clinics renal activity/response exercise (renal SLICC) (22,23). This score can range from 0 to a maximal of 15, (active LN score

$\geq 4$ ) and its graded scores for proteinuria (range 0-11), hematuria (range 0-3) and leukocyturia (range 0-1); 2) The Renal SLEDAI (the four kidney-related criteria of the SLEDAI (24), i.e., hematuria, leukocyturia, proteinuria, and urinary casts). The renal SLEDAI score can range from 0 (nonactive renal disease) to a maximal score of 16 (active LN score  $\geq 1$ ); 3) A modification of The Systemic Lupus Activity Measure revised (SLAM-R) (25), the renal SLAM-R (rSLAM-R). The rSLAM-R graded scores for the urine sediment (range 0–3) as well as the serum creatinine or creatinine clearance (range 0–3), giving a range of 0 (no active renal disease) to a maximum score of 6 (active LN score  $\geq 1$ ). An abnormal serum creatinine or creatinine clearance was included in the rSLAM-R score only if the concomitant urinary sediment was active.

In addition, the Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index 2000 (SLEDAI-2K) (24,26) and the Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology damage index (SLICC/ACR damage index) (27) scores were performed for evaluation of global activity and chronicity of SLE, respectively.

At each visit, all the participants were subjected to detailed history and clinical evaluation and the treatment was recorded. Anti-dsDNA antibody, complement C3 and C4, complete urine analysis, UPC, serum creatinine and glomerular filtration rate estimated by Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) (28) were assessed. Anti-dsDNA antibody levels were detected by *Crithidia luciliae* indirect immunofluorescence test (CLIFT) and complement C3 and C4 levels were assayed by turbidimetric immunoassay.

#### Biomarker assay

Urine samples were collected at each visit. Urine “clean-catch midstream” samples of 20-50 ml were centrifuged to 200 G for 5 min, within 1 hour of its collection to remove suspended matter, aliquoted and frozen at – 80°C. Repeated freeze-thaw was avoided until the time of analysis. No special additive or preservative was required. VCAM-1 was measured by solidphase sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), and the kits were used as indicated by the manufacturer (human VCAM1 Duo Set, catalog number DY809).

All urine samples were diluted 1:100 or more with the provided sample diluent, for the ELISA, and the concentrations of the molecule were ascertained from standard curves constructed using manufacturer-supplied standards. All assays were performed in duplicate. The urine levels of VCAM-1 were standardized to urine creatinine (Cr) measured in the same spot urine to adjust for the variable urine concentration and expressed as ng/mgCr. Coefficients of variation were below 20%.

#### Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) version 21.0, Armonk, NY, USA. Variables with a normal distribution were presented as mean and standard deviation (SD), and non-normal quantitative variables were presented as the median (25<sup>th</sup>-75<sup>th</sup> percentiles). Correlation analysis between two variables was performed using Spearman’s rank correlation. Shapiro-Wilk test was used to test for data normality. The Mann-Whitney U test was used to compare between two groups and the Kruskal-Wallis test was utilized for comparing three or more groups. The Kruskal-Wallis test was followed by Dunn's post-hoc testing. Association among categorical variables was measured by Pearson's chi-squared test. The diagnostic accuracy of urinary soluble VCAM-1 as well as traditional markers of LN were assessed using receiver operating characteristic curve (ROC) analysis, and the corresponding area



under the curve (AUC) was calculated. ROC analyses was also used to compute the sensitivity, specificity and optimal cutoff point for urinary soluble VCAM-1, as well conventional laboratory measure. A generalized estimating equation model was constructed to examine the relationship between urinary VCAM-1(log-transformed) levels and patients' disease activity over time. Poisson regression was performed on the cross-sectional data, and the prevalence ratio was derived. Statistical significance was defined as a two-tailed *p* value less than 0.05.

## Results

### Patient characteristics

Sixty-two patients were included in the study (88.7% female). The mean age (SD) was  $36.8 \pm 11.9$  years and mean SLE duration was 7.1 (3.8-12.7) years. At the baseline, 31 patients presented active LN. Fifteen patients had new-onset LN and presented a kidney biopsy performed within 3 months before the study enroll. Baseline demographics, clinical characteristics, laboratory findings, disease scores and current treatment are summarized in table 1. The level of uVCAM-1 was measured at 1 to 4 visits per patient over a mean course of 12.9 months period (range 6.5-21.5) with an average time (SD) between the visits of  $4.3 \pm 1.0$  months, for a total of 233 visits. There were 15 missed visits: two patients contributed only one visit due to 1 pregnancy and 1 death from infection; the other losses occurred because the patients did not return for evaluation within the expected period. Anti-La antibody and pure membranous nephritis were more prevalent in patients with active LN, while class IV LN in the past was more prevalent in patients with inactive LN. Mycophenolate mofetil was more frequently used in remission LN patients.

Table 1. Baseline demographics, clinical characteristics, laboratory findings, disease scores and medications

Patient's Features <sup>#</sup>	Total	Active LN	Inactive LN	<i>p</i>
---------------------------------	-------	-----------	-------------	----------

	(n=62)	(n=31)	(n=31)	
Age (years)	36.8 ± 11.9	36.7 ± 13.2	36.9 ± 10.5	0.926
Female	55 (88.7)	26 (83.9)	29 (93.5)	0.425
Caucasian	52 (83.9)	25 (80.6)	27 (87.1)	0.730
Disease duration (years)	7.1 (3.8 – 12.7)	6.5 (1.0 – 11.3)	8.4 (4.3 – 14.2)	0.149
<b>SLE Clinical characteristics</b>				
Mucocutaneous	58 (93.5)	29 (93.5)	29 (93.5)	1.000
Musculoskeletal	29 (46.8)	12 (38.7)	17 (54.8)	0.309
Serositis	18 (29.0)	7 (22.6)	11 (35.5)	0.401
Neuropsychiatric	3 (4.8)	1 (3.2)	2 (6.5)	1.000
Hematological	40 (64.5)	22 (71.0)	18 (58.1)	0.426
<b>Autoantibodies</b>				
Anti-dsDNA	50 (80.6)	26 (83.9)	24 (77.4)	0.748
Anti-Sm	17 (28.8)	9 (31.0)	8 (26.7)	0.934
Anti-Ro	19 (32.2)	11 (3.9)	8 (26.7)	0.518
Anti-La	9 (15.3)	8 (27.6)	1 (3.3)	<b>0.012</b>
Anti-nRNP	17 (28.8)	8 (27.6)	9 (30.0)	1.000
aPL	4 (6.6)	3 (10.0)	1 (3.2)	0.354
<b>Sjögren's syndrome</b>	4(6.5)	3(9.7)	1(3.2)	0.612
<b>Renal pathology (ISN/RPS)</b>				
				<b>0.039</b>
III	34 (55.7)	17 (54.8)	17 (56.7)	
IV	13 (21.3)	3 (9.7)	10 (33.3)*	
III + V or IV + V	4 (6.6)	3 (9.7)	1 (3.3)	
V	10 (16.4)	8 (25.8)*	2 (6.7)	
<b>Disease activity and damage scores</b>				
SLEDAI-2K	8 (2 – 16)	16 (10 – 18)	2 (0 – 4)	<b>&lt;0.001</b>
Renal SLEDAI	6 (0 – 12)	12 (8 – 12)	0 (0 – 4)	<b>&lt;0.001</b>
Renal SLAM-R	2 (0 – 2)	2 (2 – 3)	0 (0 – 2)	<b>&lt;0.001</b>
Renal SLICC	4 (0 – 8)	8 (6 – 11)	0 (0 – 1)	<b>&lt;0.001</b>
SDI	0 (0 – 1)	0 (0 – 1)	0 (0 – 1)	0.229
<b>Laboratory parameters</b>				
C3 (mg/dl)	92 (65 – 121)	70 (54 – 94)	111 (89 – 135)	<b>&lt;0.001</b>
C4 (mg/dl)	15 (8.8 – 22.3)	10 (5 – 15)	22 (15 – 29)	<b>&lt;0.001</b>
UPC	0.68 (0.28 – 1.95)	1.84 (0.95 – 3.36)	0.29 (0.09 – 0.46)	<b>&lt;0.001</b>
eGFR	103.5 (87 – 121)	93 (72 – 126)	107 (91 – 121)	0.379
<b>Current medication</b>				
Hydroxychloroquine	51 (82.3)	24 (77.4)	27 (87.1)	0.506
Azathioprine	8 (12.9)	1 (3.2)	7 (22.6)	0.053
Mycophenolate mofetil	29 (46.8)	9 (29.0)	20 (64.5)	<b>0.011</b>
Prednisone	19 (30.6)	11 (35.4)	8 (25.8)	0.582
Calcineurin inhibitors	1 (1.6)	1 (3.2)	0 (0.0)	1.000

aPL: antiphospholipid, either IgG anti-cardiolipin or the lupus anticoagulant; C: complement; eGFR: estimated glomerular filtration rate; ISN/RPS: The International Society of Nephrology/Renal Pathology Society; LN: lupus nephritis; SDI: American College of Rheumatology/Systemic Lupus International Collaborative Clinics SLE damage index; SLAM-R:

Systemic Lupus Activity Measure – Revised; SLE: systemic lupus erythematosus; SLEDAI: SLE disease activity index; SLICC: Systemic Lupus International Collaborating Clinics Renal Activity/Response Exercise; UPC: urine protein creatinine ratio.

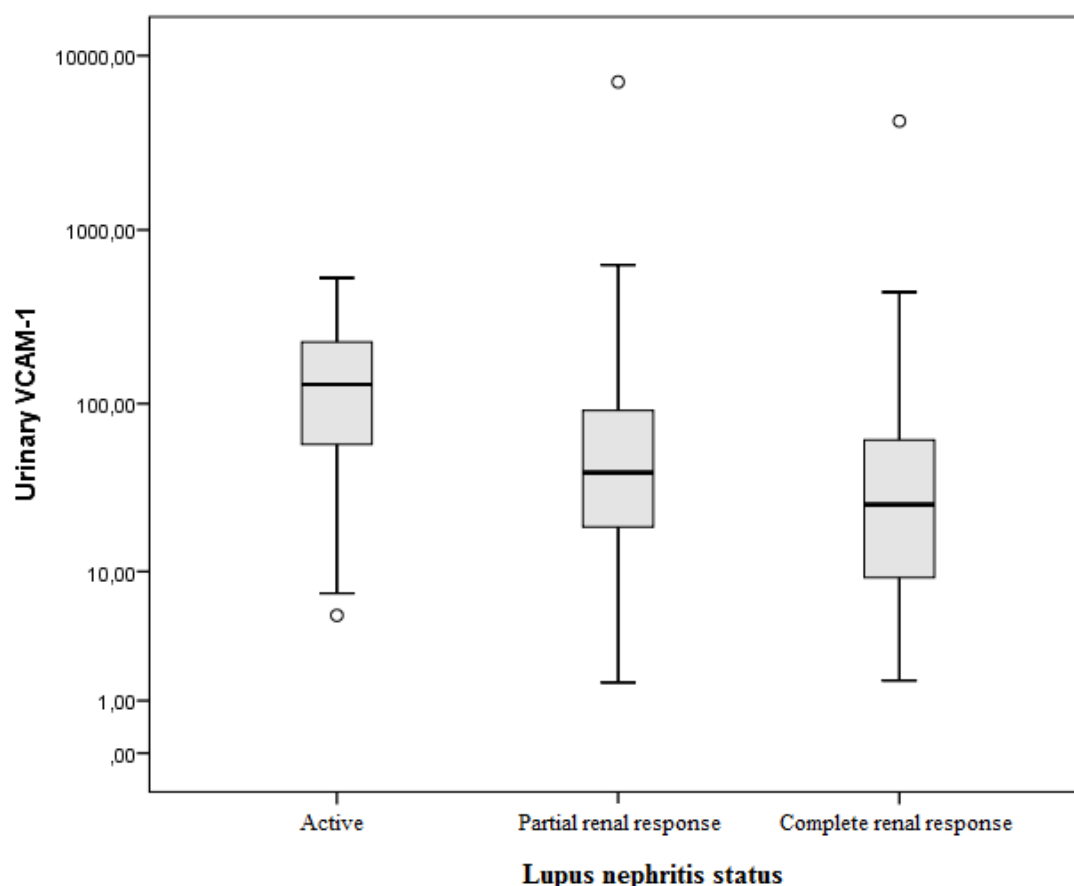
# Variables described as mean  $\pm$  standard deviation, median (25<sup>th</sup>-75<sup>th</sup> percentiles) or n (%)

\* Statistically significant association by residual test adjusted to 5% significance

### **Urinary soluble VCAM-1 differentiates between active and inactive lupus nephritis**

The uVCAM-1 levels were elevated in patients with active LN at the inclusion compared to inactive patients (Median=125.3 ng/mgCr; 25<sup>th</sup>-75<sup>th</sup> percentiles: 46.9-249.6 vs. 28.7 ng/mgCr; 25<sup>th</sup>-75<sup>th</sup> percentiles: 8.8 – 47.8,  $p<0.001$ ).

During follow-up, uVCAM-1 levels were higher in patients with active LN compared to those with partial or complete renal response ( $p<0.001$ ). Regarding the partial and complete renal response, there was no significant difference ( $p=0.132$ ), but there was a tendency to lower levels in the complete response, as shown in figure 1.



**Figure 1.** Analysis of uVCAM-1 according to nephritis status during follow-up. Active LN was defined as proteinuria (UPC $\geq$ 0.5) plus active urinary sediment. Complete renal response was defined as UPC $<$ 0.5 and normal or near normal [within 10% of normal estimated glomerular filtration rate (eGFR) if previously abnormal] eGFR. Partial renal response was defined as  $\geq$ 50% reduction in proteinuria to subnephrotic levels and normal or near-normal eGFR.

ROC analyses were performed to derive the best cutoff values of uVCAM-1 and traditional biomarkers to differentiate between active and inactive LN. The AUCs and best cutoff values are shown in table 2, as well as the combinations of these biomarkers.

**Table 2.** Combination of conventional biomarkers and urinary soluble VCAM-1 for the diagnosis of active LN

<b>Analyte</b>	<b>AUC (CI 95%)</b>	<b>Cutoff</b>	<b>Sensitivity</b>	<b>Specificity</b>	<b>Accuracy</b>
VCAM-1	0.84 (0.75-0.94)	> 47.2	74.2%	74.2%	74.2%

C3	0.79 (0.68-0.91)	< 93	74.2%	67.7%	71.0%
C4	0.84 (0.74-0.94)	< 16	87.1%	74.2%	77.4%
Anti-dsDNA	0.65 (0.51-0.79)	> 1/10	51.6%	74.2%	64.5%
C3 + C4	-	-	87.1%	67.7%	77.4%
C3 + C4 + Anti-dsDNA	-	-	90.3%	61.3%	75.8%
VCAM-1 + C3	-	-	93.5%	51.6%	72.6%
VCAM-1 + C4	-	-	96.8%	58.1%	77.4%
VCAM-1 + Anti-dsDNA	-	-	83.9%	54.8%	69.4%
VCAM-1 + C3 + C4	-	-	96.8%	51.6%	74.2%
VCAM-1 + C3 + C4 + Anti-dsDNA	-	-	96.8%	45.2%	71.0%

AUC: area under the curve; C: complement; CI: confidence interval; VCAM-1: vascular cell adhesion molecule-1

A significant correlation was found between uVCAM-1 levels and SLEDAI-2k, renal SLEDAI, renal SLAM-R, renal SLICC, C3, C4, anti-dsDNA, UPC and hematuria, as shown in table 3.

Table 3. Correlations between urinary soluble VCAM-1 and other LN biomarkers/disease scores

	VCAM-1
SLEDAI-2k	0.597***
SDI	0.118
Renal SLEDAI	0.569***
Renal SLAM-R	0.470***
Renal SLICC	0.620***
Anti-dsDNA	0.342**
C3	-0.344**
C4	-0.382**
Serum creatinine	0.108
eGFR	-0.072
UPC	0.654***
Leukocyturia	0.187
Hematuria	0.388**

Spearman's correlation coefficients

\**p* value <0.05; \*\**p* value <0.01; \*\*\**p* value <0.001

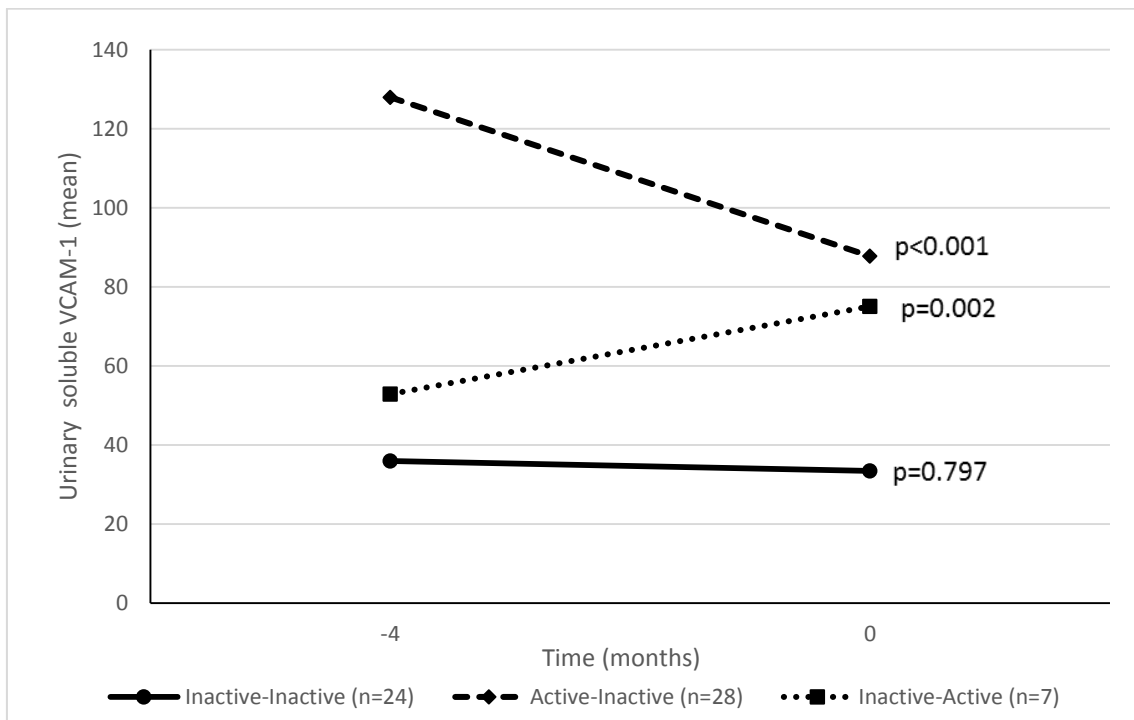
C: complement; LN: lupus nephritis; SDI: American College of Rheumatology/Systemic Lupus International Collaborative Clinics SLE Damage Index; SLEDAI: Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index; renal SLAM-R: The renal Systemic Lupus Activity Measure revised; renal SLICC: The Systemic Lupus International Collaborating Clinics renal activity/response exercise; eGFR: estimated glomerular filtration rate; UPC: urine protein-creatinine ratio.

A Poisson regression model adjusting for age, sex, ethnicity, C3 and C4 levels and anti-dsDNA showed a prevalence ratio of 1.97 (95% confidence interval =1.08 to 3.61, *p*=0.028) for high uVCAM-1 levels, correlating with the presence of active LN.

In patients with active LN at baseline, there was no significant difference in uVCAM-1 levels according to the class of nephritis III, IV, V and III + V or IV + V ( $p=0.207$ ). Similarly, we found no difference between proliferative forms with or without associated class V versus pure membranous (median=100.4 ng/mgCr; 25<sup>th</sup>-75<sup>th</sup> percentiles: 40.5-224.1 vs 191.5 ng/mgCr; 25<sup>th</sup>-75<sup>th</sup> percentiles: 66.5-288.4;  $p=0.295$ ).

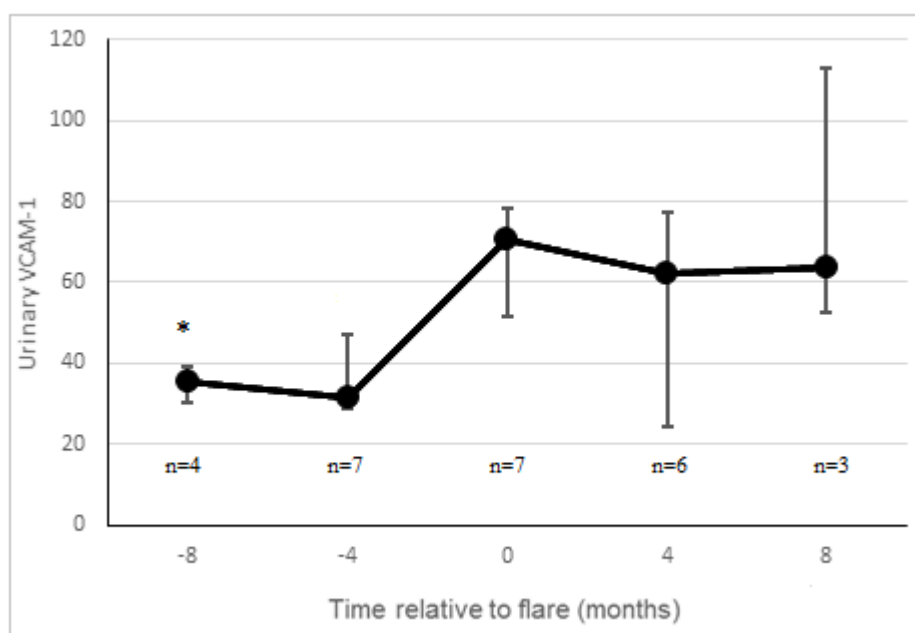
#### **Urinary soluble VCAM-1 is a marker of disease activity and treatment response**

We analyzed the levels of uVCAM-1 when the patient changed his LN status (inactive-active or active-inactive) and when it remained the same (inactive-inactive) regarding the last study visit (mean four months ago). During the observation period, only one patient remained with active nephritis at all visits in spite of the treatment (data not showed) and two patients contributed only with one visit. The levels of uVCAM-1 dropped significantly in patients with active LN who went into remission (inactive) and significantly increased in patients who went into activity. In patients who remained inactive, there was no significant change, as observed in figure 2.



**Figure 2. Urinary soluble VCAM-1 levels according to lupus nephritis status. Active LN was defined as proteinuria (UPC $\geq$ 0.5) plus active urinary sediment (hematuria, leukocyturia or cellular hematic/granular casts).**

During the follow-up, seven patients who entered the study with inactive LN presented reactivation of nephritis. Urine samples from before, during and after the flare were prospectively collected. As shown in figure 3, uVCAM-1 levels peaked during the flare and decreased afterwards. Statistically significant difference was found between uVCAM-1 levels at the flare as compared to 8 months before the flare time point ( $p=0.003$ ). Although the differences between uVCAM-1 levels at the flare and 4 and 8 months after that did not reach statistical significance, a downward trend was observed.



**Figure 3.** Urinary soluble VCAM-1 levels at different time points relative to a lupus nephritis flare. The levels of uVCAM-1 of seven lupus nephritis patients were evaluated 8 and 4 months before and after a flare, including at the time of the flare itself (time point 0). The number of patients who contributed at each moment was informed. Graph represents median and interquartile range. \* $p < 0.05$  compared with level at flare.

## Discussion

This prospective study demonstrated the usefulness of uVCAM-1 as a biomarker of disease activity and treatment response in LN. We assessed the uVCAM-1 levels at baseline and after 4, 8 and 12 months in 31 active and 31 inactive LN patients, without other significant SLE activity (SLEDAI-2K median 2; 25<sup>th</sup>-75<sup>th</sup> percentiles 0-4). The uVCAM-1 levels were elevated in patients with active compared to inactive LN at the baseline. A significant correlation was found between uVCAM-1 levels and renal activity scores, C3 and C4 levels, anti-dsDNA, UPC and hematuria. The levels of uVCAM-1



dropped significantly in patients with active LN who went into remission and significantly increased in patients who went into activity.

In LN, urinary biomarkers may be more specific for renal damage than serum biomarkers, particularly in SLE patients with active systemic disease (8). Besides that, obtaining urine for laboratory testing is much easier and less invasive, making it an ideal biological sample for a disease that requires repetitive screening. Nevertheless, it is unlikely that uVCAM-1 will entirely replace kidney biopsy in the diagnostic process, since it cannot help in differentiating LN classes neither provides information about the presence of nephropathy secondary to antiphospholipid syndrome or other etiologies.

The uVCAM-1 levels were significantly higher in patients with active LN. We have also demonstrated during the follow-up, a tendency to higher levels of uVCAM-1 in patients with partial renal response compared to complete renal response, which further reinforces this relationship. These results are in agreement with previous studies demonstrating elevated uVCAM-1 levels in patients with active LN (13,17,29,30).

Moreover, the uVCAM-1 levels consistently correlated with several renal activity scores, like renal SLEDAI, renal SLAM-R and renal SLICC. Serum levels of complements and anti-dsDNA as well as UPC levels also showed a significant correlation with uVCAM-1.

The VCAM-1 is an adhesion molecule involved in trafficking of inflammatory cells and lymphocytes. The increase of VCAM-1 was verified not only in the endothelium, but also in cortical tubules and glomeruli of murine lupus nephritis models (31). VCAM-1 was also elevated in the urine of mice with experimentally induced immune nephritis, showing a good correlation with disease activity (12) and the strains that developed more severe kidney disease also had higher urinary VCAM-1 levels (32). VCAM-1 expression increased significantly in the kidney of patients with LN, as detected by immunohistochemical and computer-imaging analysis techniques (33,34). These

findings suggest that elevated levels of uVCAM-1 in LN reflect increased of its production within the kidney as a consequence of active inflammation.

The ROC curve of uVCAM-1 demonstrated an AUC of 0.84 for all the participants and a cutoff of 47.2 ng/mgCr yielded a good sensitivity (74.2%) and specificity (74.2%) for the diagnosis of active LN. In our study, high uVCAM-1 levels reflected the presence of LN in SLE patients at least in the same way or even better than clinical markers in widespread use, such as anti-dsDNA antibodies and complement component levels. When combined with traditional LN biomarkers (C3, C4 and anti-dsDNA), uVCAM-1 increased sensitivity from 90.3% to 96.8%.

In agreement with the work from Mok CC et al (30), we observed no difference between uVCAM-1 levels and nephritis class (proliferative with or without membranous vs pure membranous). We chose not to include patients with class I and II nephritis, which were not associated with VCAM-1 elevation in previous studies (16,30). Some studies showed that elevated uVCAM-1 is not specific for SLE. It appears to be a marker of renal injury since other types of inflammatory nephritis (anti-neutrophil cytoplasmic antibodies-associated glomerulonephritis, for instance) also showed elevated levels of uVCAM-1 (17,35). Therefore, patients with class V LN who had a sufficient degree of inflammation to fulfill the activity criteria would also be expected to have a significant increase in uVCAM-1 levels. A previous study that found higher levels of uVCAM-1 in proliferative classes did not compare them against pure class V, but with a group formed together with class II (36). This finding remains to be confirmed in larger numbers of patients displaying each of these histological subtypes.

Fluctuations of uVCAM-1 levels were found to reflect renal disease activity in LN patients. Besides that, effective LN therapy reduced uVCAM-1 levels over the time, emphasizing the role of uVCAM-1 as a valuable biomarker in LN follow-up. Among patients who reactivated nephritis during follow-up, uVCAM-1 levels were not found to

be predictive of flare. However, the peak was at the time of the flare, thus uVCAM-1 levels may provide supporting evidence in cases where the diagnosis of a renal flare is suspected. This may be especially important in cases whose traditional biomarkers are not helpful to identify LN activity, for instance, in patients with residual hematuria, anti-dsDNA permanently positive or who have deficiencies of complement components.

This study has some potential limitations. The first is not having uVCAM-1 assessments at shorter time intervals. Therefore, we cannot rule out elevation of uVCAM-1 levels closer to the nephritis flare. However, it is unlikely that a patient with inactive disease will be reevaluated in a period shorter than four months in clinical practice. Other limitation is that some measurements were based on a relatively small group of patients (only seven reactivated LN) and our study may not have enough power to be conclusive at this point. In this study we were also unable to compare the performance of uVCAM-1 with proteinuria regarding the diagnosis of LN. As proteinuria was one of the parameters taken into account in our definition of active LN, we could not examine it as an independent marker in comparison with uVCAM-1 in the diagnosis of active LN.

### **Conclusion**

The uVCAM-1 is a reliable biomarker that reflects renal disease activity. It is useful in the assessment of patients with LN as a one-time measurement tool but also in the follow-up of patients undergoing therapy. Moreover, uVCAM-1 performed significantly better than some traditional biomarkers in widespread use in distinguishing between lupus patients with active or inactive nephritis.

With the emergence of new biomarkers, other longitudinal studies with larger number of patients and different populations are needed to define which combination of biomarkers best reflects changes in LN activity and response to therapy. Defining an

optimal panel of biomarkers for LN monitoring is still an unmet need. In this scenario, uVCAM-1 proved to be an excellent candidate to compose this panel.

**Funding:** Support for this work was provided via grants from the Research Incentive Fund (FIPE/HCPA) and Research Support Fund of Sociedade Brasileira de Reumatologia.

**Contributors:** All coauthors contributed to discussions, drafted the statements and reviewed the manuscript.

## References

1. Swaak a. JG, Huysen V, Nossent JC, Smeenk RJT. Antinuclear antibody profiles in relation to specific disease manifestations of systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol.* 1990;9(1 Supplement):82–95.
2. Beck LH, Salant DJ. Treatment of membranous lupus nephritis: where are we now? *J Am Soc Nephrol.* 2009;20(4):690–1.
3. Danila MI, Pons-Estel GJ, Zhang J, Vilá LM, Reveille JD, Alarcón GS. Renal damage is the most important predictor of mortality within the damage index: Data from LUMINA LXIV, a multiethnic US cohort. *Rheumatology.* 2009;48(5):542–5.
4. Bomback AS, Appel GB. Updates on the treatment of lupus nephritis. *J Am Soc Nephrol.* 2010;21(12):2028–35.
5. Mok CC. Biomarkers for lupus nephritis: A critical appraisal. *J Biomed Biotechnol.* 2010;2010.
6. Faurschou M, Starklint H, Halberg P, Jacobsen S. Prognostic factors in lupus nephritis: Diagnostic and therapeutic delay increases the risk of terminal renal failure. *J Rheumatol.* 2006;33(8):1563–9.

7. Coremans IEM, Spronk PE, Bootsma H, Daha MR, van der Voort EAM, Kater L, et al. Changes in antibodies to C1q predict renal relapses in systemic lupus erythematosus. *Am J Kidney Dis.* 1995;26(4):595–601.
8. Reyes-Thomas J, Blanco I, Putterman C. Urinary Biomarkers in Lupus Nephritis. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2010;40(3):138–50.
9. Landolt-Marticorena C, Prokopec SD, Morrison S, Noamani B, Bonilla D, Reich H, et al. A discrete cluster of urinary biomarkers discriminates between active systemic lupus erythematosus patients with and without glomerulonephritis. *Arthritis Res Ther.* 2016;18(1).
10. Stanley S, Ding H, Pedroza C, Saxena R, Petri M, Mohan C. Comprehensive Aptamer-based screening of 1129 proteins reveals novel urinary biomarkers of lupus nephritis. *Arthritis Rheumatol.* 2016;68(Suppl 10):3778.
11. Parodis I, Gokaraju S, Zickert A, Vanarsa K, Zhang T, Habazi D, et al. ALCAM and VCAM-1 as urine biomarkers of activity and long-term renal outcome in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford).* 2019; Nov 13. pii: kez528. doi: 10.1093/rheumatology/kez528.
12. Wu T, Xie C, Wang HW, Zhou XJ, Schwartz N, Calixto S, et al. Elevated urinary VCAM-1, P-selectin, soluble TNF receptor-1, and CXC chemokine ligand 16 in multiple murine lupus strains and human lupus nephritis. *J Immunol.* 2007;179(10):7166–75.
13. Molad Y, Miroshnik E, Sulkes J, Pitlik S, Weinberger A, Monselise Y. Urinary soluble VCAM-1 in systemic lupus erythematosus: A clinical marker for monitoring disease activity and damage. *Clin Exp Rheumatol.* 2002;20(3):403–6.
14. Howe HS, Kong KO, Thong BY, Law WG, Chia FLA, Lian TY, et al. Urine sVCAM-1 and sICAM-1 levels are elevated in lupus nephritis. *Int J Rheum Dis.* 2012;15(1):13–6.
15. Wu C, Yang M, Zhou Z, Feng X, Zhong X, Cui S, et al. Urinary soluble intercellular adhesion molecule-1 and vascular cellular adhesion molecule-1: potential biomarkers of active lupus nephritis. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 2015;35(9):1272–6, 1282.
16. Abd-Elkareem MI, Al Tamimy HM, Khamis OA, Abdellatif SS, Hussein MRA. Increased urinary levels of the leukocyte adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-

- 1 in human lupus nephritis with advanced renal histological changes: Preliminary findings. *Clin Exp Nephrol.* 2010;14(6):548–57.
17. Singh S, Wu T, Xie C, Vanarsa K, Han J, Mahajan T, et al. Urine VCAM-1 as a marker of renal pathology activity index in lupus nephritis. *Arthritis Res Ther.* 2012;14(4):R164.
  18. Weening JJ, D'Agati VD, Schwartz MM, Seshan S V., Alpers CE, Appel GB, et al. The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited. *Kidney Int.* 2004;65(2):521–30.
  19. Hochberg MC. Updating the American college of rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1997;40(9):1725–1725.
  20. Hahn BH, McMahon MA, Wilkinson A, Wallace WD, Daikh DI, Fitzgerald JD, et al. American College of Rheumatology guidelines for screening, treatment, and management of lupus nephritis. *Arthritis Care Res.* 2012;64(6):797–808.
  21. Bertsias GK, Tektonidou M, Amoura Z, Aringer M, Bajema I, Berden JHM, et al. Joint European League Against Rheumatism and European Renal Association-European Dialysis and Transplant Association (EULAR/ERA-EDTA) recommendations for the management of adult and paediatric lupus nephritis. *Ann Rheum Dis.* 2012;71(11):1771–82.
  22. Petri M, Kasitanon N, Singh S, Link K, Magder L, Bae SC, et al. Systemic lupus international collaborating clinics renal activity/response exercise: Comparison of agreement in rating renal response. *Arthritis Rheum.* 2008;58(6):1789–95.
  23. Erratum. *Arthritis & Rheum.* 2008;58:2823.
  24. Gladman DD, Ibañez D, Urowitz MB. Systemic lupus erythematosus disease activity index 2000. *J Rheumatol.* 2002;29(2):288–91.
  25. Bae SC, Koh HK, Chang DK, Kim MH, Park JK, Kim SY. Reliability and validity of systemic lupus activity measure-revised (SLAM-R) for measuring clinical disease activity in systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 2001;10(6):405–9.
  26. Touma Z, Urowitz MB, Ibañez D, Gladman DD. SLEDAI-2K 10 days versus SLEDAI-2K 30 days in a longitudinal evaluation. *Lupus.* 2011;20(1):67–70.

27. Gladman, DD Urowitz, MB Goldsmith H. 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(5):809–13.
28. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang Y, Castro AF, Feldman HI, et al. A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med.* 2009;150(9):604–12.
29. Kiani AN, Wu T, Fang H, Zhou XJ, Ahn CW, Magder LS, et al. Urinary vascular cell adhesion molecule, but not neutrophil gelatinase-associated lipocalin, is associated with lupus nephritis. *J Rheumatol.* 2012;39(6):1231–7.
30. Mok CC, Soliman S, Ho LY, Mohamed FA, Mohamed FI, Mohan C. Urinary angiostatin, CXCL4 and VCAM-1 as biomarkers of lupus nephritis. *Arthritis Res Ther.* 2018;20(1).
31. Wuthrich RP. Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) expression in murine lupus nephritis. *Kidney Int.* 1992;42(4):903–14.
32. Wu T, Xie C, Bhaskarabhatla M, Yan M, Leone A, Chen SS, et al. Excreted urinary mediators in an animal model of experimental immune nephritis with potential pathogenic significance. *Arthritis Rheum.* 2007;56(3):949–59.
33. Chen X, Xu Q, Tang L. Expression of intercellular adhesion molecule-1 and vascular adhesion molecule-1 in kidney of patients with lupus nephritis and membranoproliferative glomerulonephritis. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi.* 1995;24(3):149–51.
34. Seron D, Cameron JS, Haskard DO. Expression of VCAM-1 in the normal and diseased kidney. *Nephrol Dial Transplant.* 1991;6(12):917–22.
35. Arrizabalaga P, Solé M, Iglesias C, Escaramís G, Ascaso C. Renal expression of ICAM-1 and VCAM-1 in ANCA-associated glomerulonephritis - Are there differences among serologic subgroups? *Clin Nephrol.* 2006;65(2):79–86.
36. Soliman S, Mohamed FA, Ismail FM, Stanley S, Saxena R, Mohan C. Urine angiostatin and VCAM-1 surpass conventional metrics in predicting elevated renal pathology activity indices in lupus nephritis. *Int J Rheum Dis.* 2017;20(11):1714–27.

## 8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo demonstrou que os níveis de uVCAM-1 diminuíram nos pacientes com NL ativa que entraram em remissão e aumentaram nos que entraram em atividade, confirmando que suas flutuações refletem o comportamento da doença renal.

Os pacientes que reativaram a nefrite durante o seguimento apresentaram pico dos níveis de uVCAM-1 no momento da ativação, o que pode auxiliar em casos de dúvida diagnóstica, como por exemplo, em pacientes com proteinúria residual, sedimento urinário persistentemente ativo ou deficiência de produção de componentes do complemento.

Os níveis de uVCAM-1 foram mais elevados em pacientes com NL ativa na entrada do estudo. Durante o acompanhamento, observamos também uma tendência a níveis mais altos em pacientes com resposta renal parcial em comparação à resposta renal completa. Além disso, houve correlação significativa entre os níveis de uVCAM-1 e os escores de doença renal e os biomarcadores tradicionais de NL. Níveis de uVCAM-1 acima do ponto de corte ( $>47,2$  ng/mgCr) apresentaram performance semelhante ou até mesmo superior aos biomarcadores atualmente usados na identificação de NL.

Nossos resultados permitem concluir, portanto, que o uVCAM-1 é um biomarcador útil na avaliação da atividade da NL e no acompanhamento do seu tratamento.



## 9 PERSPECTIVAS FUTURAS

Recentes estudos experimentais e clínicos investigaram o papel de diversos biomarcadores urinários na monitorização da NL. Esses novos biomarcadores apresentam como vantagens a fácil obtenção e a viabilidade de repetições seriadas. Além disso, possuem íntima relação com o parênquima renal, refletindo com maior acurácia a atividade inflamatória local. Algumas dessas moléculas apresentaram, inclusive, performance superior à dos biomarcadores séricos tanto novos quanto tradicionais, na detecção de NL.

Contudo, ainda existem poucos estudos longitudinais publicados e com curto período de seguimento, necessitando de posterior validação por trabalhos mais robustos. Outro ponto importante é que nenhum biomarcador alcançou individualmente um valor preditivo considerado excelente, até o momento.

Como perspectiva futura, aguarda-se a definição e a validação de um conjunto de biomarcadores que apresente maior precisão na detecção da NL, boa correlação com a classe histológica e capacidade de predizer prognóstico a longo prazo. Este painel poderá ainda ser usado na avaliação da resposta ao tratamento, otimizando seus potenciais benefícios e minimizando seus riscos.

Nesse contexto, a monitorização dos níveis urinários de VCAM-1 solúvel mostrou resultados promissores no presente estudo, de modo que essa molécula parece ser uma forte candidata para compor este painel.

## 10 ANEXOS

### ANEXO I. Critérios de classificação do ACR para LES revisados em 1997

- 1. Eritema malar:** lesão eritematosa fixa em região malar, plana ou em relevo.
- 2. Lesão discóide:** lesão eritematosa, infiltrada, com escamas queratóticas aderidas e tampões foliculares, que evolui com cicatriz atrófica e discromia.
- 3. Fotossensibilidade:** exantema cutâneo como reação não-usual à exposição à luz solar, de acordo com a história do paciente ou observado pelo médico.
- 4. Úlceras orais/nasais:** úlceras orais ou nasofaríngeas, usualmente indolores, observadas pelo médico.
- 5. Artrite:** não-erosiva envolvendo duas ou mais articulações periféricas, caracterizadas por dor e edema ou derrame articular.
- 6. Serosite:** pleurís (caracterizada por história convincente de dor pleurítica, atrito auscultado pelo médico ou evidência de derrame pleural) ou pericardite (documentado por eletrocardiograma, atrito ou evidência de derrame pericárdico).
- 7. Comprometimento renal:** proteinúria persistente ( $> 0,5$  g/dia ou 3+) ou cilindrúria anormal.
- 8. Alterações neurológicas:** convulsão (na ausência de outra causa) ou psicose (na ausência de outra causa).
- 9. Alterações hematológicas:** anemia hemolítica ou leucopenia (menor que  $4.000/\text{mm}^3$  em duas ou mais ocasiões) ou linfopenia (menor que  $1.500/\text{mm}^3$  em duas ou mais ocasiões) ou plaquetopenia (menor que  $100.000/\text{mm}^3$  na ausência de outra causa).
- 10. Alterações imunológicas:** anticorpo anti-DNA nativo ou anti-Sm ou presença de anticorpo antifosfolípide com base em:
  - a) níveis anormais de IgG ou IgM anticardiolipina;
  - b) teste positivo para anticoagulante lúpico; ou
  - c) teste falso-positivo para sífilis, por, no mínimo, seis meses.
- 11. Anticorpos antinucleares:** título anormal de anticorpo antinuclear por imunofluorescência indireta ou método equivalente, em qualquer época, e na ausência de drogas conhecidas por estarem associadas à síndrome do lúpus induzido por drogas.

---

Adaptado de Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus (29).

## ANEXO II. Critérios de classificação de 2012 do SLICC para LES

### Critérios clínicos

1. Lúpus cutâneo agudo
2. Lúpus cutâneo crônico
3. Úlceras orais ou nasais
4. Alopecia não-cicatrizante
5. Artrite
6. Serosite
7. Renal
8. Neurológico
9. Anemia hemolítica
10. Leucopenia
11. Trombocitopenia ( $<100.000/\text{mm}^3$ )

### Critérios imunológicos

1. FAN
2. Anti-dsDNA
3. Anti-Sm
4. Anticorpos antifosfolípidos
5. Complementos baixos (C3, C4, CH50)
6. Coombs direto positivo (não contado na presença de anemia hemolítica)

### ANEXO III. Classificação 2003 da ISN/RPS para nefrite lúpica

I		GN mesangial mínima: aspecto normal à MO; depósitos mesangiais à IF
II		GN proliferativa mesangial: expansão de matriz ou celularidade mesangial de qualquer grau à MO; depósitos imunes mesangiais; esparsos depósitos subepiteliais ou subendoteliais à IF/ME
III	A	GN proliferativa focal com lesões ativas
	A/C	GN proliferativa focal com lesões ativas e crônicas
	C	GN proliferativa focal com lesões crônicas
IV	S-A	GN proliferativa segmentar difusa, lesões ativas e necrotizantes
	G-A	GN proliferativa global difusa, lesões ativas e necrotizantes
	S-A/C	GN proliferativa segmentar difusa, lesões ativas e crônicas
	G-A/C	GN proliferativa global difusa, lesões ativas e crônicas
	S-C	GN proliferativa segmentar difusa, lesões crônicas com cicatrizes
	C-C	GN proliferativa global difusa, lesões crônicas com cicatrizes
V		GN membranosa: depósitos subepiteliais globais ou segmentares ou suas sequelas à MO, IF ou ME, combinada ou não às classes III e IV
VI		Nefrite lúpica esclerosante avançada: mais de 90% de glomérulos escleróticos sem lesões ativas residuais

GN: glomerulonefrite; MO: microscopia óptica; IF: imunofluorescência; ME: microscopia eletrônica.

Adaptado de Weening JJ, D'Agati VD, Schwartz MM, Seshan S V., Alpers CE, Appel GB, et al. The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited (297).

### ANEXO IV. Classificação de 1982 da OMS/ISKDC para nefrite lúpica

Ia	Normal sob todas as técnicas
Ib	Normal à MO, depósitos à IF e/ou ME
IIa	GN mesangial, com hiper celularidade/expansões mesangiais discretas
IIb	GN mesangial, com hiper celularidade/expansões mesangiais moderadas
IIIa	GN segmentar e focal, com lesões necrotizantes ativas
IIIb	GN segmentar e focal, com lesões ativas e esclerosantes
IIIc	GN segmentar e focal, com lesões esclerosantes
IVa	GN difusa, sem lesões segmentares
IVb	GN difusa, com lesões necrotizantes ativas
IVc	GN difusa, com lesões ativas e esclerosantes
Va	GN membranosa difusa pura
Vb	GN membranosa associada à classe II
Vc	GN membranosa associada à classe III
Vd	GN membranosa associada à classe IV
VI	GN esclerosante avançada

GN: glomerulonefrite; MO: microscopia óptica; IF: imunofluorescência; ME: microscopia eletrônica. Adaptado de Churg J, Sobin L. Renal disease: classification and atlas of glomerular disease. Renal disease. New York/Tokyo; 1982 (298).

## **ANEXO V. Termo de consentimento livre e esclarecido**

**Nº do projeto GPPG: 16-0616 CAAE: 62491416.5.0000.5327**

### **AVALIAÇÃO PROSPECTIVA DO VCAM-1 SOLÚVEL URINÁRIO COMO BIOMARCADOR DE NEFRITE EM PACIENTES COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO**

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa cujo objetivo é avaliar os níveis urinários de uma molécula (VCAM-1) que está associada à lesão renal (nefrite) em pacientes portadores de lúpus eritematoso sistêmico. Esta pesquisa está sendo realizada pelo Serviço de Reumatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Se você aceitar participar da pesquisa, os procedimentos envolvidos em sua participação são os seguintes: coleta de cerca de 20 mL de urina (equivalente a um frasco de coleta) para análise da molécula VCAM-1, além da amostra de urina para realização dos exames de rotina; responder um questionário a respeito de seu estado de saúde, doenças que você saiba ter, medicações em uso e perfil psicossocial. Você levará cerca de 5 minutos para responder a este questionário. A coleta de urina e a aplicação do questionário serão repetidos a cada consulta de rotina ambulatorial, no período de 18 meses, não sendo necessário comparecer ao hospital apenas para a participação na pesquisa. Além disso, será feita consulta ao seu prontuário para verificação de resultados dos exames laboratoriais de rotina. Não será necessária coleta de sangue em maior volume para a realização da pesquisa.

O número de amostras coletadas variará de acordo com o número de visitas ambulatoriais de cada paciente, sendo que o intervalo entre as visitas seguirá a indicação médica. São previstas um mínimo de 3 e um máximo de 6 análises por paciente ao longo do estudo.

Não são conhecidos riscos pela participação nesta pesquisa. Porém, você poderá ter algum desconforto referente ao tempo de resposta ao questionário (cerca de 5 minutos) e a coleta de amostra de urina.

Você não terá nenhum benefício direto participando deste estudo, mas o conhecimento obtido através deste trabalho poderá beneficiar no futuro outras pessoas que apresentem esta doença.

Sua participação na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é obrigatória. Caso você decida não participar, ou ainda, desistir de participar e retirar seu consentimento, não haverá nenhum prejuízo ao

atendimento que você recebe ou possa vir a receber na instituição.

Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela sua participação na pesquisa e você não terá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos.

Caso ocorra alguma intercorrência ou dano, resultante de sua participação na pesquisa, você receberá todo o atendimento necessário, sem nenhum custo pessoal.

Os dados coletados durante a pesquisa serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados serão apresentados de forma conjunta, sem a identificação dos participantes, ou seja, o seu nome não aparecerá na publicação dos resultados. Após o término da pesquisa e realização das análises, o material armazenado será desprezado.

Caso você tenha dúvidas, poderá entrar em contato com o pesquisador responsável, Odirlei André Monticelo, pelo telefone (51) 33598340, com a pesquisadora Andrese Aline Gasparin, pelo telefone (51) 33597662 ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pelo telefone (51) 33597640, ou no 2º andar do HCPA, sala 2227, de segunda à sexta, das 8h às 17h.

Esse Termo é assinado em duas vias, sendo uma para o participante e outra para os pesquisadores.

---

Nome do participante da pesquisa

---

Assinatura

---

Nome do responsável legal (quando indicado)

---

Assinatura

---

Nome do pesquisador

---

Assinatura

Local e Data: \_\_\_\_\_

**ANEXO VI. The systemic lupus erythematosus disease activity index 2000  
(SLEDAI-2k)**

Nome: \_\_\_\_\_ Registro: \_\_\_\_\_  
Número da visita: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

(Pontuar se o descritor estiver presente no momento da visita ou dentro dos últimos 30 dias)

PESO	SLEDAI	DESCRIPTOR	DEFINIÇÃO
8	_____	<b>Convulsão</b>	Excluídas causas infecciosas, metabólicas ou drogas
8	_____	<b>Psicose</b>	Alteração na função em atividades normais causada por distúrbio grave na percepção da realidade. Alucinações, incoerência, dissociação, conteúdo do pensamento empobrecido, pensamento ilógico, bizarro, desorganizado ou comportamento catatônico. Excluído uremia e drogas
8	_____	<b>Síndrome cerebral orgânica</b>	Função mental alterada com prejuízo na orientação, memória ou outras funções intelectuais, com rápido início de características clínicas flutuantes, incapacidade de manter a atenção ao ambiente, mais pelo menos 2 dos seguintes: distúrbio de percepção, discurso incoerente, insônia
8	_____	<b>Distúrbio visual</b>	Alterações retinianas de LES, incluindo: corpos cytoides, hemorragias retinianas, exsudatos serosos ou hemorragias na coróide ou neurite óptica. Excluir hipertensão, infecção ou drogas
8	_____	<b>Alteração em nervo craniano</b>	Novo início de neuropatia sensitiva ou motora envolvendo nervos cranianos
8	_____	<b>Cefaleia lúpica</b>	Cefaleia grave e persistente, ode ser migrânea, mas não deve ser responsiva a analgésicos narcóticos
8	_____	<b>AVE</b>	Novo início de acidente(s) cerebrovascular(es). Excluir arteriosclerose
8	_____	<b>Vasculite</b>	Ulceração, gangrena, infartos periungueais, biópsia ou angiografia confirmando vasculite
4	_____	<b>Artrite</b>	≥ 2 articulações com dor e sinais de inflamação (sensibilidade, derrame, edema)
4	_____	<b>Miosite</b>	Fraqueza muscular proximal, associada com elevação de CK/aldolase ou alterações na ENMG ou Bx mostrando miosite
4	_____	<b>Cilindros urinários</b>	Cilindros urinários granulares ou hemáticos
4	_____	<b>Hematúria</b>	>5 hemácias/campo de grande aumento. Excluir nefrolitíase, infecção ou outras causas (> 34,4 hc no nosso EQU)
4	_____	<b>Proteinúria</b>	>0,5g/24 horas ou IPC>0,5
4	_____	<b>Leucocitúria</b>	>5 leucócitos/campo de grande aumento. Excluir infecções (>38,4 leuc no nosso EQU)
2	_____	<b>Eritema</b>	Eritema inflamatório
2	_____	<b>Alopecia</b>	Perda de cabelo anormal difusa ou em áreas localizadas
2	_____	<b>Úlceras mucosas</b>	Úlceras orais ou nasais
2	_____	<b>Pleurite</b>	Dor torácica pleurítica com atrito pericárdico, derrame ou espessamento pleural
2	_____	<b>Pericardite</b>	Dor pericárdica com pelo menos 1 dos seguintes: atrito, derrame ou confirmação por ECG ou ecocardio
2	_____	<b>Complementos baixos</b>	CH50, C3 ou C4 abaixo do valor de referência
2	_____	<b>Anti-dsDNA positivo</b>	Presença de anti-dsDNA
1	_____	<b>Febre</b>	>38°C, excluindo infecção
1	_____	<b>Trombocitopenia</b>	<100 mil plaquetas, excluindo drogas
1	_____	<b>Leucopenia</b>	<3.000 leucócitos, excluindo drogas

SLEDAI-2K TOTAL: \_\_\_\_\_

SLEDAI RENAL: \_\_\_\_\_

### ANEXO VII. The renal systemic lupus activity measure revised renal (rSLAM-R)

Nome: \_\_\_\_\_ Registro: \_\_\_\_\_  
 Número da visita: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

Medidas de atividade do LES (Sobre o último mês)

	0	1	2	3	
Creatinina sérica ou clearance	0,5-1,3mg/dL ou 80-100% CrCl	1,4-2 mg/Dl ou 79-60%CrCl	2,1-4 mg/dL ou 30-59%CrCl	>4 mg/dL Ou <30%CrCl	<input type="checkbox"/>
(incluir no rSLAM-R apenas se houver alteração concomitante de sedimento urinário)					
	0	1	2	3	
Sedimento urinário		>5 hemác e/ou leuc/hpf (34,8 hc/μL ou 38,4 leuc/μL) e/ou 0 a 1-3 cilindros celulares ou granulares e/ou 1-2+ proteinúria e/ou <500 mg/L proteinúria de 24h	>10 hemác e/ou leuc /hpf (61,4 hc/μL ou 65,7 leuc/μL e/ou >3 cilindros celulares ou granulares e/ou 3-4+ proteinúria e/ou 500mg/L-3,5 g/L proteinúria de 24h	>25 hemác e/ou leuc/hpf (142,4 hemac/μL ou 147,7 leuc/μL)e/ou cilindros hemáticos ou e/ou >4+ proteinúria e/ou >3,5 g/L proteinúria de 24h	<input type="checkbox"/>

rSLAM-R: \_\_\_\_\_

Fellows of Harvard College. SLE Activity Measure-Revised (SLAM-R), 1998, Revised July 1991

### ANEXO VIII. Systemic lupus international collaborating clinics renal activity/response exercise (SLICC renal)

Proteinúria	0,5 -1 gm/dia <b>3 pontos</b>	>1-3 gm/dia <b>5 pontos</b>	>3 gm/dia <b>11 pontos</b>	<input type="checkbox"/>
Hematúria		≥5 hc/campo ou ≥ 34,4/uL <b>3 pontos</b>		<input type="checkbox"/>
Leucocitúria		≥5 leuc/campo ou ≥38,4/uL <b>1 ponto</b>		<input type="checkbox"/>

**SLICC RENAL:** \_\_\_  ≥ 4  <4



**ANEXO IX. The systemic lupus international collaborating clinics/American  
College of Rheumatology damage index (SLICC/ACR damage index)**

Nome: \_\_\_\_\_  
 Registro: \_\_\_\_\_ Número da visita: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

(Dano ocorrido desde o diagnóstico de LES determinado pela avaliação clínica e presente por pelo menos 6 meses. Episódios repetidos necessitam pelo menos de 6 meses de intervalo entre eles e devem ser pontuados como 2. A mesma lesão não pode ser pontuada 2 vezes)

ITEM	ESCORE (circular)	
<b>OCULAR</b> (qualquer olho, por avaliação clínica)		
Catarata	0	1
Retinopatia ou atrofia óptica	0	1
<b>NEUROPSIQUIÁTRICO</b>		
Déficit cognitivo (déficit de memória, dificuldades com cálculos, pouca concentração, dificuldade de falar ou de escrever) OU psicose maior	0	1
Convulsões (necessitando tratamento por 6 meses)	0	1
AVC em qualquer época (se > 1 escore 2)	0	1 2
Neuropatia craniana ou periférica (exclui óptica)	0	1
Mielite transversa	0	1
<b>RENAL</b>		
DCE estimada ou medida < 50%	0	1
Proteinúria >3,5g/ 24h OU Doença renal em estágio final (independente se diálise ou transplante)	0	1 3
<b>PULMONAR</b>		
Hipertensão pulmonar (ventrículo direito proeminente ou B2 hiperfonética)	0	1
Fibrose pulmonar (clínico e radiográfico)	0	1
Pulmão encolhido (Rx)	0	1
Fibrose pleural (Rx)	0	1
Infarto pulmonar (Rx) ou ressecção exceto por malignidade	0	1
<b>CARDIOVASCULAR</b>		
Angina OU bypass arterial coronariano	0	1
IAM em qualquer época (se > 1 escore 2)	0	1 2
Cardiomiopatia (disfunção ventricular)	0	1
Doença valvular (sopros >3+/6+)	0	1
Pericardite por 6 meses ou pericardiectomia	0	1
<b>DOENÇA VASCULAR PERIFÉRICA</b>		
Claudicação por 6 meses	0	1
Perda menor de tecido (polpas digitais)	0	1
Perda significativa de tecido (dedo ou membro) (se > 1 escore 2)	0	1 2
Trombose venosa com ulceração, edema OU estase venosa	0	1
<b>GASTROINTESTINAL</b>		
Infarto ou ressecção do intestino (abaixo do duodeno), fígado, baço ou VB em qualquer ocasião (se > 1 sítio, escore 2)	0	1 2
Insuficiência mesentérica	0	1
Peritonite crônica	0	1
Constricção OU cirurgia TGI superior em qualquer ocasião	0	1
Insuficiência pancreática exigindo reposição enzimática ou com pseudocisto	0	1
<b>MUSCULOESQUELÉTICO</b>		
Atrofia ou fraqueza muscular	0	1
Artrite deformante ou erosiva (incluindo deformidades redutíveis e excluindo necrose avascular)	0	1
Osteoporse com fratura ou colapso vertebral (excluindo necrose avascular)	0	1
Necrose avascular (se > 1 escore 2)	0	1 2
Osteomielite	0	1
Ruptura de tendão	0	1
<b>PELE</b>		
Alopecia crônica cicatricial	0	1
Extensa cicatrização ou panículo (exceto em couro cabeludo ou polpa digital)	0	1
Ulceração cutânea (excluindo trombose) por período maior que 6 meses	0	1
<b>INSUFICIÊNCIA GONADAL PREMATURA</b>	0	1
<b>DIABETES</b> (independente do tratamento)	0	1
<b>MALIGNIDADE</b> (exceto displasia) (se > 1 sítio, escore 2)	0	1 2

TOTAL: \_\_\_\_\_

Arthritis & Rheumatism. 1997;40(5): 809-13

**ANEXO X. Declaração STROBE (Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology) - checklist of items that should be included in reports of observational studies**

	<b>Item No</b>	<b>Recommendation</b>
<b>Title and abstract</b>	1	(a) Indicate the study's design with a commonly used term in the title or the abstract (b) Provide in the abstract an informative and balanced summary of what was done and what was found – <b>Pág. 113 e 114</b>
<b>Introduction</b>		
Background/rationale	2	Explain the scientific background and rationale for the investigation being reported – <b>Pág. 114-116</b>
Objectives	3	State specific objectives, including any prespecified hypotheses – <b>Pág. 64; Pág. 116</b>
<b>Methods</b>		
Study design	4	Present key elements of study design early in the paper – <b>Pág. 116-117</b>
Setting	5	Describe the setting, locations, and relevant dates, including periods of recruitment, exposure, follow-up, and data collection – <b>Pág. 116-118</b>
Participants	6	(a) <i>Cohort study</i> —Give the eligibility criteria, and the sources and methods of selection of participants. Describe methods of follow-up – <b>Pág 117</b> <i>Cross-sectional study</i> —Give the eligibility criteria, and the sources and methods of selection of participants (b) <i>Cohort study</i> —For matched studies, give matching criteria and number of exposed and unexposed
Variables	7	Clearly define all outcomes, exposures, predictors, potential confounders, and effect modifiers. Give diagnostic criteria, if applicable – <b>Pág.116</b>
Data sources/ measurement	8*	For each variable of interest, give sources of data and details of methods of assessment (measurement). Describe comparability of assessment methods if there is more than one group – <b>Pág. 117 -119</b>
Bias	9	Describe any efforts to address potential sources of bias – <b>Pág.117</b>
Study size	10	Explain how the study size was arrived at – <b>Pág. 116</b>
Quantitative variables	11	Explain how quantitative variables were handled in the analyses. If applicable, describe which groupings were chosen and why – <b>Pág.119</b>
Statistical methods	12	(a) Describe all statistical methods, including those used to control for confounding (b) Describe any methods used to examine subgroups and interactions (c) Explain how missing data were addressed (d) <i>Cohort study</i> —If applicable, explain how loss to follow-up was addressed <i>Cross-sectional study</i> —If applicable, describe analytical methods taking account of sampling strategy (e) Describe any sensitivity analyses

<b>Results</b>		
Participants	13*	(a) Report numbers of individuals at each stage of study—eg numbers potentially eligible, examined for eligibility, confirmed eligible, included in the study, completing follow-up, and analysed
<b>Pág. 120</b>		(b) Give reasons for non-participation at each stage
		(c) Consider use of a flow diagram
Descriptive data	14*	(a) Give characteristics of study participants (eg demographic, clinical, social) and information on exposures and potential confounders
<b>Pág. 120-121</b>		(b) Indicate number of participants with missing data for each variable of interest
		(c) <i>Cohort study</i> —Summarise follow-up time (eg, average and total amount)
Outcome data	15*	<i>Cohort study</i> —Report numbers of outcome events or summary measures over time
<b>Pág. 121-124</b>		<i>Cross-sectional study</i> —Report numbers of outcome events or summary measures
Main results	16	(a) Give unadjusted estimates and, if applicable, confounder-adjusted estimates and their precision (eg, 95% confidence interval). Make clear which confounders were adjusted for and why they were included
<b>Pág. 124-126</b>		(b) Report category boundaries when continuous variables were categorized
		(c) If relevant, consider translating estimates of relative risk into absolute risk for a meaningful time period
Other analyses	17	Report other analyses done—eg analyses of subgroups and interactions, and sensitivity analyses
<b>Discussion</b>		
Key results	18	Summarise key results with reference to study objectives – <b>Pág. 126</b>
Limitations	19	Discuss limitations of the study, taking into account sources of potential bias or imprecision. Discuss both direction and magnitude of any potential bias – <b>Pág. 129</b>
Interpretation	20	Give a cautious overall interpretation of results considering objectives, limitations, multiplicity of analyses, results from similar studies, and other relevant evidence – <b>Pág. 127-129</b>
Generalisability	21	Discuss the generalisability (external validity) of the study results
<b>Other information</b>		
Funding	22	Give the source of funding and the role of the funders for the present study and, if applicable, for the original study on which the present article is based – <b>Pág.130</b>