RITA DE CASSIA ALVES SIQUEIRA

A importância da Contraimunoeletroforese na detecção de antígenos nucleares extraíveis SS-A/Ro e SS-B/La para diagnóstico de doença reumática sistêmica.

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Patologia, Área de Concentração em Patologia, para a obtenção do título de Mestre, da Faculdade de Medicina-UNESP de Botucatu.

Orientador: Dr. **JULIO DEFAVERI**

BOTUCATU

2001

RITA DE CASSIA ALVES SIQUEIRA

A importância da Contraimunoeletroforese na detecção de antígenos nucleares extraíveis SS-A/Ro e SS-B/La para diagnóstico de doença reumática sistêmica.

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Patologia, Área de Concentração em Patologia, para a obtenção do título de Mestre, da Faculdade de Medicina-UNESP de Botucatu.

Orientador: Dr. **JULIO DEFAVERI**

BOTUCATU

2001

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SULAMITA SELMA CLEMENTE COLNAGO

Siqueira, Rita de Cássia Alves
A importância da contraimunoeletroforese na detecção de antígenos nucleares extraíveis SS-A/Ro e SS-B/La para diagnóstico de doença reumática sistêmica. / Rita de Cássia Alves Siqueira – 2001.

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2001.
Orientador: Júlio Defaveri

1.Reumatismo - Diagnóstico

CDD 616.991075

Palavras-chave: Contraimunoeletroforese; SS-A/Ro; SS-B/La; Auto-anticorpos; Doença autoimunes; Testes sorológicos.

“Três paixões, simples mas irresistivelmente fortes governam minha vida: o desejo imenso de amar, a procura do conhecimento e a insuportável compaixão pelo sofrimento da humanidade”.

Bertrand Russel

AGRADECIMENTO

AO DR. JULIO DEFAVERI, QUE COM GRANDE AMOR EXERCE SEU TRABALHO, E COM PACIÊNCIA, DEDICAÇÃO E AMIZADE ORIENTOU-ME PARA ALCANÇAR SUCESSO NESTA ETAPA TÃO IMPORTANTE DE MINHA VIDA.

"O pensamento voa e as palavras vão a pé: eis o drama do escritor."

Julie Green

A DEUS

Pelo dom da vida, sabedoria e livre arbítrio que nos deu para que possamos escolher o melhor caminho.

"Penso 99 vezes e nada descubro; deixo de pensar, mergulho no silêncio e eis que a verdade se revela."

Albert Einstein

Aos Professores Marcello F. Franco, Denise Fecchio, Ângela Maria V. C. Soares, Maria Terezinha S. Peraçoli e Paulo G. Leser, que com sua sabedoria conseguem transmitir conhecimento para o enriquecimento docente.

À Dra. Heloísa Bonfá e a Cleonice pelo acolhimento durante o estágio realizado no Laboratório de Reumatologia (USP-SP).

À Dra. Elenice Deffune e funcionários do Hemocentro da UNESP de Botucatu por coletar os soros de doadores.

À Dra. Patrícia Medeiros Rocha pela amizade e disponibilidade nas revisões.

Aos funcionários da biblioteca da Unesp de Botucatu em especial à Cássia e Meire que prontamente auxiliaram na revisão bibliográfica.

Aos funcionários do Laboratório de Cirurgia Experimental em especial à Maria Clara e Maria Helena pela disponibilidade na coleta do baço de cão.

Aos funcionários Gastão Chamma e Marino Alves que orientaram na padronização das técnicas de contraimunoeletroforese e cromatografia de troca iônica.

Aos funcionários do Laboratório de Imunopatologia Laura Ferrari, Claudinei Figueira e em especial à Izaíra M. C. Prudente e Maria Isabel Correa pelo auxílio no preparo do antígeno e seleção de soros.

Ao funcionário Carlos César Ramos responsável pelas fotos e slides.

Aos amigos de curso de pós-graduação Moisés, Valéria, Sílvio, Tânia, Soraya, Lízia, Luciana, Ana Lúcia, Carla, Fernanda e Wilson pela amizade e dedicação.

Aos amigos de sempre Kátia, Rosalina, Rafael, Roberto, Rosana, Paulo, Regina, Graciela, Jorge, Márcia e Denise que deram apoio e carinho nos momentos em que mais precisava.

Aos meus pais Agnelo e Maria por serem os responsáveis pela minha razão de viver, pelo amor e carinho.

Aos meus padrinhos Nelça e Narciso e aos meus sobrinhos João Paulo, Giovanna e Fernanda que me acolheram em sua casa com amor e carinho.

À toda minha família em especial aos meus irmãos José, Ovídia, Alírio, Nelça, Izenar, Ismar, Maria de Jesus, Orlando, Maria Aparecida, Georgina e Donisete, pelo apoio, compreensão, carinho e dedicação. Sentimentos que elevam e restitui o ânimo a cada conquista alcançada.

Ao CAPES pela bolsa de auxílio à pesquisa.

À todos os pacientes e doadores que participaram deste trabalho.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO 1

1. Doenças autoimunes 1

2. Antígenos SS-A/Ro e SS-B/La 5

3. Testes Sorológicos para detecção de autoanticorpos 14

4. A contraimunoeletroforese 21

OBJETIVOS 26

CASUÍSTICA E MÉTODOS 27

1. Casuística 27

2. Métodos 28

2.1-Contraimunoeletroforese 28

2.1.1-Extração do antígeno 28

2.1.2-Cromatografia de troca iônica 29

2.1.3-Lâmina agarose- 1ª camada 29

2.1.4-Lâmina agarose para contraimunoeletroforese 30

2.2-Imunofluorescência Indireta para Fator Anti-Núcleo (FAN) 31

2.3-Imunofluorescência para anti-DNA 32

2.4-ELISA para anti-RNP e anti-Sm 32

2.5-ELISA para anti-SS-A/Ro e anti-SS-B/La 33

RESULTADOS 34

1. Casuística 34

2. Testes sorológicos 35

DISCUSSÃO 41

RESUMO 49

ABSTRACT 51

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 53

APÊNDICE 67

1. Soluções e reagentes 67

2.Tabelas de resultados 68

ÍNDICE TABELAS, QUADROS E FIGURAS

Introdução

Tabela 1.	Auto-anticorpos anti-nucleares e citoplasmáticos; autoantígenos respectivos; sinonímia; localização celular; doenças reumáticas associadas e freqüência de aparecimento.	3
Tabela 2.	Os principais trabalhos descrevendo os diferentes estudos relativos aos antígenos SS-A/Ro e SS-B/La	7
Tabela 3.	Freqüência de auto-anticorpos anti-SS-A/Ro e anti-SS-B/La, observado no LES e SS.	11
Tabela 4.	Comparação entre os substratos de fígado de roedores e substrato de células de HEp-2, localização do antígeno e doenças apresentadas pela presença desses antígenos.	16
Quadro 1.	Doenças auto-imunes órgão-específicas e órgão-inespecíficas	2
Figura 1.	Imunofluorescência indireta para anti-DNA e principais padrões de Imunofluorescência indireta para fator-anti-núcleo (FAN).	18

Resultados

Tabela 1.	Distribuição do diagnóstico em biópsia em relação ao sexo e raça dos pacientes.	34
Tabela 2.	Freqüência dos resultados positivos dos diferentes testes por doença e porcentagem de positividade de cada teste em relação ao total de casos.	36
Tabela 3.	Tabela (2X2)- Diagnóstico “padrão” de testes.	37
Tabela 4.	Cálculo da sensibilidade e especificidade para o teste de CIE	39
Tabela 5.	Tabela de concordância entre as diferentes técnicas utilizadas para detecção de auto-anticorpos	40
Fig. 2	CIE mostrando resultado positivo com uma e duas linhas de precipitação	38

Apêndice

Tabela 1.	Dados de pacientes e resultados individuais dos testes sorológicos	68
Tabela 2.	Teste de CIE: número de casos positivos e negativos nas diferentes doenças.	69
Tabela 3.	Teste de CIE: número de casos positivos em cada titulação nas diferentes doenças	69
Tabela 4.	Comparação (positivo e negativo) entre CIE e ELISA/Ro	69
Tabela 5.	Comparação (positivo e negativo) entre CIE e ELISA/La	69
Tabela 6.	Teste de IFI-FAN: porcentagem de casos positivos em cada titulação nas diferentes doenças.	70
Tabela 7.	Teste de IFI-FAN: porcentagem de casos positivos em cada padrão de fluorescência nas diferentes doenças.	70
Tabela 8.	Teste de IFI anti-DNA: freqüência de positividade em cada diluição nas diferentes doenças.	70
Tabela 9.	Teste de ELISA-RNP: número de casos positivos e negativos em cada doença.	71
Tabela 10.	Teste de ELISA-Sm: número de casos positivos e negativos em cada doença.	71
Tabela 11.	Teste de ELISA-Ro: número de casos positivos e negativos em cada doença.	71
Tabela 12.	Teste de ELISA-La: número de casos positivos e negativos em cada doença.	72
Tabela 13.	Teste de ELISA-Ro e ELISA-RNP: Comparação entre positividade e negatividade.	72
Tabela 14.	Teste de ELISA-Ro e ELISA-Sm: Comparação entre positividade e negatividade	72
Tabela 15.	Teste de ELISA-La e ELISA-RNP: Comparação entre positividade e negatividade.	72
Tabela 16.	Teste de ELISA-La e ELISA-Sm: Comparação entre positividade e negatividade.	73
Tabela 17.	Tabela de concordância entre as diferentes técnicas utilizadas para detecção de auto-anticorpos	73

INTRODUÇÃO

1. Doença auto-imune

No sistema imune há diversos tipos de células e muitos mediadores que atuam de modo inter-relacionado e orquestrado, com objetivo de conferir proteção contra inúmeros patógenos que desafiam constantemente o organismo. Este sistema é imperfeito e não raro volta-se contra o indivíduo, agredindo-o e causando doenças. Por ser a auto-agressão o mecanismo patogenético destas doenças pelo sistema imune estas são genericamente denominadas de doenças auto-imunes (FLAVELL e col., 1999).

O sistema imune pode agredir o organismo pelos mesmos mecanismos empregados na sua defesa, ou seja, tanto a imunidade humoral quanto celular, isolada ou associadamente, estão envolvidas na patogênese das doenças auto-imunes (GORDON e col., 1994). Estes mecanismos são bem conhecidos em uma variedade de doenças humanas e muito estudados em excelentes modelos animais. Dependendo do antígeno "escolhido", a auto-agressão pode acontecer localizadamente em um órgão (órgão-específica) como nas tireoidites, ou ser disseminada (órgão-inespecífica), como na doença lúpica. Em 1900, Erlich (apud BIER, 1982) denominou esse fenômeno de auto-agressão de *horror autotoxicus*, reconhecendo-se hoje ser decorrente da perda da auto-tolerância.

O quadro 1 mostra o espectro das doenças auto-imunes, variando desde as órgão-específicas até órgão-inespecíficas (ROITT,1998).

Quadro 1 - Doenças auto-imunes órgão-específicas e órgão-inespecíficas

ÓRGÃO-ESPECÍFICAS

Tireoidite de Hashimoto
Anemia perniciosa
Doença de Addison
Diabetes mellitus insulina-dependente
Síndrome de Goodpasture
Miastenia grave
Pênfigo vulgar
Anemia hemolítica auto-imune
Cirrose biliar primária
Hepatite crônica ativa (HbsAg neg)
Síndrome de Sjögren
Artrite reumatóide
Dermatomiosite
Esclerodermia
Doença do tecido conjuntivo misto
Lúpus eritematoso discóide

ÓRGÃO-INESPECÍFICAS

Adaptado: ROITT e col., 1998.

Os anticorpos circulantes observados nas doenças auto-imunes se caracterizam por apresentar especificidade para diversos constituintes do citoplasma e/ou do núcleo das células (CLEGG e col.., 1991, KURIEN e col., 2000). A Tabela 1 descreve os diferentes antígenos nucleares e citoplasmáticos, e sua sinonímia, contra os quais são freqüentemente produzidos os auto-anticorpos detectados nas doenças reumáticas.

Tabela 1. Auto-anticorpos contra antígenos nucleares e citoplasmáticos, respectiva sinonímia, localização celular dos antígenos, doenças reumáticas associadas e freqüência de aparecimento dos auto-anticorpos nas diferentes doenças.

Anticorpo (anti)	Antígeno	Sinonímia	Localização celular	Doença	%
DNA	DNAn	DNA ds	núcleo	LES	40
Histona	Histona	-	núcleo	LES LID	>95 >90
DNA	DNA-Histona	-	núcleo	LES	>90
RNP	Proteína-RNA	U1-RNP	núcleo	LES DMTC ESP	30 95 10
Sm	Proteína-RNA	-	núcleo	LES	30
Ro	Proteína-RNA	SS-A	núcleo citoplasma	SS LES	60 35
La	Proteína-RNA	SS-B	núcleo	SS LES	40 15
Scl 70	DNA-Topoisomerase I	Scl 70	núcleo	ESP Difuso	70
Jo 1	Hist-RNAt Sintetase	-	citoplasma	Polimiosite	30
Centrômero	Proteínas-Centroméricas + DNA	-	núcleo	CREST	>90

Adaptado: LESER, 1995

Abreviações: DNAn: DNA nativo; ESP: esclerose sistêmica progressiva; his: histidil; LES: Lúpus eritematoso sistêmico; LID: lúpus induzido por Drogas; RNAt: RNA transportador; síndrome CREST: Calcinose, fenômeno de Raynaud, dismotilidade esofageana, esclerodactilia e telangiectasia; SS: Síndrome de Sjögren.

Como mostrado na Tabela 1, vários antígenos de localização nuclear e citoplasmática foram descritos nas doenças auto-imunes (MONESTIER, 1996). Os mais freqüentes são os antígenos nucleares, e devido ao processo usado para purificá-los, são denominados de "antígenos nucleares extraíveis", sinonímia mais comumente representada pela sigla ENA (*E*xtractable *N*uclear *A*ntigens) (MATTIOLI e col., 1974 e NISHIKAI e col.,1980).

2. Antígenos SS-A/Ro e SS-B/La

A Tabela 2 lista os principais trabalhos descrevendo os diferentes estudos relativos aos antígenos SS-/Ro e SS-B/La.

Um dos primeiros informes sobre a ocorrência dos antígenos SS-A/Ro e SS-B/La foi o trabalho JONES, em 1958, que detectou anticorpos em soros de pacientes com síndrome de Sjögren (SS) contra extrato de glândulas salivares. Posteriormente, ANDERSON e col., (1961, 1962) e BECK e col., (1965), ratificaram a presença destes anticorpos em pacientes com outras doenças reumáticas (LES, AR, ES, SSp), os quais foram denominados SjD e SjT. Observaram que eram bioquimicamente diferentes, pois, a antigenicidade de SjD não era afetada por nucleases ou proteases enquanto a antigenicidade de SjT, embora resistente a DNase e RNase, era destruída pela tripsina.

CLARCK e col. (1969), utilizando soros de paciente com LES, observaram que estes antígenos também estavam presentes em vários tecidos humanos (fígado, rim, e baço). Estes autores denominaram os dois antígenos de Ro e La, iniciais dos nomes dos dois pacientes estudados.

Em 1975, ASPAUGH e TAN descreveram dois antígenos nucleares extraídos da linhagem de células humanas Wil-2, que precipitavam na presença de soro de pacientes com LES e SS, os quais foram denominados de SS-A e SS-B. O mesmo autor em 1979 demonstraram que o antígenos

SS-A e o Ro e SS-B e o La eram idênticos. Desde então, convencionou-se denominar estes antígenos de SS-A/Ro e SS-B/La .

Os vários trabalhos da literatura (Tabela 2) mostram que os antígenos SS-A/Ro e SS-B/La apresentam diferentes características de localização, composição bioquímica e imunológica (KRAUTHAMER e col.,1996 e WAHREN-HERLENIUS e col., 1999). Estes antígenos estão localizados principalmente no núcleo, e com menos freqüência, no citoplasma (CLARK, 1969; ASPAUGH e col., 1975 e 1979), estando presentes nos tecidos de diversos órgãos humanos como: fígado, rim, glândula salivar e lacrimal e baço (CLARK, 1969; MATTIOLI e col., 1974) e de animais como: baço (cão, porco, boi), fígado (rato e camundongo) e timo (coelho) (HARMON e col.,1984 e NAKAMURA e col., 1985 e KAPOGIANNIS, 2000).

Quanto a caracterização molecular, LERNER e col. (1979, 1981) demonstraram que o autoantígeno SS-A/Ro é constituído por complexo protéico e RNA. Em 1984, WOLLIM & STEITZ, utilizando como substrato célula HeLa, uma linhagem de células humanas, observaram que o componente protéico da ribonucleoproteína (RNP) SS-A/Ro está associado a uma de quatro pequenas moléculas de RNAs, variando de 84 a 112 bases, designadas hY-RNAs (hY1-2, hY3, hY4 e hY5; h= human, Y= cYtoplasmic). Estes autores observaram ainda que a atividade antigênica do SS-A/Ro é aparentemente independente do RNA, visto que o anticorpo se ligava apenas à porção protéica do antígeno, não reconhecendo hYRNAs isoladamente. Ao contrário, BOIRE & CRAFT (1989) descreveram uma subpopulação de auto-anticorpos anti-SS-A/Ro que reconheciam o complexo RNP-hY5-RNA, mas não reconheciam a porção protéica ou hY5-RNA isoladamente. Na mesma linha, VENABLES e col. (1983) purificaram o antígeno SS-A/Ro de baço humano, utilizando auto-anticorpos anti-SS-A/Ro monoespecíficos. O antígeno purificado migrou como único polipeptídeo de 55 KDa na eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE). Usando cromatografia de imunoafinidade, YAMAGATA e col., 1984, purificaram e caracterizaram o antígeno SS-A/Ro e desenvolveram a técnica enzimunoenzimática (ELISA) para sua detecção. Neste estudo, descreveram o antígeno SS-A/Ro como proteína com peso molecular de 60 KDa. Posteriormente, outros trabalhos

introduziram aperfeiçoamentos e novos procedimentos que melhoraram a extração, purificação e caracterização do antígeno SS-A/Ro (ELKON e col.,1984 e KUMAGAI e col.,1991).

O peso molecular da RNP SS-A/Ro foi estimado através do método de gel-filtração ser entre 100 e 150 KDa (CLARCK e col., 1969 e SCOPELITIS e col., 1980). Alguns autores, utilizando *immunoblotting* (IB) e imunoprecipitação (IP) estimaram que o peso molecular do componente protéico do antígeno SS-A/Ro variava de 50 a 60 KDa (VENABLES e col., 1983; WOLIN e col., 1984; e LIEU, 1984), variação esta provavelmente devido às diferentes metodologias empregadas. Posteriormente, ficou definido por diferentes autores que o SS-A/Ro é composto por um polipeptídeo de 60 KDa.

Em estudos iniciais, verificou-se que anticorpos anti-SS-A/Ro eram direcionados contra RNP constituída de um único polipeptídeo antigênico de 60 KDa associado a hY-RNAs. Posteriormente, BEN-CHETRIT e col. (1988), demonstraram que anticorpos anti-SS-A/Ro também reconheciam outro peptídeo de 52 KDa associado aos mesmos hY-RNAs do polipeptídeo de 60 KDa, mostrando, também, que estas duas proteínas estão associadas numa estrutura complexa. Assim, utilizando IB com anticorpos monoespecíficos, esses autores demonstraram que a molécula de 52 KDa não é produto de degradação bem como não é modificação pós-tradução da molécula de 60 KDa ou do antígeno SS-B/La de 48 KDa, e caracterizaram os

anticorpos anti-SS-A/Ro com especificidades distintas ao reagirem separadamente com as proteínas de 60 KDa e 52 KDa. Os vários estudos sugerem que o polipeptídeo de 52 KDa é componente do SS-A/Ro, podendo estar associado, na forma de complexo, com o polipeptídeo de 60 KDa (WAHREN e col., 1992). A proteína de 52 KDa pode interagir diretamente com a de 60 KDa ou as proteínas de 60 e 52 KDa podem, separadamente, se associar com as hY-RNAs (CHAN e col., 1991, SLOBBE e col., 1991, BOZIC e col., 1994.

CHAN e col. (1990) foram os primeiros a clonar e seqüenciar o DNAc da proteína SS-B/La 52 KDa, e mostraram que esta é diferente da proteína de 60 KDa. Na proteína de 52 KDa, constituída de 475 aminoácidos, foram identificados os seguintes sítios funcionais: um domínio *zinc finger*, na extremidade aminoterminal, provavelmente responsável pelo reconhecimento de RNA ou DNA, e um domínio *leucine zipper*, na região central da proteína, com potencial para dimerização intermolecular (CHAN e col.,1990; CHAN e col.,1991).

Quanto ao antígeno SS-B/La ele é composto por duas proteínas, de 48 e 50 KDa, que se ligam a fator de transcrição de RNA Polimerase III como parte do seu processo de maturação (RADER e col.,1983, NYMAN e col.,1989; RINKE e col.,1982,). A proteína La pode se ligar transitoriamente à partículas de proteínas SS-A/Ro (GOTTLIEB e col.,

1989 (a); GOTTLIEB e col., 1989 (b); BOIRE e col., 1991; SIMONS e col.,1994).

Anticorpos contra os antígenos ribonucleoprotéicos SS-A/Ro e SS-B/La são geralmente encontrados em diferentes proporções em pacientes com doença reumática como observado na Tabela 3.

Tabela 3. Freqüência de auto-anticorpos anti- SS-A/Ro e SS-B/La observado no (LES) e Síndrome de Sjögren (SS).

Designação clínica	Identidade Molecular	Freqüência (%)		Referência
		SS	LES	
SS-A/Ro	Proteínas de 52 e 60 KDa, complexadas com Y1-Y5 RNAs	50-90	30-50	MATTIOLI (1974); ASPAUGH (1975); YAMAGATA (1984); LIEU (1984). FRANCO (1981). D'CRUZ (1992)
SS-B/La	Fosfoproteína, 48 e 50 KDa, complexadas com RNA polimerase III trancriptase	35-85	15	LERNER (1981) RINKE (1982) REDDY (1983) BEN-CHERIT (1988) CHAN (1982)

Adaptado: TAN, 1989

A prevalência de anticorpos anti-Ro varia de 50 a 90% em pacientes com síndrome de Sjögren (SS) (dependendo do método usado para detectá-los e o critério usado para definir a doença), de 30 a 50% em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES) e de 20 a 30% em pacientes com artrite reumatóide (AR) (TZIOUFAS e col., 1998 e MADDISON, 1994).

Semelhantemente, anticorpos anti-La também são encontrados em pacientes com Síndrome de Sjögren em proporção variável, dependendo do teste utilizado. Assim, o teste de imunoprecipitação detecta 35% dos pacientes, e o teste de ELISA em 85% dos pacientes. Todavia, anticorpos anti-La são menos freqüentes no soro de pacientes com LES (15%) (TZIOUFAS e col., 1998 e MADDISON, 1994).

Em pacientes com LES os anticorpos anti-Ro estão geralmente associados com erupções cutâneas fotossensíveis e a glomerulopatia. Além disso, anticorpos anti-Ro e anti-La parecem predispor pacientes com LES ao desenvolvimento de SS. Os anticorpos atravessam a placenta e induzem em cerca de 5% dos casos ao lúpus eritematoso neonatal, o qual é caracterizado por erupções cutâneas transitórias e bloqueio cardíaco, que podem ser permanentes (VIANA e col., 1998, WHAREN-HERLENIUS e col.,1999 e CIMAZ, e col., 2000, GARCIA e col., 2000).

WAHREN e col., 1994 observaram subclasses de IgG e IgM de autoanticorpos SS-A/Ro e SS-B/La, essas observações foram feitas por WITTE e col., 2000 que estudaram em pacientes com LES, a prevalência de IgM, IgA e IgG e sua provável associação com síndrome sicca, hipergamaglobulemia, altos títulos de anticorpos, anemia, anticorpos SS-A/Ro e SS-B/La e HLA-DR3, concluindo que anti IgG e IgA estão intimamente relacionados com o fenômeno auto-imune e a alta atividade do LES. Além disso, HALSE e col. (2000) mostraram em seus estudos que há uma forte correlação entre o nível de anticorpos e inflamação local em LES e SS.

3. Testes sorológicos para detecção de auto-anticorpos

Vários métodos têm sido descritos para a detecção de auto-anticorpos. Em geral, estes métodos são utilizados em exames sorológicos para detecção de anticorpos, quais sejam, imunofluorescência indireta (IFI), imuno-citoquímica, difusão dupla, dot blot, Western blot (Wb), imunoprecipitação, ensaio imunoenzimático ELISA e a contraimunoeletroforese (CIE), (DELPECH e col.,1993, COOK,1998; BIZZARO,1998 e EGNER, 2000, BAUERFEIND & HEIDE, 1994).

Nas doenças auto-imunes, o primeiro método utilizado foi descrito por HARGRAVES em 1948 (HARGRAVES e col., 1948), na preparação do teste de célula LE. Clinicamente, os primeiros métodos de detecção de anticorpos descritos foram os testes de radioimunoensaio (RIA) para anticorpos anti-DNA dupla hélice (DNAds) (KREDICH e col., 1973) e o método de difusão dupla para detecção de vários antígenos nucleares extraíveis (ENAs), como SS-A/Ro, SS-B/La, RNP, Sm, Scl-70, Pm-Scl, e Jo-1. Anticorpos anti-ENAs e anti-DNAds são doença- específicos, tendo, portanto valor diagnóstico (MATTIOLI e col., 1974 e NISHIKAI e col., 1980).

Devido à grande dificuldade na sua padronização, a IFI tem sido utilizada quase que exclusivamente como teste de triagem para detecção de anticorpos anti-nucleares (FAN) (HOLBOROW e col., 1957, FRIOU, 1993 e JASKOWSKI, 1995). Inicialmente, IFI era feita sobre secções de fígado de rato ou rim de camundongo, e mais recentemente, têm-se obtido melhores resultados utilizando como substrato da reação células cultivadas de carcinoma de laringe humano (HEp-2) (KOZEN e col., 1980 e KERN, 2000). Como observado na Tabela 6, estes substratos contém antígenos diferentes ou ausentes como para o substrato de fígado de roedores nos quais, diferentemente das células HEp-2, não são detectados os antígenos Ro e o La.

Tabela 4. Comparação entre os substratos de fígado de roedores e substrato de células de HEp-2, localização e caracterização dos antígenos e doenças nas quais são observados.

Padrão	Substrato fígado	Substrato HEp-2	Antígeno	Doença
Periférico	núcleo	núcleo	DNAn	LES
Homogêneo	núcleo	núcleo	histona,DNAn	LID,LES,AR
Salpicado/ Pontilhado	núcleo	núcleo	Sm RNP La	LES DMTC,LES,ESP SS,LES
Salpicado/ Pontilhado	ausente	núcleo	Ro, La	SS,LES
Nucleolar	nucléolo	nucléolo RNA	nucleolar	ESP,LES,SS
Centromérico	ausente	núcleo	centrômero	CREST
Citoplasmático	ausente	citoplasma	RNAr Ro his-RNAt sintetase	LES LES,SS Polimiosite
PCNA	ausente	núcleo	PCNA	LES

Adaptado: LESER, 1995
Abreviações: AR: Artrite Reumatóide; DNAn: DNA nativo; ESP: Esclerose Sistêmica Progressiva; his: histidil; LES: Lúpus eritematoso sistêmico ; LID: Lúpus Induzido por Drogas; PCNA: Antígeno Nuclear de Proliferação Celular; RNAr: RNA ribossomal; RNAt: RNA transportador; síndrome CREST: Calcinose, fenômeno de Raynaud, dismotilidade esofageana, esclerodactilia e telangiectasia; SS: Síndrome de Sjögren.

Células humanas cultivadas são um dos melhores substratos pois intensificam a detecção de antígenos nucleares relacionados ao ciclo celular humano. O método de IFI apresenta sensibilidade baixa quando se considera a detecção de antígenos de baixo peso molecular, como o Ro e o La. Entretanto, recentemente, linhagens de células humanas, que expressam antígenos nucleares em baixa concentração, têm sido recombinadas com seqüências de DNA capazes de superexpressarem estes antígenos nucleares,

aumentando, assim, o poder do teste (KEECH e col.,1994, McCAULIFFE e col., 1997; POLLOCK e col., 1999 e BOSSUYT e col., 2000).

A IFI também é utilizada para detecção de anticorpos anti-DNA utilizando como substrato o hemoflagelado *Crithidia luciliae.* Este teste é considerado positivo quando o cinetoplasto é corado (Figura 1. A). No caso das células de Hep-2, a positividade expressa-se sob a forma de padrões de fluorescência como especificados na Tabela 4 e ilustrados nas Figuras 1B,1C e 1D.

O método de difusão dupla foi usado por muitos anos para detecção de anticorpos anti-ENAs, porém está sendo rapidamente substituído pelo método de ELISA para a maioria dos antígenos rotineiramente testados, pois estes apresentam maior sensibilidade (WARLOW e col., 1984; SANCHES-GUERREIRO e col., 1996 e ALEM, e col., 1997, JASKOWSKI, 1996). Em alguns estudos, o método de ELISA mostrou grande número de resultados falso-negativos, indicando que o processo de purificação do antígeno deve ser feito de forma a manter todos os epítopos relevantes necessários para detectar a variedade de auto-anticorpos presentes em soros de pacientesb (WARLOW e col., 1984).

No princípio dos anos 90, começou-se a produzir kits de ELISA-ENA para diagnóstico. Embora esses testes sejam caros, começaram a ser usados, pois seu tempo de execução é menor, apresentam maior precisão e resultados menos subjetivos. Além disso, o teste pode ser realizado com pequena quantidade de soro (COOK, 1998; VILLALTA e col., 1999 e BIZZARO e col., 1999). A maior dificuldade na produção de kits de ELISA-ENA foi ultrapassada no princípio dos anos 90, quando moléculas ENAs, contendo todos os epítopos relevantes foram produzidas sinteticamente, o que aumentou muita a sensibilidade e a especificidade dos testes (KRAUTHAMER e col.,1996).

Inúmeros estudos foram publicados nos últimos anos comparando os diferentes métodos utilizados para a detecção de anticorpos ENA, como por exemplo, entre ELISA e os métodos de Cape blot, precipitação, RNA, CIE e imunoblot. Da análise destes trabalhos observa-se que não há consenso sobre o melhor método, pois em três deles concluiu-se que o método de ELISA foi mais sensível e específico, em um que a CIE foi melhor, e, em outro, que nenhum dos métodos por si só foi melhor (CHEN e col., 1992, MANOUSSAKIS e col.,1993; BRIDGES e col,1997, CHAN e col., 1999).

Os métodos western blotting (Wb) e ELISA com antígeno peptídico sintético têm sido considerados relevantes no diagnóstico clínico. Estes métodos estão ainda em fase de investigação (BARAKAT e col,1992; RICCHIUTI e col., 1994).

4. A contraimunoeletroforese.

A contraimunoeletroforese, também conhecida como eletrocinerese ou imunoeletromoforese tem sido aplicado para imunodiagnóstico de várias desordens. A técnica é caracterizada pela alta sensibilidade (até 97%-menos de 1,25 μg de anticorpo por ml pode ser detectado) e especificidade (até 95%). O risco de reação cruzada é semelhante ao da imunodifusão dupla (MENDES e col., 1994). A CIE é método amplamente usado para detecção de anticorpos em inúmeras doenças.

A CIE é uma modalidade de imunoeletroforese, e tem como princípio geral a difusão do antígeno e anticorpos em meio gel, ao qual é aplicado uma corrente elétrica. Em resumo a CIE consiste em proceder duas corridas eletroforéticas em direções perpendiculares (eletroforese bidimensional ou cruzada). Num primeiro tempo procede-se à separação dos componentes antigênicos; num segundo tempo é adicionado o anti-soro. O resultado é visualizado por linhas de precipitação como na imunodifusão dupla. A CIE, além de propiciar uma resolução maior de linhas de precipitação, presta-se admiravelmente aos estudos quantitativos, concorrendo vantajosamente com a difusão simples. Esta técnica baseia-se no arrastamento catódico de moléculas pouco carregadas, como as moléculas de imunoglobulinas. À passagem da corrente, migrando o antígeno para o anódio, encurta-se o caminho que devem percorrer os reagentes para se

encontrarem e formarem uma linha de precipitação. Conseqüentemente, o aparecimento da linha de precipitação pode ocorrer em 20 minutos, ao contrário das 12-24 horas requeridas pelas técnicas de imunodifusão dupla (BIER e col., 1982). Vários trabalhos foram realizados para aperfeiçoar a técnica de CIE, citando-se, por exemplo, o trabalho de WALRANVES e col. (1997) que conseguiram aumentar a sensibilidade e especificidade do teste ao deixar que o soro a ser testado difundisse livremente no gel por 2 horas antes da corrida eletroforética, embora este processo seja mais demorado.

Nas doenças auto-imunes, a CIE é usada para triagem de soros de pacientes com auto-anticorpos SS-A/Ro e SS-B/La. Pesquisando estes auto-anticorpos em soros selecionados, VELDHOVEN e col. (1992) desenvolveram teste de ELISA quantitativo usando como substrato proteínas recombinantes purificadas, e obtiveram sensibilidade de 98% e especificidade de 100% para anti-La, enquanto que para anti-Ro o resultado foi igual à CIE (100% de sensibilidade e especificidade). BOZIC e col. (1994) usaram a CIE para selecionar soros de pacientes com doença reumática com o objetivo de investigar diferentes regiões de epítopos das proteínas SS-A/Ro 60 KDa e 52 KDa. Estes pesquisadores observaram que dos 70 soros selecionados, 32 (46%) continham anticorpos anti-La e 38 (54%) anticorpos anti-Ro. Nenhum outro tipo de anticorpo foi encontrado pela CIE. Os anticorpos anti-Ro e anti-La foram encontrados em 28% dos pacientes com LES e em 72% dos pacientes com SS.

Alguns estudos comparativos entre a CIE e outras técnicas para detecção de auto-anticorpos SS-A/Ro e SS-B/La foram realizados. OWE-YOUNG e col. (1992) compararam a CIE com o teste de ELISA utilizando antígenos recombinantes e observaram concordância entre os dois testes em 97,4% dos casos. BONFA e col. (1993), compararam a CIE com a IFI, IDD, e Wb. Observaram que pela IFI todos os soros foram positivos, porém com alto grau de inespecificidade . A CIE foi o melhor método para a detecção do anticorpo anti-Ro. Em contrapartida, o Wb foi o método mais sensível e específico para a detecção do anticorpo anti-La, seguidos pela CIE e IDD. GONZALEZ e col. (1997) compararam a especificidade de diferentes testes comerciais (CIE, ELISA e dois testes de immunoblotting) para auto-anticorpos anti-nucleares. A IFI foi utilizada para seleção dos soros que seriam submetidos aos testes. A CIE e o teste de ELISA foram específicos para anti-RNP, Scl-70, Sm e La, porém menos específicos para anti-Ro, onde os testes de immunoblotting mostraram maior especificidade.

Um dos pontos importantes em todos os testes de detecção de anticorpos é evidentemente a utilização de antígenos adequados. Os antígenos nucleares extraíveis- ENA são geralmente obtidos de baço ou timo. WHAREN e col. selecionaram soros de pacientes para o mapeamento de epítopos de Ro 60 KDa à partir da técnica de CIE, onde o substrato era obtido de baço de macaco. Os testes usados para o mapeamento destes soros com

anti-Ro foram o imunoblot e o ELISA (WHAREN e col. , 1992; WHAREN e col. ,1999).

BOZIC e col. (1994) usaram a CIE com dois substratos diferentes: baço humano, como substrato para detecção de anticorpos anti-Ro e o timo de coelho para detecção de anti-La. Nesse trabalho, foram selecionados 40 pacientes para a localização de diferentes regiões de epítopos dos anticorpos anti-Ro 60 KDa e 52 KDa. O substrato obtido de baço de macaco também foi usado na CIE como teste seletivo de soros de pacientes na pesquisa do mapeamento de anti-Ro 52 KDa, através do teste de immunoblotting (BLANGE e col. 1994). MANOUSSAKIS e col., 1995, utilizaram a CIE para detecção de anti-SS-B/La em pacientes com artrite reumatóide, utilizando como substrato timo de coelho e de bezerro.

NAKAMURA e col. usaram uma linhagem de células-B humana para o teste de IDD na detecção de auto-anticorpos SS-A/Ro e SS-B/La. Neste trabalho, estes autores verificaram que este substrato não detectava somente anti-Ro e anti-La, mas também anti-Sm, RNP, Scl-70 e outros. Análises posteriores indicaram que os anticorpos anti-Ro e anti-La poderiam ser detectados com maior especificidade em células extraíveis como as encontradas em baço humano, de cão, de bezerro e de cobaia (NAKAMURA e col. 1985 e KAPOGIANNIS, 2000).

Da presente exposição conclui-se que a obtenção de testes mais sensíveis, específicos e de menor custo para o diagnóstico das doenças auto-imunes é objetivo ainda a ser conseguido, sendo constantes descrições na literatura de novos métodos buscando satisfazer estes objetivos (TAN e col., 1999). No presente trabalho, avaliamos o teste de contraimunoeletroforese para detecção de anticorpos anti-Ro e anti-La comparando-o com outros testes rotineiramente utilizados no diagnóstico de doença auto-imunes. Para tanto, o teste de CIE foi padronizado utilizando-se como substrato da reação antígenos extraídos de baço de cão.

OBJETIVOS

1. Padronização do antígeno de baço de cão a ser usado como substrato nos testes de contraimunoeletroforese.

2. Detectar anticorpos anti-Ro e anti-La através da técnica de contraimunoeletroforese em soro de pacientes com doença reumática sistêmica.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

1-Casuística

Para este trabalho foram estudados 40 soros de pacientes com diagnóstico por biópsia de doença reumática, enviados ao Laboratório de Imunopatologia do Departamento de Patologia / Faculdade de Medicina–UNESP, Botucatu. Todos os pacientes estudados estavam sob tratamento corticoterápico. Os dados dos pacientes e os resultados dos testes estão expressos na Tabela 1 do Apêndice.

Como controle foram utilizados 10 soros de indivíduos normais, provenientes de doadores de sangue do Hemocentro da FMB-UNESP. Estes soros passaram por uma bateria de exames sorológicos, os quais apresentaram-se todos negativos.

Todos os soros foram submetidos aos seguintes testes: IFI-FAN, IFI-DNA, ENA (Sm e RNP), ELISA-Ro, ELISA-La e CIE. Os dados referentes aos testes de ELISA e CIE foram realizados para execução deste trabalho. Os demais dados foram obtidos de nossos arquivos.

2-MÉTODOS

2.1. Contraimunoeletroforese

Para execução deste trabalho foi padronizado o antígeno extraído de baço de cão. A escolha deste substrato e sua padronização foram baseadas em testes prévios para pesquisa de auto-anticorpos realizados no laboratório de Imunopatologia, utilizando o antígeno padrão fornecido pelo Laboratório de Reumatologia-USP/SP. Diante de dificuldades em conseguí-lo, optamos por padronizá-lo. Nossa preparação foi utilizada após ser comparada com aquela fornecida pela USP e com soros padrões positivos que acompanhavam o antígeno padrão-USP. Uma vez testada a qualidade de nossa preparação antigênica, a CIE foi comparada também com o kit de ELISA específico anti-Ro e anti-La.

2.1.1. EXTRAÇÃO DO ANTÍGENO

Os baços foram obtidos de cães sadios utilizados para prática cirúrgica no Laboratório de Cirurgia Experimental-UNESP- Botucatu. Os baços foram retirados imediatamente após indução anestésica com pentobarbital sódico® (30mg/kg peso) e conservados em PBS gelado, pH-7,2. Posteriormente, o órgão foi pesado (peso médio 60 g) e macerado em 120 ml de PBS pH-7,2 gelado. A suspensão foi centrifugada em número de vezes suficiente de modo a se obter um sobrenadante límpido, assim

considerado quando não fosse mais visualizado precipitado após a última centrifugação.

2.1.2. CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA

A coluna de cromatografia foi preenchida lentamente com DEAE (vide preparo em Apêndice 1.b), e a seguir lavada por uma semana. Imediatamente após sua obtenção, o extrato de baço (item 2.1.1.) foi lentamente introduzido na coluna, e, em seqüência, a coluna foi novamente lavada com tampão inicial por 24 horas. Posteriormente a essa lavagem, foi feita a troca de tampão para um tampão de PBS a 0.5M (Apêndice 1.g.) e coletados os tubos com os devidos picos de proteínas. Finalizando, os tubos selecionados com antígenos foram dializados e liofilizados.

2.1.3. LÂMINA AGAROSE -1ª CAMADA

Uma alíquota de solução agarose 1% em água destilada (Apêndice 1.e.) foi fundida e 6 ml foi pipetado sobre o lâmina. As lâminas foram conservadas em estufa a 37º C, até secarem por completo, envolvidas em papel sulfite e guardadas em temperatura ambiente até o momento de uso.

2.1.4. LÂMINA AGAROSE PARA CONTRAIMUNOELETROFORESE (CIE)

À superfície de cada lâmina preparada como descrito no item 2.1.3. foi adicionado 8 ml de solução agarose tampão barbital (Apêndice 1.f.). Em seqüência as lâminas foram colocadas em câmara úmida e em geladeira por 30 min. Posteriormente, foram feitos orifícios no ágar com auxílio de um gabarito, e em seguida 20 µl de soro de paciente, ou controle, foi introduzido no lado catódico da lâmina e submetida a eletroforese por 30 minutos em câmara contendo solução barbital diluído 1:5 (Apêndice 1.d.) sob uma corrente de intensidade constante de 12 mA. Logo após, a lâmina foi retirada e os orifícios do lado anódio preenchidos com 20 µl do antígeno liofilizado (item 2.a.1.) (diluição a 20% em PBS pH 7.2) e novamente submetida a eletroforese com a mesma intensidade por 15 min. Posteriormente, a lâmina foi colocada em câmara úmida por uma noite e realizada uma leitura. Após, foi submersa em solução de PBS, trocando-se o tampão de duas em duas horas por três vezes. Em seqüência, a lâmina foi lavada com água destilada, envolvida em papel filtro e deixada em estufa 37°C, por uma noite. Finalizando, o papel filtro foi retirado em água corrente e imediatamente a lâmina foi introduzida em um recipiente com solução corante (Comassie Blue- 0,2%), (vide Apêndice 1.h) por 15 min e a seguir, em solução descorante, (vide Apêndice 1.i) por três seções

de cinco minutos, realizando-se uma segunda leitura. As lâminas foram lidas por dois observadores independentes.

2.2. Imunofluorescência Indireta para Fator Anti-Núcleo (FAN).

A técnica seguiu as recomendações do fabricante (IMMCO). As lâminas e os reagentes foram retirados do refrigerador 15 minutos antes do início da técnica, e rotuladas de acordo com gabarito pré-estabelecido. As amostras de soro de pacientes foram diluídas com PBS (1:20- para análise qualitativa ou em diluições subsequentes para análise quantitativa). Cada poço da lâmina foi coberto com amostras de soro diluído ou controles (20 μl do conjugado e novamente incubadas por 30 minutos em câmara úmida, protegidas da luz. Finalizando, as lâminas foram enxaguadas, acrescentando-se na última lavagem 20 μl de azul de Evans e em seguida secas. Em cada poço foi aplicado glicerina, e a lâmina coberta com lâminula. A leitura foi realizada em aumento de 200-500X.

2.3. Imunofluorescência Indireta para anti-DNA.

A técnica seguiu as recomendações do fabricante (HEMAGEN).

Os procedimentos foram semelhantes aos descritos no item 2.2, exceto que o conjugado anti-IgG+fluoresceína já se encontrava presente.

2.4. ELISA para anti-RNP e anti-Sm.

A técnica seguiu as recomendações do fabricante (HEMAGEN).

As placas para o teste foram retiradas do refrigerador e as microcavidades preenchidas com 100 µl de soro-teste, controles em diluições apropriadas, ou apenas com o diluente. As placas foram levemente agitadas para melhor distribuição das amostras, e incubadas por 45 min em temperatura ambiente. As amostras foram desprezadas e as placas lavadas 4 vezes. À seguir 100 µl de conjugado HRP foi adicionado nas cavidades e incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente. Após, o substrato foi desprezado e a placa novamente lavada por 4 vezes, seguindo adição de 100 µl de TMB nas cavidades e incubação por 10 minutos em temperatura ambiente. Finalizando, foi adicionado 50 µl de ácido sulfúrico a 1 N em cada

orifício para interrupção da reação enzimática, e a leitura feita com filtro de densidade óptica de 450 nm.

2.5. ELISA para anti-Ro e anti-La.

A técnica seguiu as recomendações do fabricante (HEMAGEN).

O procedimento foi semelhante ao descrito no item 2.4.

RESULTADOS

1. CASUÍSTICA

A Tabela 1 mostra a freqüência de pacientes em relação ao sexo, raça e diagnóstico. Dos 40 pacientes estudados, 34 eram do sexo feminino e 6 do sexo masculino, com idade variando de 8 a 80 anos, com média de 27 anos. A distribuição racial mostrou 33 brancos (28 do sexo feminino e 5 do sexo masculino) e 7 não-brancos (6 do sexo feminino e 1 do sexo masculino).

Tabela 1. Distribuição do diagnóstico em biópsia em relação ao sexo e raça dos pacientes.

CARACTERÍSTICAS		ESCL	LES	LED	SS	Total
Sexo	Feminino	2 (5%)	26 (64,5%)	2 (5%)	4 (10%)	34 (85%)
	Masculino	1 (2,5%)	3 (7,5%)	2 (5%)	-	6 (15%)
Raça	Branca	3 (7,5%)	23 (57,5%)	3 (7,5%)	4 (10%)	33 (82,5%)
	Não-branca	-	6 (15%)	1 (2,5%)	-	7 (17,5%)
	TOTAL	3 (7,5%)	29 (72%)	4 (10%)	4 (10%)	40 (100%)

ESCL: esclerodermia; LES: ; LED: lúpus eritematoso discóide; SS: síndrome de Sjögren.

Os soros normais, (quatro doadores do sexo feminino e seis do sexo masculino), foram negativos para os testes IFI- FAN e anti-DNA, ELISA- RNP/Sm e Ro/La e para a CIE.

Quanto ao diagnóstico, observou-se a seguinte distribuição: ESCL= 3 casos (7,5%), LES = 29 casos (72%), LED = 4 casos (10%) e SS = 4 casos (10%).

2. TESTES SOROLÓGICOS:

Os resultados individuais de cada teste realizado nas diferentes doenças estão expressos nas Tabelas 1 do Apêndice.

A Tabela 2 mostra resumidamente a freqüência dos resultados positivos dos testes realizados em cada doença. A maior positividade foi observada com a IFI-FAN (87,5%) e a menor com o teste anti-DNA (20%). A CIE apresentou a segunda maior freqüência de positividade, com 75% dos casos. Em todos os testes, o LES foi a doença que apresentou maior positividade.

Tabela 2- Freqüência dos resultados positivos dos diferentes testes por doença e porcentagem de positividade de cada teste em relação ao total de casos.

Diagnóstico	ESCL	LES	LED	SS	Total
CIE	3	19	3	3	**28 (70%)**
ELISA-Ro	1	13	2	1	17 (42,5%)
ELISA-La	1	10	2	1	14 (35%)
IFI-FAN	3	26	3	3	35 (87,5%)
IFI anti-DNA	-	7	1	-	8 (20%)
ELISA-RNP	-	16	1	1	18 (45%)
ELISA-Sm	-	14	1	1	16 (40%)
TOTAL CASOS (n)	3	29	4	4	40 (100%)

ESCL: esclerodermia; LES: ; LED: lúpus eritematoso discóide; SS: síndrome de Sjögren; IFI-FAN: imunofluorescência indireta para fator anti-núcleo, CIE: contraimunoeletroforese;

Pela técnica de CIE, todos os pacientes com ESCL foram positivos, dos 29 pacientes com LES 19 apresentaram positividade. Dos quatro pacientes com LED e com SS, três foram positivos pela CIE.

Os resultados pela CIE com titulação dos soros são mostrados na Tabela 3 do Apêndice. Na primeira leitura, em geral as linhas de precipitação foram melhor observadas com o auxílio de lupa. As linhas de precipitação puderam ser verificadas de forma evidente após coloração das lâminas. Podemos observar na Fig. 2A, uma lâmina com sorologia positiva, com duas linhas de precipitação e na Fig. 2B sorologia positiva, com apenas uma linha de precipitação.

Somente dois pacientes apresentaram duas linhas de precipitação. Nesta tabela encontramos treze pacientes com titulação até 1:16, observando-se a maior freqüência está nos pacientes com LES, LED e SS. Notamos também nove soros com positividade para soro não diluído.

O teste de sensibilidade e especificidade foi realizado segundo mostrado na Tabela 3.

Tabela 3 - Tabela 2x2 "padrão-ouro" para determinação de sensibilidade e especificidade.

		Positivo	Negativo	
Resultado	Positivo	VP	FP	(VP+FP)
do teste	Negativo	FN	VN	(FN+VN)
		(VP+FN)	(FP+VN)	n= VP+FP+FN+VN

Adaptado: EINSTEIN e col., 1997
Abreviações: VP indica verdadeiro positivo; FP falso positivo; FN falso negativo e VN verdadeiro negativo

A Sensibilidade foi calculada utilizando-se a fórmula: S=VP/VP+FN e a especificidade a fórmula: E= VN/VN+FP.

A Tabela 4 mostra os valores obtidos no presente trabalho para o cálculo da sensibilidade e especificidade.

Tabela 4. Cálculo da sensibilidade e especificidade para o teste de CIE.

		Positivo	Negativo	
Resultado	Positivo	28	0	(28+0)
do teste	negativo	12	10	(12+10)
		(28+12)	(10+0)	n=50

Deste modo, para a CIE obtém-se sensibilidade de 70% e especificidade de 100% para uma amostra representativa de 40 pacientes e 10 bdoadores normais (Tabela 4).

Para os testes ELISA Ro e La a sensibilidade foi de 42,5% e 35% respectivamente e a especificidade foi 100% para ambos os testes.

A Tabela 5 mostra os valores da estatística de comparação entre as diferentes técnicas utilizadas para detecção de auto-anticorpos e a CIE. Observa-se que a CIE não foi concordante com nenhuma das técnicas (ELISA/Ro, ELISA/La, ELISA/RNP, ELISA/Sm, IFI/FAN, IFI/anti-DNA).

Tabela 5- Tabela de concordância entre as diferentes técnicas utilizadas para detecção de auto-anticorpos:

TESTES	ELISA/Ro	ELISA/La	ELISA/RNP	ELISA/Sm	IFI/FAN	IFI/anti-DNA

CIE	P=0,010*	p=0,006*	p=0,009*	p=0,006*	p=0,027*	p=<0,001*

Teste McNemar:* diferença significativa entre os testes;

Na análise de concordância com todas as técnicas entre si (Tabela 17 do Apêndice) observou-se que, semelhante à CIE, a técnica de IFI-FAN não foi concordante com nenhuma técnica.

DISCUSSÃO

Anticorpos anti-nucleares têm sido utilizados por décadas para o diagnóstico e monitoramento das doenças auto-imunes (PASSALEVA e col., 1986, SHERO e col., 1986; TAN e col., 1989; CRAFT e col., 1992; DENG e col., 2000). Vários testes têm sido descritos na literatura para detectar estes anticorpos, e, constantemente são descritos novos procedimentos procurando aumentar a especificidade e sensibilidades dos testes.

Em nosso laboratório, na rotina diagnóstica das doenças reumáticas, utilizávamos o teste de IFI para fator anti-núcleo (FAN) e anti-DNA, e a IDD para ENA anti-RNP e anti-Sm. Na IFI- FAN, os substratos utilizados eram "imprints" de fígado de camundongo e corte de congelação de rim e fígado de rato. Na IDD era utilizado timo de coelho.

Atualmente sabe-se que os anticorpos anti-nucleares (AANs), apesar de serem denominados como fator anti-núcleo (FAN), não são produzidos somente contra antígenos nucleares, mas também contra estruturas existentes no citoplasma das células. A pesquisa destes fatores não está mais restrita à IFI, pois essa técnica pode não detectar alguns anticorpos, levando assim a resultados falso-negativos. Estes anticorpos podem ser detectados por

outras técnicas mais específicas como IDD, CIE e ELISA (MANOUSSAKIS e col., 1988, KRAUTHAMER e col., 1995, REICHLIN, 2000).

A IFI é o teste de triagem usado rotineiramente em nosso laboratório, utilizando como substrato as células de carcinoma de laringe humano (HEp-2), em substituição aos "imprints" e às secções de congelação de fígado e rim de roedores. Esta substituição foi necessária, pois alguns antígenos não estão presentes em células desses roedores, e, ao contrário, as células HEp-2, por estarem em constante divisão celular, apresentam estes antígenos, aumentando deste modo a sensibilidade do teste (vide Tabela 4 na INTRODUÇÃO) (BLOMBERG, 2000 e POURMAND e col., 2000).

O teste de IFI com células de HEp-2 apresentou positividade de 87 a 90% e mostrou alta sensibilidade, proporcionando padrões fluorescentes relacionados com as diferentes doenças auto-imunes, como padrão salpicado, homogêneo, nucleolar, centroméricos, PCNA (vide pg 18 e na Fig. 1B, 1C, 1D). Muitas vezes encontramos esses padrões associados, como por exemplo, salpicado e homogêneo, homogêneo e periférico ou ainda, homogêneo, periférico e salpicado. Os mais detectados em nossos testes foram os padrões salpicado e homogêneo, presentes na maioria (32,5 e 12,5 % - Tabela 7 do apêndice) dos soros de pacientes com LES.

Os anticorpos anti-DNA, descritos por HOLBOROW e col. (1957) e ROBBINS e col., (1957), são marcadores de LES e detectados através da IFI, utilizando-se como substrato o hemoflagelado *Crithidia luciliae*. Entretanto, com este substrato a positividade foi de apenas 20%. Esta baixa positividade do teste se deveu ao fato de a *C. luciliae* muitas vezes aparecer toda corada, e não apenas o cinetoplasto como desejado, tornando o resultado muito subjetivo. Este fato, aliado à grande dificuldade em se cultivar este flagelado, levou a maioria dos laboratórios a substituir este teste com grande vantagem pelo ELISA (SILVA e col., 1995, HAHN, 1998, WONG e col., 1998).

No presente trabalho, os testes de ELISA para RNP/Sm e Ro/La apresentaram resultados semelhantes, observando-se a seguinte positividade: 45% para o RNP e 42,5% para o Sm; 42,5% para Ro e 35% para La. Segundo a literatura, podem ser detectados isoladamente anticorpos anti-RNP sem o anti-Sm, e anti-Ro sem o anti-La, não sendo relatado em ambos os casos, o inverso (CRAFT & HARDIN, 1987 e TAN, 1989).

Ao se considerar um teste para se detectar anticorpos são relevantes a técnica propriamente dita e a qualidade do substrato (antígeno) utilizados (UTIYAMA e col., 1995). No presente trabalho utilizamos a CIE por ser método sensível e como antígenos o SS-A/Ro e o SS-B/La, por serem marcadores importantes em doenças reumáticas (WALRANGES e col, 1997, TZIOUFAS e col., 1999).

Os antígenos SS-A/Ro e SS-B/La são particularmente importantes nas doenças auto-imunes como LES e SS (vide Tabela 3 – INTRODUÇÃO) (TAN, 1989; PARODI, 1998 e POLLOCK, 1999). Estes antígenos foram isolados primariamente a partir de baço humano e identificados por imunodifusão com anticorpos de pacientes com LES e SS (CLARK e col., 1969 e MATTIOLI e col.,1974). Ambos são nucleares e o antígeno Ro é também encontrado no citoplasma.

Ao utilizarmos os antígenos Ro e La nos deparamos com a dificuldade em obtê-los. Inicialmente, utilizamos antígenos extraídos de baço humano, fornecido pela Laboratório de Reumatologia da USP-SP. Dificuldades posteriores, levou-nos a padronizar sua extração a partir de baço de cão. O baço de cão foi escolhido considerando informações pessoais e de literatura (NAKAMURA e col, 1985; KAPOGIANNIS, 2000) mostrando ser boa fonte

destes antígenos, e, também, pela facilidade em obtê-lo no laboratório de Cirurgia Experimental de nosso Campus.

A extração de antígenos teciduais é tarefa complexa, mormente se considerarmos órgãos como o fígado, timo e baço, constituídos por vários tecidos. Nestes casos, o extrato fornece inúmeros antígenos, provenientes dos inúmeros constituintes celulares e subcelulares. Além disso, o procedimento utilizado para sua extração pode alterar as propriedades antigênicas, dificultando ainda mais sua detecção. Isto pode ocorrer mais facilmente com antígenos complexos, como é o caso do Ro e La. (vide pg. 8 a 11 - INTRODUÇÃO). No presente trabalho, a presença e a antigenicidade dos antígenos Ro e La foram avaliados utilizando-se soros e antígenos padrões e, também, pelo teste de ELISA-kit. O procedimento de extração para obtenção dos antígenos foi considerado padronizado quando foi obtido 100% de concordância com os testes-padrão.

O teste de CIE mostrou-se um teste específico e sensível para detecção de AANs. Apresentou positividade que variou de 45% a 75%. A sensibilidade do teste foi de 70 % e a especificidade de 100%. A CIE apresentou maior positividade em relação a técnica de ELISA

Ro e La, detectando 70% a mais de soros positivos; também, foi maior do que o teste de ELISA para anti-RNP e anti-Sm, detectando respectivamente 45% e 42,5% a mais de soros positivos; da mesma forma ao anti-DNA, contra o qual apresentou positividade 75% maior. Resultados semelhantes foi relatado por BIZZARO e col. (1998), que compararam a CIE com os testes de IFI, Wb, IB, e observaram grande concordância entre os mesmos: 86,9% na detecção de anti-DNA , 93,5% para anti-núcleo e de 86,9% para anti-ENA. Para detecção de anticorpo anti-ENA, houve grande concordância entre os testes: de 100% para SS-B/La e de 93% para SS-A/Ro. PARODI e col., 1998, utilizaram 29 pacientes com Lúpus Eritematoso Cutâneo Subagudo (LECS) para comparar testes laboratoriais para detecção de anti-Ro e anti-La. Verificaram que a CIE detectou anticorpos em 76% dos casos, ao contrário do obtido com dois testes de ELISA (59% e 62%) e a IB, que foi positivo em 38 % dos casos. Entretanto, ao analisar nossos resultados e os de PARODI e col., (1998), devemos considerar que em ambos os trabalhos a amostragem foi pequena, o

que pode levar a valores de especificidade e sensibilidade superestimados.

Outra vantagem da CIE é a quantificação dos AANs através de titulações. No presente trabalho obtivemos 13 soros com diluições de 1:16 e 9 pacientes com positividade para o soro sem diluição (puro). Talvez a titulação esteja relacionada com a gravidade da patologia.

A maior dificuldade apresentada pela CIE, foi a caracterização específica de Ro e La. Apenas dois soros apresentaram duas linhas de precipitação. Esse fato indica a presença dos dois anticorpos, pois quando aparece apenas uma linha não podemos dizer se é a presença de um ou outro anticorpo. Seria importante a caracterização e a separação desses antígenos, pois isto possibilitaria a detecção cada um destes antígenos e assim poder correlacioná-los individualmente com cada doença auto-imune.

A ausência dos antígenos Ro e La pode ser explicado por alguns fatos:

a) Ausência dos antígenos Ro e La no extrato de baço de cão. Esta pode ser descartada pelo fato só utilizarmos o extrato de baço após certificarmos da presença destes antígenos comparando como salientado, na preparação obtida pela USP-SP e ELISA-kit;

b) Baixa concentração desses antígenos no próprio extrato;

c) Baixa concentração de anticorpos anti-Ro e anti-La no soro dos pacientes.

O nosso laboratório possui uma rotina aproximada de 200 soros ao mês, assim como a IFI é usada como teste rotineiro para triagem de auto-anticorpos, a contraimunoeletroforese pode ser introduzida na nossa rotina de triagem para pesquisa específica de auto-anticorpos como SS-A/Ro e SS-B/La. A contraimunoeletroforese apresentou-se sensível e específica na detecção destes auto-anticorpos, e esses resultados nos estimulam a introduzir esta técnica em nossa rotina diagnóstica.

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo principal padronizar o teste de contraimunoeletroforese (CIE) para detecção dos autoanticorpos contra os antígenos SS-A/Ro e SS-B/La. Como complementação, realizou-se a padronização da obtenção dos antígenos Ro e La à partir de baço de cão.

Para consecução dos objetivos, foram realizadas as seguintes etapas:

1. Extração dos antígenos Ro e La à partir de baço de cão
2. Padronização da CIE com os antígenos obtidos:

   2.1 Padronização da técnica CIE propriamente dita;

   2.2 Teste qualitativo dos antígenos Ro e La obtidos com padrão USP-SP e ELISA-kit comercial para esses antígenos.

3. Escolha dos casos de doença reumática (diagnosticados por biópsia - 40 pacientes) e controles (soro de doadores de sangue - 10 doadores). As doenças selecionadas tiveram a seguinte distribuição:

   3.1 Lúpus Eritematoso Sistêmico = 29 casos

   3.2 Lúpus Eritematoso Discóide = 4 casos

   3.3 Esclerodermia = 3 casos

   3.4 Síndrome de Sjögren = 4 casos

4. Realização dos testes CIE e ELISA-kit.
5. Obtenção dos resultados dos testes de imunofluorescência indireta (IFI) para fator anti-núcleo (FAN) e anti-DNA, ELISA- RNP e ELISA- Sm, realizados na rotina diagnóstica de doenças autoimunes no Laboratório de Imunopatologia do Departamento de Patologia- FMB-UNESP.
6. Comparação e estatística dos resultados obtidos pela CIE com os demais testes.

Os resultados e as conclusões obtidas foram as seguintes:

1. Na padronização e nos testes dos soros dos pacientes reumáticos, a CIE apresentou, em geral, apenas uma linha de precipitação bem definida. Somente em dois casos ocorreram duas linhas de precipitação. A presença de uma linha de precipitação impossibilitou a caracterização da presença de anticorpos anti-Ro e anti-La. A detecção de apenas uma linha de precipitação pode ter sido devida: a) aos baixos níveis de anticorpos presentes no soro do paciente; b) à baixa concentração de um dos antígenos (Ro ou La) no extrato de baço; c) às possibilidades *a* e *b*; d) presença de antígenos Ro e La complexados em uma única molécula; e) ausência de um dos antígenos, Ro ou La, no substrato.

2. Na quantificação dos soros pela CIE, 13 soros apresentaram diluições de 1:16 e 9 soros apresentaram positividade com o antígeno sem diluição. Não estudamos a relação entre titulação e a gravidade das doenças.

3. Todos os testes apresentaram especificidade de 100%. A CIE e o teste de IFI-FAN foram os testes que apresentaram maior sensibilidade, observando-se valores de 70% e 87,5% respectivamente. Em contraste, o ELISA Ro e La apresentaram sensibilidade de 42,5% e de 35% respectivamente. O teste com menor sensibilidade foi o IFI-DNA, com valor de 20%.

4. *Em conclusão, a alta sensibilidade e especificidade apresentada pela CIE na detecção de auto-anticorpos contra os antígenos Ro e La obtidos de baço de cão, possibilita, nesta fase, a introdução deste teste em nossa rotina laboratorial para a triagem desses auto-anticorpos .*

   Estudos posteriores devem ser realizados para determinar se há relação entre os títulos de anticorpos anti-Ro e anti-La obtidos pela CIE e a gravidade das doenças reumáticas.

ABSTRACT

The main objective of the present work was to standardize the counterimmunoelectrophoresis assay for the detection of autoantibodies to the SS-A/Ro and SS-B/La autoantigens. As a complementary objective, the extraction of both antigens from dog's spleen was also standardized.

To accomplish these objectives, the following steps was performed:

1. Extraction of the Ro e La antigens from dog's spleen.
2. CIE standardization with the extracted antigens:

   2.1 Standardization of CIE test;

   2.2 Qualitative and quantitative analysis of the Ro e La antigens present in the extract of the spleens with a gold-standard (positive serum against Ro and La antigens + Ro and La antigens obtained from spleen dog) obtained from the University of São Paulo-SP and with a commercial ELISA-kit for detection of autoantibodies against these antigens.

3. Selection of the cases with rheumatic disease (diagnosed by biopsys - 40 patients) and normal individual for control serum (blood donors - 10 donors). The diseases and the number of each one in the forty selected cases was distributed as follow:

    3.1 Systemic erithematous lupus = 29 cases

    3.2 Discoid erithematous lupus = 4 cases

    3.3 Scleroderma = 3 cases

    3.4 Sjögren syndrome = 4 cases

4. Performance of the CIE e the ELISA-kit tests.
5. Obtaining the results of the following tests: IFI , AAN anti-DNA, ELISA-RNP and ELISA- Sm, registered in the files of the service of autoimmune diseases of the Laboratory of Immunopathology, Department of Pathology - UNESP University - Botucatu Medical School.
6. Statistical analysis and comparison of the results of CIE and other tests.

The results and conclusions were the following:

1. In the standardization for the Ro and La antigens in the extract of the spleens and in the tests performed in the serum of rheumatic patients, the CIE in general expressed only one well-defined line of precipitation. Only in two cases it was observed two lines of precipitation. The presence of only one line of precipitation make impossible to know if the autoantibodies present in the sera were against Ro or La antigens.

   The detection of only one line of precipitation can be accounted for: a) Presence of low levels of antibodies in the patients sera; b) Low concentration of one of the antigens (Ro or La) in the extract of the spleens; c) To both , *a* e *b* possibilities; d) To the presence of a proteic complex composed with both Ro e La antigens in the extracted preparation; e) Absence of one of the antigens, Ro or La, in the substrate.

2. The quantitative analysis of the sera by the CIE showed 13 sera with 1:16 dilution, and 9 sera were positive with undiluted antigen . With did not correlated the serum titration and the severity of each disease.

3. All the tests were 100% specific. The CIE and the IFI-FAN were the only two tests to present the highest sensibility, with values of 70% and 87,5% respectively. In contrast, the sensibility for ELISA-Ro and ELISA-La was 42,5% and 35% respectively. The lowest sensibility was observed with the IFI-DNA test, with a value of 20%.

4. *In conclusion, the high sensibility and specificity observed with the CIE assay to detect autoantibodies against the antigens Ro and La obtained from dog's spleen, permit, in this phase, to introduce this procedure in our laboratorial routine for these antibodies screening .*

   Further studies should be done to address the correlation between Ro and La antibodies titration and the severity of each rheumatic disease.

REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKIZUKI, M., POWERS, R. HOLMAN, H.R. A soluble acidic protein of the cell nucleus wich reacts with serum from patients with systemic lupus erythematosus and Sjögren's syndrome. J. Clin. Invest. v. 59: p. 245, 1997.

ALEM, M., MOGHADAN, S., ZAIDI, A. Detection of autoantibodies to nuclear antigens by EIA and IF techniques. **Allerg. Immunol.,** v.29(7):188, p. 191-4, 1997.

ALSPAUGH, M.A., MADDISON, P. Resolution of the identity of certain antigen-antibody systems in sistemic lupus erythematosus and Sjogren's syndrome: an interlaboratory collaboration. **Arthritis Rheum.**., v.22, p. 796 -8, 1979.

ALSPAUGH, M.A., TAN, E.M. Antibodies to cellular antigens in SS. **J. Clin. Invest.,** v.55, p.1067-73, 1975.

ANDERSON, J.R., GRAY, K.G., BECK, J.S. Precipitating antibodies in Sjögren's disease. **Lancet**. v.2: 456, 1961

ANDERSON, J.R., GRAY, K.G., BECK, J.S. Precipitating antibodies in the autoantibodies in the connective tissue diseases. **Ann. Rheum. Dis.** v.21: 360, 1962.

BARAKAT, S., MEYER, O., TORTEROTOT, F. IgG antibodies from patients with primary Sjögren´s Syndrome and systemic lupus erythematosus recognize different epitopes in 60-dD SSA/Ro protein. **Clin. Exp. Immunol. ,**v.89, p.38-45,1992.

BAUERFEIND, S., HEIDE, K.G. The determination of auto-immune antibodies by Western blot technique in the routine laboratory: Problems arising with the determination and evaluation of three different test kits**. Z. Rheumatol.,**. v.53, p.66-71,1994.

BECK, J.S., ANDERSON, J.R., BUCHANAN, W.W. Antinuclear and precipitating auto-antibodies in Sjögren´s Syndrome. **Ann. Rheum. Dis.** v.24: 16, 1965.

BEN-CHETRIT, E., CHAN, E.K.L., SULLIVAN, K.F. A 52 Kd protein is a novel component of the SS-A/Ro antigenic particle. **J. Exp. Med.,** v.167, p.1560-71, 1988.

BIER, O., MOTA, I., SILVA, W.D. , VAZ, N. M. *Doenças auto-imunes.* In: BIER, O. **Imunologia básica e aplicada.** Rio de Janeiro : Guanabara Koogan. p.327-62, 1982.

BIZZARO, N., TOZZOLI. R., TONUTTI. E. Variability between methods to determine ANA, anti-dsDNA and anti-ENA autoantibodies: a collaborative study with the biomedical industry. **J. Immunol. Methods**, v.219, p.99-107, 1998.

BLANGE, I., RINGERTZ, N. R., PETTERSON, I. Identification of antigenic regions of the human 52kD Ro/SS-A protein recognized by patient sera. **J. Autoimmun**., v.7, p.263-74, 1994.

BLOMBERG, S., RONNBLOM, L., WALLGREN, A.C. Anti-SSA/Ro antibody determination by enzyme-linked immunosorbent assay as a supplement to standard immunofluorescence in antinuclear antibody screening. **Scand. J. Immunol.** , v.51, p.612-7, 2000.

BOIRE, G., CRAFT, J. Biochemical and immunological heterogeneity of the Ro ribonucleoprotein particles. Analysis with sera specific for the Ro hY5 particles. **J. Clin. Invest.,** v.84, p.270, 1989.

BOIRE , G., LOPEZ-LONGO, F.-J. LAPOINTE, S. Sera from patients with autoimmune disease recognize conformational determinants on the 60-kDa Ro/SS-A protein. **Arthritis Rheum.** v.34, p. 722-30, 1991.

BONFA, E.S.D.O., VENDRAMINI, M.B.G., SOUZA, F.V. Métodos laboratoriais para a detecção dos anticorpos anti-Ro/SSA e anti-La/SSB. **Rev. Med. (São Paulo),** v.72 , p.5-7, 1993.

BOSSUYT, X., MEURS, L., MEWIS, A. Screening for autoantibodies to SS-A/Ro by indirect immunofluorescence using HEp-2000 cells. **Ann. Clin. Biochem.** v. 37, p. 216-19, 2000.

BOZIC, B., PRUIJN, G.J.M., ROZMAN, B. Sera from patients with rheumatic diseases recognize different epitope regions on the 52-KD Ro/SS-A protein. **Clin. Exp. Immunol. ,** v.94, p.227-35, 1994.

BRIDGES, A.J., LORDEN, T.E., HAVIGHURST, T.C. Autoantibody testing for connective tissue diseases: Comparison of immunodifusion, immunoblot, and enzyme immunoassay. **Am. J. Clin. Phatol.,** v.108, p.406-10,1997.

CHAN, E.K.L., HAMEL, J.C., BUYON, J.P. Molecular definition and sequence motifs of the 52-kD component of human SS-A/Ro autoantigen. **J. Clin. Invest.** v.87,p.68-76, 1991.

CHAN, E.K.L., TAN, E.M. Epitopes, structural domains and asymmetry of amino acid residues in SS-B/La nuclear protein**. J. Immunol.,** v.136, p.3744-49, 1982.

CHAN, E.K.L., TAN, E.M. Epitopes, structural domains and asymmetry of amino acid residues in SS-B/La nuclear protein**. J. Immunol.,** v.136, p.3744-49, 1986.

CHAN, E.Y.T., MOK, T.M.Y., LAWTON, J.W.M., Comparison of counter immunoelectrophoresis with immunoblotting for detection of anti-extractable nuclear antigen antibodies in systemic lupus erythematosus**. Asian. Pac. J. Allergy. Immunol.**, v.17, p.275-9, 1999.

CHEN, Z. W., TOLIKAI K. Test of anti-ENA antibody by immunoblotting and RNA immunoprecipitation assays. **Chin. J. Microbiol. Immunol.,** v.12, p.185-8, 1992.

CIMAZ, R., STRAMBA-BADIALE, M., BRUCATO, A. QT interval prolongation in asymptomatic anti-SSA/Ro-positive infants without congenital heart block.. **Arthritis Rheum.** , v.43, p.1049-53, 2000.

CLARK, G., REICHLIN, M., TOMASI, T.B. Characterization of a soluble cytoplasmic antigen reactive with sera from patients with systemic lupus erythematous. **J. Immunol.,** v.102, p.117-24, 1969.

CLEGG, D.O., WILLIAMS, H.J., SINGER, J.Z., STEEN, V.D. Early undifferentiated connective tissue disease. II. The frequency of circulating antinuclear antibodies in patients with early rheumatic diseases. **J. Rheumatol.,** v.18, p.1340-3, 1991.

COOK, L. New methods for detection of anti-nuclear antibodies. **Clin. Immunol. Immunophatol. ,**v.88, p.211-20, 1998.

CRAFT, J.E., HARDIN, J. A. Linked sets of antinuclear antibodies: what do they mean? **J. Rheumatol.** 14S13, 106, 1992.

D'CRUZ, D.P., ASHERSON, R.A., WISNIESKI, J. Autoantibodies in systemic lupus erythematosus and urticarial vasculitis. **Arthritis Rheum.,**v. 35, p.210-, 1992.

DELPECH, A., GILBERT, D., DALIPHARD, S. Antibodies to Sm, RNP and SSB detected by solid-phase ELISAs using recombinant antigens: A comparison study with counter immunoelectrophoresis and immunoblotting. **J. Clin. Lab. Anal**., v.7, p.197-202,1993.

EINSTEIN, A.J., BODIAN, C.A. , GIL, J. The relationships among performance measures in the selection of diagnostic tests. **Arch. Pathol. Lab. Med. ,**v.121, p.110-6, 1997.

FALCINI, F., DE SIMONE, L., DONZELLI, G. Congenital conduction defects in children born to asymptomatic mothers with anti-SSA/SSB antibodies: report of two cases. **Ann. Ital. Med. Int**., v.13, p.169-72, 1998.

FLAVELL, R.A., HAFLER, D. A. What is the turning point? **Curr. Opin. Immunol. ,** v.11, p.635-37,1999.

FRANCO, H.L., WESTON, W.L., PEEBLES, C. Autoantibodies directed against sicca syndrome antigens in the neonatal lupus syndrome. **J. Am. Acad. Dermatol. ,** v.4, p.67-72, 1981.

FRIOU, G. J., The early days of the antinuclear antibody story: Where and how did it all start? **Ann. Med. Intern.,** v.144, p.154-6, 1993.

GARCIA, S., CAMPOS-DE-CARVALHO, A.C. Neonatal lupus syndrome: the heart as a target of the immune system. **An. Acad. Bras. Cienc**. , v.72, p.83-9, 2000.

GONZALEZ, C., MARTIN, T., ARROYO, T. Comparison and variation of different methodologies for the detection of autoantibodies to nuclear antigens (ANA). **J. Clin. Lab. Anal.,** v.11 , p.388-92, 1997.

GORDON, T., TOPFER, F., KEECH, C., How does autoimmunity to La and Ro initiate and spread? **Autoimmunity,** v.18, p.87-92,1994.

GOTTLIEB, E., STEITZ, J.A. Function of the mammalian La protein: Evidence for its action in transcription termination by RNA polymerase III. **Embo J. ,** v.8, p.841-50 ,1989 (a).

GOTTLIEB, E., STEITZ, J.A. The RNA binding protein La influences both the accuracy and efficiency of RNA polymerase III *in vitro.* **Embo J. ,** v.8, p.851-61 ,1989 (b).

HARGRAVES, M., RICHMOND, H., MORTON, R. Presentation of two bone marrow componentes, the tart cell and the cell and the LE cell. **Mayo Clin. Proc. ,**v.27, p.25-8, 1948.

HOLBOROW, E.J., WEIR, D.M., JOHNSON, G.D. A serum factor in lupus erythematosus with affinity for tissue nuclei. **Br. Med. J.** , v.2, p.732, 1957.

JASKOWSKI, T.D., SCHRODER, C., MARTINS, T.B. Comparison of three commercially available enzyme immunoassays for the screening of autoantibodies to extractable nuclear antigens. **J. Clin. Lab. Anal.** v.9, p.166-72, 1995.

JASKOWSKI, T.D., SCHRODER, C., MARTINS, T.B. Screening foe antinuclear autoantibodiesby enzime immunoassy. **J. Clin. Lab. Anal.** v.105 (4), p.468-73, 1996.

KAPOGIANNIS, B., GUSSIN, H.A., TEODORESCU, M.R. Differences in clinical sensitivity of ELISA tests for autoantibodies with human and bovine extractable nuclear antigens. **Lupus**, v.9,p.343-52, 2000.

KEECH, C.L., McCLUSKY, J., GORDON, T.P., Transfection and overexprexpression of the human 60-KDa Ro/SS-A autoantigens in HEp-2 Cells. **Clin. Immunol. Immunophatol.,** v.73, p.146-51, 1994.

KERN, P., KRON, M., HIESCHE, K. Measurement of antinuclear antibodies: assessment of different test systems. **Clin. Diag. Lab. Immun**., v.7, p.72-8, 2000.

KOZEN, F., FOWLER, M., JOHNSON, G.D., A comparison of the sensitivities and specificities of different substrates for the fluorescent antinuclear antibody test. **Am. J. Clin. Pathol. ,** v.74, p.785-90, 1980.

KRAUTHAMER, A., SILVA, N.P., ANDRADE, L.E.C. Enzyme-linked immunosorbent assay for semi-quantitation of anti-Ro/SS-A antibodies in autoimmune rheumatic diseases. **Rev. Bras. Reumatol.,** v.35 (6), p. 315-320, 1995.

KRAUTHAMER, A., SILVA, N.P., LESER, P.G. Sistema antígeno-anticorpo SS-Ro: da identificação do auto-anticorpo aos recentes avanços no conhecimento molecular do auto-antígeno. **Rev. Bras. Reumatol.,** v.36 (3), p. 127-140, 1996.

KREDICH, N.M., SKYLER, J. S., FOOT, L.J. Antibodies to native DNA in SLE: A technique of rapide quantitative determination. **Arch. Intern. Med.,** v.131, p.639, 1973.

KURIEN, B.T., NEWLAND, J., PACZKOWSKI, C. Association of neutropenia in systemic lupus erythematosus (SLE) with anti-Ro and binding of an immunologically cross-reactive neutrophil membrane antigen. **Clin. Exp. Immunol**. , v.120, p.209-17, 2000.

LERNER, M. R., BOYLE, J.A., HARDIN, J. A. Two novel classes of small ribonucleoproteins detected by antibodies associated with lupus erythematosus. **Science,** v.211, p.400, 1981.

LESER, P. G.*(comunicação pessoal- *Professor Disciplina de Reumatologia da USP/SP e Chefe do Laboratório de Imunologia do Laboratório). *Situação atual da Pesquisa dos Anticorpos Antinucleares***. 1995.**

LIEU, T. S., JIAN, M., TAN, E.M. Identification of the SS-A/Ro intracellular antigen with autoimmune sera. **J. Immunol. Methods**, v.71, p.217-28, 1984.

MADDISON, P.J. Autoantibodies in Sjögren's syndrome: their origins and pathological consequences. Autoimmune diseases In*:* ISENBERG, D.A., HORSFALL, A.C. (Eds). **Autoimmune diseases**: focus on Sjögren Syndrome. Oxford: Bios Scientific Publications. v.89, p.100 , 1994.

MANOUSSAKIS, M.N., KISTIS, C.G., AIDINIS, V. Detection of human-specific anti-La(SSB) antibodies in patients with rheumatoid arthritis. **J. Autoimmun**., v.8, p.959-69, 1995.

MANOUSSAKIS, M.N., GARALEA, K.L., TZIOUFAS, A.G. Testing for antibodies to ENA and to double-stranded DNA is not indicated in FANA-negative sera. **Clin. Rheumatol.**., v.7, p.465-9,1988.

MANOUSSAKIS, M.N., KISTIS, K.G., LIU, X. Detection of anti-Ro(SSA) antibodies in autoimmune diseases: Comparison of five methods. **Br. J. Rheumatol**., v.32, p.449-55, 1993.

MATTIOLI, M., REICHLIN, M., Heterogeneity of RNA protein antigens reactive with sera of patientes with systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum. ,** v.17, p.421,1974.

MCCAULIFFE, D.P., WANG. L., SATOH, M. Recombinant 52 kDa Ro(SSA) ELISA detects autoantibodies in Sjogren's syndrome sera that go undetected by conventional serologic assays. **J. Rheumatol.,** v.24, p.860-6, 1997.

MENDES, M.J.S., DEL-NEGRO, G.B., SIQUEIRA, A.M. Sorodiagnosis. In: FRANCO, M.F., LACAZ, C.S., RESTREPO-MORENO, A. (Eds.) **Paracocidioidomycoses**. Boca Raton: CRC Press. p.345-63, 1994.

MONESTIER, M. Nucleolar antibodies. In: PETER, J.B., Y. SCHOENFELD, Y. (Eds.) **Autoantibodies .** New York: Elsevier, 1996. p.567-73.

NAKAMURA, R.M., PEBLES, C.L., RUBIN, R.L. MOLDEN, D.P., TAN, E.M. SS-A/Ro, SS-B/La, and RANA autoantibodies: immunodifusion assays. In: **Autoantibodies to nuclear antigens (ANA).** 2. ed. Chicago: American Society of Clinical Pathologistp. 132-9, 1985.

NISHIKAI, M. , REICHLIN, M., Heterogeneity of precipitating antibodies in polymyositis and dermatomyosistis. Characterization of yhe Jo-1 antibody system.. **Arthritis Rheum.,** v.23, p.881-8, 1980.

OWE-YOUNG, R.A., HORN, S., EDMONDS, J.P. Use of a molecularly cloned human SS.B antigen to detect anti-SS.B antibodies. **J. Autoimmun.**, v.5, p.351-61, 1992.

PARODI, A., DROSERA, M., BARBIERI, L., REBORA, A. Counterimmunoelectrophoresis, ELISA and immunoblotting detection of anti-Ro/SSA antibodies in subacute cutaneous lupus erythematosus. *A comparative study.* **Br. J. Dermatol.,** v.138, p.114-7,1998.

PASSALEVA, A., VANNUCCI, F., BONALI, A. Autoantibodies to human nuclear antigens in connective tissue diseases and other disorders**. Clin. Exp. Immunol**., v.63 , p.17-25, 1986.

POLLOCK, W., TOH, B.H. Routine immunofluorescence detection of Ro/SS-A autoantibody using HEp-2 cells transfected with human 60 kDa Ro/SS-A. **J. Clin. Pathol**. , v.52, p.684-7, 1999.

POURMAND, N., BLOMBERG. S., RONNBLOM, L. Ro 52kD autoantibodies are detected in a subset of ANA-negative sera. **Scand. J. Rheumatol**. , v.29, p.116-23, 2000.

RADER, M. D., OBRIEN, C., LIU, Y. Identification of a La protein binding site in a RNA polymerase III transcript (4.5I RNA). **J. Biol. Chem. ,** v.258, p.8352-6, 1983.

REDDY, R, HENNING, D., TAN, E.M. Identification of a La protein binding site in a RNA polymerase III transcritpt (4.5I RNA). **J. Biol. Chem.** v. 258, p. 8352-56, 1983.

REICHLIN, M. ANA negative systemic lupus erythematosus sera revisited serologically. **Lupus**, v.9, p.116-9, 2000.

RICCHIUTI, V., BRIAND, J. P., MEYER, O., ISENBERG, D. A., PRUIJN, G., MULLER, S. Epitope mapping with synthetic peptides of 52-kD SSA/Ro protein reveals heterogeneous antibody profiles in human autoimmune sera. **Clin. Exp. Immunol**., v.95, p.397-407,1994.

RINKE, J., STEITZ, J.A. Precursor molecules of both human 5S ribosomaland transfer RNAs are bound by a cellular protein reactive with anti-La antibodies. **Cell,** v.29, p.149-59, 1982.

ROBBINS, W. C., HOLLMAN, H.R., KUNKEL, H. G., Complement fixation with cell nuclei and DNA in lupus erythematosus. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** 575-79, 1957.

ROITT, I., BROSTOFF, J., MALE, D. Autoimunidade e doenças auto-imunes: o espectro das doenças auto-imunes. In: ROITT, I.M. **Imunologia.** 4.ed. São Paulo: Manole,v.27, p.1-27.13, 1997.

SANCHES-GUERREIRO. J., LEWW, R.A., FOSSEL, A.H. Utility of anti-Sm, anti-RNP, anti-Ro/SS-A, and anti-La? SS-B (extractable nuclear antigens) detected by enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum.,** v.39, p.1055-61, 1996.

SILVA, N.P., ANDRADE, L.E.C., FRANGIONI, R.Z. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of anti-native DNA antibodies using DNA from *Critidia luciliae* as substrate. **Rev. Bras. Reumatol.,** v.35 (4), p. 183-188, 1995.

TAN, E.M. Antinuclear antibodies: Diagnostic marker for autoimmune diseases and probes for cell biology. **Adv. Immunol.,** v.44, p.93,1989.

TAN, E.M., SMOLEN, J.S., MCDOUGAL, J.S. A critical evaluation of enzyme immunoassays for detection of antinuclear autoantibodies of defined specificities. I. Precision, sensitivity, and specificity. **Arthritis Rheum**., v.42, p.455-64, 1999.

TZIOUFAS, A.G., YOUINOU, P., MOUTSOPOLUS, H.M. Autoimmune diseases. In: MADDISON, P.J., ISENBERG, D.A.,WOO, P., GLASS, D. N. (Eds.) **The Oxford Textbook of Rheumatology.** 2.ed. Oxford: Oxford University Press. v.2, p.1301-14. 1998

TZIOUFAS, A.G., HANTOUMI, I., POLIHRONIS, M. Autoantibodies to La/SSB in patients with primary Sjogren's syndrome (pSS) are associated with upregulation of La/SSB mRNA in minor salivary gland biopsies (MSGs). **J. Autoimmun**. ,v. 13, p.429-34. 1999.

UTIYAMA, S.R.R., RADOMINSKI, S.C., DOI, E.M. Uso de diferentes substratos na investigação dos anticorpos antinucleares em doenças reumáticas sistêmicas. **Rev. Bras. Reumatol.,** v.35 (1), p. 11-16, 1995.

VELDHOVEN, C.H., HEILOF, J.F., HUISMAN, J.G. The development of a quantitative assay for the detection of anti-Ro/SS-A and anti-La/SS-B autoantibodies using purified recombinant proteins. **J. Immunol. Methods,** v.151, p.177-89,1992**.**

VENABLES, P.J.W., SMITH, P.R., MAINI, R.N. Purification and caracterization of the Sjogren's syndrome A and B antigens. **Clin. Exp. Immunol.** v.54, p..731, 1983.

VIANA, V.S., GARCIA, S., NASCIMENTO, J.H. Induction of in vitro heart block is not restricted to affinity purified anti-52 kDa Ro/SSA antibody from mothers of children with neonatal lupus. **Lupus,** v.7, p.141-7, 1998.

VILLALTA, D., BIZZARO, N., TONUTTI, E. Detection of anti-ENA autoantibodies in patients with systemic connective tissue diseases. Analytical variability and diagnostic sensitivity of 4 methods. **Rec. Progr. Med**., v.90, p.579-84, 1999.

WAHREN, M., RUDEN, U., ANDERSSON, B. Identification of antigenic regions of the human Ro 60 KDa protein using recombinant antigen and synthetic peptides. **J. Autoimmun.**, v. 5, p. 319-32, 1992.

WAHREN, M., RINGERTZ, N.R.,PETERSSON, I. IgM e IgG subclass distribution of human anti-Ro/SSA 60 KDa autoantibodies.**Scand. J. Immunol.**, v. 39, p. 179-83, 1994.

WAHREN-HERLENIUS, M., MULLER, S., ISENBERG, D. Analysis of B-cell epitopes of the Ro/SS-A autoantigen. **Immumol. Today,** v.20, p.234-40, 1999.

WALRAVENS, M.J., VANHERREWEGEN, H., LACQUET, F. Counterimmunoelectrophoresis with serum prediffusion: an improved method for the detection and identification of antibodies against extractable nuclear and cytoplasmic antigens. **J. Immunol. Methods,** v.201, p.89-98, 1997.

WARLOW, R., CARRANO, J., DAWKINS, R. A rapid screening enzyme linked immunosorbent assay for autoantibodies to extractable nuclear antigens. **Diag. Immunol. ,** v.2, p.154-60, 1984.

WITTE, T., HARTUNG, K., SACHSE, C. Rheumatoid factors in systemic lupus erythematosus: association with clinical and laboratory parameters. SLE study group. **Rheumatol. Int.**, v.19, p.107-11, 2000.

WOLLIM, S.L., STEITZ, J.A. The Ro small cytoplasmic ribonucleoproteins: identifications of the antigenic protein and its binding site on the Ro RNAs. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** V. 811, p.1996,1984.

WONG, K.H., LAWTON, J.W.M., CHENG, S.K.L. Measurement of anti-dsDNA: a comparative study of two ELISA and the *Critidia* assay. **Pathol.** v.30, p.57-61, 1998.

XU, Y.H. Antibodies to extractable nuclear antigen polypeptides: detection and its clinical significance. **Chung-Hua I Hsueh Tsa Chi.,** v.72, p.541-73, 1992.

YAMAGATA, H., HARLEY, J.B., REICHILIN, M. Molecular proprieties of the Ro/SSA antigen and enzyme-linked immunosorbent assay for quantification of antibody. **J. Clin. Invest.,** v.74, p.625-33, 1984.

APÊNDICE

1. Soluções e Reagentes

a. SOLUÇÃO PBS (pH-7,2)

Cloreto de Sódio [(NaCl)- Merck]	**8,19 g**
Fosfato Monossódico 1-hidrato [($NaH_2PO_4.H_2O$)- Merck]	**0,36 g**
Sódio Fosfato Dibásico [(Na_2HPO_4) –Merck]	**2,65 g**
Água Destilada	**100 ml**

b. SOLUÇÃO DEAE- COLUNA DE CROMATOGRAFIA

DEAE (diethyl amino ethycellulose)	**8 g**
Água Destilada	**100 ml**

c. SOLUÇÃO BARBITAL BUFFER (ESTOQUE)

Barbital Buffer (Sigma Chemical C.O.)	**12,0 g**
Ázida Sódica [(NaN_3) -Merck]	**1,0 g**
Tris[hidroxymethyl]aminomethane-[($C_4H_{11}NO_3$)-Sigma]	**44,3 g**
Água Destilada	**1000 ml**

d. SOLUÇÃO BARBITAL BUFFER (Diluição 1:5)

Solução Barbital Buffer (estoque)	**400 ml**
Água Destilada	**100 ml**

e. SOLUÇÃO AGAROSE: (1ª CAMADA)

Agarose (Pharmacia AB Molecular Biology Uppsala, Sweden)	**1,0 g**
Água Destilada	**100 ml**

f. SOLUÇÃO AGAROSE: (2ª CAMADA)

Agarose N.A (Pharmacia AB Molecular Biology Uppsala, Sweden)	**1,0 g**
Solução Barbital Buffer (diluição 1:5)	**100 ml**

g. SOLUÇÃO TROCA IÔNICA-PBS (0,5M)

Cloreto de Sódio [(NaCl)- Merck]	**29 g**
Água Destilada	**1000 ml**

h. SOLUÇÃO CORANTE

Azul Comassie Brilhante (Nuclear)	**2,00 g**
Álcool Metílico (Metanol) [(CH_3OH)-Merck]	**450 ml**
Ácido Acético Glacial [(CH_3COOH)- Merck]	**450 ml**
Água Destilada	**100 ml**

i. SOLUÇÃO DESCORANTE:

Álcool Metílico (Metanol) [(CH_3OH)-Merck]	**450 ml**
Ácido Acético Glacial [(CH_3COOH)- Merck]	**450 ml**
Água Destilada	**100 ml**

2. Tabelas de resultados.

1. Tabela com dados de pacientes e resultados individuais de todos os testes sorológicos.

DADOS DE PACIENTES							IFI			ELISA				CIE	
A	**B**	**C**	**D**	**E**	**F**	**G**	**H**	**I**	**J**	**L**	**M**	**N**	**O**	**P**	**Q**
1	F	B	19	19	ESCL	PELE	640	S	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	+	PURO

2	F	B	32	32	ESCL	PELE	10240	N	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	+	PURO
3	M	B	61	62	ESCL	PELE	80	H	NEG	NEG	NEG	+	+	+	1/2
4	F	B	24	24	LES	PELE	2560	S	NEG	NEG	NEG	+	+	+	1/16
5	F	B	35	39	LES	PELE	640	S	80	+	+	+	+	+	1/8
6	F	B	25	25	LES	PELE	320	HP	160	+	+	NEG	+	+	1/16
7	F	B	80	80	LES	PELE	40	H	NEG	+	+	NEG	NEG	+	PURO
8	F	B	34	40	LES	PELE	320	S	NEG	NEG	NEG	+	NEG	+	1/8
9	F	NB	24	29	LES	PELE	160	HP	NEG	+	+	+	+	+	1/16
10	F	B	23	25	LES	PELE	80	S	80	+	+	+	+	+	1/16
11	F	B	14	16	LES	PELE	5120	S	NEG	+	+	+	NEG	+	1/16
12	F	B	12	13	LES	PELE	5120	H	160	+	+	NEG	+	NEG	NEG
13	F	NB	23	33	LES	PELE	160	S	NEG	+	NEG	+	NEG	+	1/16
14	F	B	35	37	LES	PELE	320	S	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
15	F	B	19	26	LES	PELE	320	N	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
16	F	B	32	38	LES	PELE	20	H	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
17	F	B	20	20	LES	PELE	320	SP	NEG	+	+	NEG	+	+	PURO
18	F	B	42	42	LES	PELE	160	S	NEG	+	+	+	NEG	+	1/8
19	F	NB	25	28	LES	PELE	80	S	NEG	+	+	+	NEG	+	1/16
20	F	B	26	35	LES	PELE	640	SP	NEG	+	+	+	NEG	+	PURO
21	F	B	28	30	LES	RIM	1280	S	NEG	NEG	NEG	+	+	+	1/16
22	F	NB	08	09	LES	RIM	80	S	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
23	F	B	11	17	LES	RIM	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
24	F	B	23	23	LES	RIM	160	H	80	+	+	NEG	NEG	+	PURO
25	F	B	17	17	LES	RIM	640	SHP	320	+	+	+	+	+	PURO
26	F	B	42	43	LES	RIM	320	HP	80	NEG	NEG	NEG	+	NEG	NEG
27	F	B	39	41	LES	RIM	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	+	PURO
28	F	NB	23	23	LES	RIM	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
29	M	NB	12	14	LES	RIM	160	S	NEG	+	+	+	NEG	+	1/16
30	M	B	11	14	LES	RIM	320	S	NEG	+	+	NEG	NEG	+	1/8
31	F	B	35	35	LES	RIM	80	H	NEG	NEG	NEG	+	+	NEG	NEG
32	M	B	22	32	LES	RIM	640	HP	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
33	F	B	26	37	LED	PELE	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	+	PURO
34	F	NB	33	40	LED	PELE	80	S	80	NEG	NEG	+	+	NEG	NEG
35	M	B	24	25	LED	PELE	10240	S	NEG	+	+	NEG	NEG	+	1/16
36	M	B	28	29	LED	PELE	1280	S	NEG	NEG	NEG	+	+	+	1/16
37	F	B	10	10	SS	GS	320	S	NEG	+	+	NEG	NEG	+	1/2
38	F	B	52	61	SS	GS	320	S	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
39	F	B	44	51	SS	GS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	+	1/16
40	F	B	15	20	SS	GS	160	S	NEG	NEG	NEG	+	+	+	1/16

A=pacientes; **B**=sexo; **C**=raça; **D**=idade de realização da biópsia**; E**=idade de realização da sorologia**; F**=diagnóstico de biópsia**; G**=fragmento usado na biópsia**; H**=FAN-titulado**; I**=FAN-padrão**; J**= DNA**; L**=RNP**; M**= Sm**; N**=Ro **; O**=La**; P**= CIE-positivo e negativo**; Q**=CIE –titulação.

Abreviações: IFI- Imunofluorescência Indireta; FAN-fator anti-núcleo; ELISA- enzimaimunoensaio; CIE-contraimunoeletroforese; ESCL-esclerodermia; LES- lúpus eritematoso sistêmico**;** LED- lúpus eritematoso discóide; SS-síndrome de Sjögren; M- masculino; F-feminino; B-branco;NB-não-branco; + -positivo; NEG- negativo; Puro- antígeno total sem diluição; S- salpicado; H-homogêneo; P-periférico; N- nucleolar.

Tabela 2. Teste de CIE: número de casos positivos e negativos nas diferentes doenças.

		CONTRAIMUNOELETROFORESE		
Diagnóstico (n)		**NEGATIVO**	**POSITIVO**	**TOTAL**
	ESCL	-	3	**3**
				SS-A/Ro e SS-B/La

	LES	10	19	**29**
	LED	1	3	**4**
	SS	1	3	**4**
	TOTAL	**12**	**28**	**40**

ESCL- esclerodermia; LES- lúpus eritematoso sistêmico , LED: lúpus eritematoso discóide e SS- síndrome de Sjögren.

Tabela 3- Teste de CIE: número de casos positivos em cada titulação nas diferentes doenças.

		CONTRAIMUNOELETROFORESE (titulado/ n)					
		Negativo	**PURO**	**1/ 2**	**1/8**	**1/16**	**TOTAL**
Diagnóstico	**ESCL**	-	2	1	-	-	3
	LES	10	6	-	4	9	29
	LED	1	1	-	-	2	4
	SS	1		1	-	2	4
	TOTAL	12	9	2	4	13	40

ESCL- esclerodermia; LES- lúpus eritematoso sistêmico , LED: lúpus eritematoso discóide e SS- síndrome de Sjögren. Observação: a titulação 1/ 4 não apresentou nenhum caso.

Tabela 4. Comparação (positivo e negativo) entre o teste CIE e ELISA/Ro

		CONTRAIMUNOELETROFORESE (n)		
		NEGATIVO	**POSITIVO**	**TOTAL**
ELISA/Ro	**NEGATIVO**	10	13	**23**
	POSITIVO	2	15	**17**
	TOTAL	**12**	**28**	**40**

Tabela 5. Comparação (positivo e negativo) entre o teste CIE e ELISA/La

		CONTRAIMUNOELETROFORESE (n)		
		NEGATIVO	**POSITIVO**	**TOTAL**
ELISA/La	**NEGATIVO**	8	18	**26**
	POSITIVO	4	10	**14**
	TOTAL	**12**	**28**	**40**

Tabela 6. Teste de IFI-FAN: porcentagem de casos positivos em cada titulação nas diferentes doenças.

		Imunofluorescência Indireta – titulação (%)										
		N	**1/20**	**1/40**	**1/80**	**1/160**	**1/320**	**1/640**	**1/1280**	**1/2560**	**1/5120**	**1/10240**
Diagnóstico												

ESCL				2,5			2,5				2,5
LES	7,5	2,5	2,5	10	12,5	17,5	10	2,5	2,5	5	
LED	2,5			2,5				2,5			2,5
SS	2,5				2,5	5					

ESCL- esclerodermia; LES- lúpus eritematoso sistêmico , LED: lúpus eritematoso discóide e SS- síndrome de Sjögren.

Tabela 7.Teste IFI-FAN: porcentagem de casos positivos em cada padrão de fluorescência nas diferentes doenças.

Diagnóstico	Imunofluorescência Indireta – padrões de fluorescência (%)						
	NE	**S**	**NU**	**H**	**SP**	**HP**	**SHP**
ESCL		2,5	2,5	2,5			
LES	7,5	32,5	2,5	12,5	5,0	10,0	2,5
LED	2,5	7,5					
SS	2,5	7,5					

ESCL- esclerodermia; LES- lúpus eritematoso sistêmico , LED: lúpus eritematoso discóide e SS- síndrome de Sjögren.S- salpicado, H-homogêneo, NU-nucleolar, P- periférico.

Tabela 8. Teste de IFI-ANTI-DNA: freqüência (%/n) de positividade em cada diluição nas diferentes doenças.

Diagnóstico	Imunofluorescência Indireta anti-DNA (%/n)					
	N	**1/20**	**1/40**	**1/80**	**1/160**	**1/320**
ESCL	7,5 (3)					
LES	55 (22)			10 (4)	5 (2)	2,5 (1)
LED	7,5 (3)			2,5 (1)		
SS	10 (4)					

ESCL- esclerodermia; LES- lúpus eritematoso sistêmico , LED: lúpus eritematoso discóide e SS- síndrome de Sjögren.

Tabela 9. Teste de ELISA-RNP: número de casos positivos e negativos em cada doença.

Diagnóstico (n)	ELISA-RNP		
	NEGATIVO	**POSITIVO**	**TOTAL**

ESCL	3	-	**3**
LES	13	16	**29**
LED	3	1	**4**
SS	3	1	**4**
TOTAL	**22**	**18**	**40**

ESCL- esclerodermia; LES- lúpus eritematoso sistêmico , LED: lúpus eritematoso discóide e SS- síndrome de Sjögren.

Tabela 10. Teste de ELISA-Sm: número de casos positivos e negativos em cada doença.

	ELISA-Sm		
Diagnóstico (n)	**NEGATIVO**	**POSITIVO**	**TOTAL**
ESCL	3	-	**3**
LES	14	15	**29**
LED	3	1	**4**
SS	3	1	**4**
TOTAL	**23**	**17**	**40**

ESCL- esclerodermia; LES- lúpus eritematoso sistêmico , LED: lúpus eritematoso discóide e SS- síndrome de Sjögren.

Tabela 11. Teste de ELISA-Ro: número de casos positivos e negativos em cada doença.

	ELISA-Ro		
Diagnóstico (n)	**NEGATIVO**	**POSITIVO**	**TOTAL**
ESCL	2	1	**3**
LES	16	13	**29**
LED	2	2	**4**
SS	3	1	**4**
TOTAL	**26**	**14**	**40**

ESCL- esclerodermia; LES- lúpus eritematoso sistêmico , LED: lúpus eritematoso discóide e SS- síndrome de Sjögren.

Tabela 12. Teste de ELISA-La: número de casos positivos e negativos em cada doença.

	ELISA-La		
Diagnóstico (n)	**NEGATIVO**	**POSITIVO**	**TOTAL**
ESCL	2	1	**3**

SS-A/Ro e SS-B/La

LES	19	10	**29**
LED	2	2	**4**
SS	3	1	**4**
TOTAL	**26**	**14**	**40**

ESCL- esclerodermia; LES- lúpus eritematoso sistêmico , LED: lúpus eritematoso discóide e SS- síndrome de Sjögren.

Tabela 13. Teste de ELISA-Ro e ELISA-RNP: Comparação entre positividade e negatividade.

		ELISA-Ro		
ELISA/RNP		**NEGATIVO**	**POSITIVO**	**TOTAL**
	NEGATIVO	15	8	**23**
	POSITIVO	7	10	**17**
	TOTAL	**22**	**18**	**40**

Tabela 14. Teste de ELISA-Ro e ELISA-Sm: Comparação entre positividade e negatividade.

		ELISA-Ro		
ELISA/Sm		**NEGATIVO**	**POSITIVO**	**TOTAL**
	NEGATIVO	15	8	**23**
	POSITIVO	8	9	**17**
	TOTAL	**23**	**17**	**40**

Tabela 15. Teste de ELISA-La e ELISA-RNP: Comparação entre positividade e negatividade.

		ELISA-La		
ELISA/RNP		**NEGATIVO**	**POSITIVO**	**TOTAL**
	NEGATIVO	15	11	**26**
	POSITIVO	7	7	**14**
	TOTAL	**22**	**18**	**40**

Tabela 16. Teste de ELISA-La e ELISA-Sm: Comparação entre positividade e negatividade

		ELISA-La		
ELISA/Sm		**NEGATIVO**	**POSITIVO**	**TOTAL**

SS-A/Ro e SS-B/La

NEGATIVO	16	10	**26**
POSITIVO	7	7	**14**
TOTAL	**23**	**17**	**40**

Tabela 17. Tabela de concordância entre as diferentes técnicas utilizadas para detecção de auto-anticorpos:

	CIE	ELISA/Ro	ELISA/La	ELISA/RNP	ELISA/Sm	IFI/FAN	IFI/anti-DNA
CIE	-	p=0,010*	p=0,006*	p=0,009*	p=0,006*	p=0,027*	p=<0,001*
ELISA-Ro	P=0,010*	-	p=0,546	X	p=0,803	p=<0,001*	p=0,052
ELISA-La	p=0.006*	p=0,546	-	p=0,480	p=0,628	p=<0,001*	p=0,077
ELISA-RNP	P=0,009*	X	p=0,480	-	p=1,000	p=<0,001*	p=0,016*
ELISA-Sm	P=0,006*	p=0,803	P=0,628	p=1,000	-	p=<0,001*	p=0,027*
IFI-FAN	p=0,027*	p=<0,001*	p=<0,001*	p=<0,001*	p=<0,001*	-	p=<0,001*
IFI anti-DNA	p=<0,001*	p=0,052	p=0,077	p=0,016*	p=0,027*	p=<0,001*	-

Teste Mc Nemar:
*existe diferença significativa entre os testes;
X: sem dados estatísticos

2. Abreviações

AR: artrite reumatóide

CIE: contraimunoeletroforese

CREST: calcinose, fenômeno de Raynaud, dismotilidade esofageana, esclerodactilia e telangiectasia;

Db: dot blot

DEAE: diethyl amino ethycellulose

DMTC: doença mista do tecido conjuntivo

DNAds: DNA dupla hélice

DNAn: DNA nativo

ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay): ensaio imunoenzimático

ENA (Extractable Nuclear Antigens): antígenos nucleares extraíveis

ES: esclerodermia sistêmica

ESP: esclerose sistêmica progressiva

His: histidil;

IB: immunoblotting

IDD: difusão dupla,

IFI: imunofluorescência indireta

IP: imunoprecipitação

LES: lúpus eritematoso sistêmico

LID: lúpus induzido por drogas

PCNA: antígeno nuclear de proliferação celular

RIA: radioimunoensaio

RNAr: RNA ribossomal

RNAt: RNA transportador

SS: síndrome de Sjögren.

SSp: Síndrome de Sjögren primária.

SSs: síndrome de Sjögren secundária.

Tris: Tris[hidroxymethyl]aminomethane

Wb: Western blotting