ANTICORPOS IgG e IgE PARA AUTO-ANTÍGENOS NUCLEARES NO LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO

FERNANDA GARCIA GUERRA

ORIENTADOR: Dr. AJAX DE MERCÊS ATTA

Prof. Titular - FFUFBA

CO-ORIENTADORA: Dra. MARIA LUIZA B. S. ATTA

Profa. Adjunto - FFUFBA

Dissertação de Mestrado desenvolvida no LAPIM

Laboratório de Pesquisa em Imunologia da Faculdade de Farmácia da UFBA

Auxílio Financeiro: UFBA

“A persistência é o caminho do êxito”

Charles Chaplin

À minha filha Paula Guerra Duplat

AGRADECIMENTOS

A DEUS por ter conseguido ultrapassar mais uma etapa tão importante na minha vida e por todos que colocastes em meu caminho nos momentos de dificuldade.

À minha filha Paula pelo amor, carinho, compreensão e por tudo o que me ensina no dia a dia. Obrigada por existir.

Ao meu marido Antônio Jorge, pelo apoio, paciência, disponibilidade, companheirismo e compreensão. Pela convivência com um exemplo de Mestre, de uma rara sabedoria, competência e capacidade.

À minha mãe, Conceição Garcia, quem sempre me incentivou a fazer este curso, pela incansável torcida, dedicação, apoio, disponibilidade integral e palavra amiga nos momentos de desânimo.

À Maria Garcia, madrinha, tia, mãe e amiga de todas as horas, pela ajuda incondicional nos momentos em que tanto precisei.

À minha irmã Leilah Garcia Guerra, (*in memorium*), exemplo de dedicação ao estudo e à pesquisa científica. Mestre de fato, não teve tempo de defender a sua tese, deixando muitas saudades.

Ao meu pai João Guerra e meu irmão Sérgio Guerra, pelo incentivo, compreensão e apoio nos momentos em que precisei.

Ao Prof. Dr. Edgar Marcelino Carvalho e ao Dr, Jaime Freire de Carvalho, exemplos de competência, seriedade e profissionalismo, por terem me devolvido à vida, permitindo assim que eu retornasse para o curso.

Ao Prof. Dr. Moysés Teles de Jesus (*in memorium*) pelo carinho, apoio e incentivo para realizar este curso, seguir na carreira profissional e por tudo que me ensinou durante os anos de convivência, enquanto chefe do Departamento

de Ciências Morfológicas do ICS - UFBA. Meu eterno muito obrigado e muitas saudades.

Ao Prof. Hélio Gomes e Prof. Erasmo pela amizade e apoio na vida profissional.

Ao Pe. Confa *(in memorium*), a Dom Thomas Murphy *(in memorium*) e a Irmã Graziana que sempre mostraram, que nunca devemos desistir, e pelo carinho com que sempre me acolheram.

À Dra. Manuela Garcia, Conceição Vieira, Andréa Andrade e Olga Cunha pela presença e apoio nos momentos de *stress*.

Ao Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Imunologia, Prof. Dr. Roberto Meyer, por todo apoio, empenho e incentivo para que eu pudesse terminar este trabalho.

Aos Professores do Curso de Pós-Graduação em Imunologia pelo conhecimento transmitido.

Ao Prof. Dr. Roque Pacheco do Serviço de Imunologia do Hospital Universitário Prof. Edgard Santos, pelo acesso ao laboratório para realização de experimentos.

À Profª Drª Maria Ângela Ornelas, pela amizade, disponibilidade, pelo material cedido para alguns experimentos, acesso ao Laboratório de Parasitoses da EMV -UFBA, pelas sugestões, enfim, por toda ajuda que me deu nessa caminhada.

Aos colegas do curso de Pós-Graduação em Imunologia – UFBA e aos colegas do Laboratório de Pesquisa em Imunologia da Faculdade de Farmácia, pela ajuda na obtenção de material e realização de experimentos e pela companhia, como Josiane, Érica, Zilma, Franklin e em especial a Caciane

Portela com quem tive a oportunidade de trabalhar na mesma linha de Pesquisa e conviver por mais tempo.

Aos pós-graduandos da Fundação Osvaldo Cruz, Fernando, Marcos e Rita Elizabeth, na obtenção de material (antígeno) para a realização dos experimentos.

À Dilcéia Reis de Oliveira, secretária do PPGIm pela atenção.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

Ao PPGIM – UFBA pelo auxílio financeiro.

À todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao Prof. Dr. Ajax de Mercês Atta e Profª Drª Maria Luiza Souza Atta, pela orientação, paciência, compreensão e por tudo que me ensinaram durante esse período.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1.0. INTRODUÇÃO..... 16

1.1 Epidemiologia 17

1.2. Imunopatogenia..... 18

1.2.1 Imunidade inata 18

1.2.2 Alterações da regulação imune no LES 18

1.2.3 Auto-anticorpos 21

1.3 Características Clínicas 24

1.4 Características Laboratoriais 25

1.5 Critérios para Classificação 27

1.6. A imunoglobulina E no LES 29

2.0. RELEVÂNCIA 31

3.0. OBJETIVOS..... 33

3.1. Objetivo Geral 33

3.2. Objetivos Específicos 33

4.0. PACIENTES E MÉTODOS 34

4.1 Amostras de soros 34

4.1.1 Soros de LES 34

4.1.2 Soros controles negativos 34

4.2 Pesquisa de anticorpos IgG antinúcleo (FAN-IgG) 35

4.3 Detecção de anticorpos IgE antinúcleo 35

4.4. Pesquisa de anticorpos IgG anti-ENA 36

4.5. Pesquisa de anticorpos IgE anti-ENA 38

4.6 Anticorpos IgG anti-DNA dupla fita (DNA nativo)..... 39

4.7. Determinação quantitativa de IgE sérica total..... 40

4.8. Análise estatística 40

5.0. RESULTADOS 41

5.1. Anticorpos antinúcleo (FAN-IgG e FAN-IgE) 41

5.2 Anticorpos anti-DNA nativo..... 42

5.3. Anticorpos IgG anti-ENA 44

5.4. Anticorpos IgE anti-ENA 46

5.5. Níveis séricos de IgE total..... 47

5.6 Análise de Correlação 47

6.0. DISCUSSÃO 52

7.0. CONCLUSÕES 58

8.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Freqüência de anticorpos anti-DNA fita dupla da classe IgG determinados por ELISA, nos soros de pacientes portadores de Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) 43

Figura 2. Títulos de anticorpos IgG para antígenos ENA (SSA, SSB, Sm, RNP) determinados por testes de ELISA indireto nos soros de pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES)..... 45

Figura 3. Títulos de auto-anticorpos anti-SSA da classe IgE, determinados por ELISA indireto, dos soros controles e de pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES). 48

Figura 4. Títulos de auto-anticorpos anti-SSB da classe IgE, determinados por ELISA indireto, dos soros controles e de pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES). 49

Figura 5. Títulos de auto-anticorpos anti-Sm da classe IgE, determinados por ELISA indireto, dos soros controles e de pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES)..... 50

Figura 6. Títulos de auto-anticorpos anti-ENA (RNP) da classe IgE, determinados por ELISA indireto, dos soros controles e de pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) 51

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Freqüência de anticorpos antinúcleo IgG e IgE em 21 pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) e em 26 controles, determinados por Teste de Imunofluorescência Indireta..... 41

Tabela 2. Freqüência e especificidade antigênica dos anticorpos IgG anti-ENA (ELISA), nos soros de 21 pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES).....44

Tabela 3. Freqüência de anticorpos IgE anti-ENA (ELISA) no soro de pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) e nos controles..... 47

RESUMO

O Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é uma doença reumática auto-imune, classificada como uma reação de hipersensibilidade tipo III, que cursa com exuberante produção de auto-anticorpos de diferentes especificidades, e reação inflamatória crônica. O LES acomete predominantemente pessoas do sexo feminino, com prevalência de 5-50 casos/100.000. Contudo, estudos epidemiológicos têm mostrado diferenças raciais na prevalência e aspectos clínicos e laboratoriais do LES. Diferenças têm sido demonstradas principalmente na freqüência dos auto-anticorpos contra antígenos nucleares extraíveis (ENA, extractable nuclear antigens) e de anticorpos IgG anti-DNA fita dupla. Existem poucos dados sobre a prevalência destes auto-anticorpos em pacientes brasileiros, principalmente usando imunoensaios sensíveis. Assim, neste estudo foram investigadas as freqüências de anticorpos antinúcleo dos isotipos IgG e IgE com especificidade antigênica para as proteínas nucleares SSA, SSB, Sm e U1-RNP, além de anticorpos IgG anti-DNA fita dupla. Soros de 21 pacientes do sexo feminino e de 26 doadoras sadias, idade entre 15-65 anos foram inicialmente triados para a presença de anticorpos antinucleares IgG e IgE através de reação de imunofluorescência indireta (IFI, FAN-IgG e FAN-IgE) com células HEp-2. Anticorpos IgG anti-DNA fita dupla, e IgG e IgE anti-ENA foram investigados por técnica de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) indireto, usando fase sólida coberta com os auto-antígenos purificados. A concentração sérica de IgE foi determinada por ELISA de captura. Todos os soros dos pacientes com LES (100%) foram reativos no teste de FAN-IgG (mediana do título = 640), enquanto 15/21 (71%) amostras reagiram no teste de FAN-IgE. Anticorpos IgG anti-DNA fita dupla foram detectados em 12/21 (52%) soros (mediana do título = 777 UI/ml, sensibilidade de 35,5%). Quatorze soros reagiram em ELISA-IgG para anticorpos anti-ENA, apresentando as seguintes sensibilidades: anti-RNP = 40%; anti-SSA e anti-Sm = 20%, e anti SSB = 10,5%. Anticorpos IgE anti-ENA foram detectados em sete soros, apresentando o teste de ELISA-IgE uma sensibilidade de 2,5% para

anticorpos anti-SSA e SSB, e de 5,3% e 17,6% para anti-Sm e anti-RNP, respectivamente. Os testes de ELISA-IgE para anticorpos anti-Sm e anti-SSA mostraram 100% de especificidade, enquanto uma especificidade de 95% foi encontrada para os testes com anticorpos anti-SSB e anti-RNP. Um aumento na concentração de IgE sérica for observado em 6 (29%) das amostras (mediana = 426 UI/ml), existindo uma correlação positiva entre os títulos de FAN-IgG e IgG anti-RNP (r = 0.796, P = 0.002), entre os títulos de IgG e IgE anti-RNP (r = 0.594, P = 0.0045) e também entre IgE anti-RNP e IgE total (r = 0.680, P = 0.0007). Concluindo, a freqüência de FAN-IgG e anticorpos IgG anti-SSA, SSB e anti-Sm nos pacientes brasileiros com LES concordou com os resultados de outros estudos internacionais, existindo contudo uma forte predominância de anticorpos anti-RNP nestes indivíduos.

Palavras-chave: lúpus eritematoso sistêmico, antígenos nucleares extraíveis, auto-anticorpo IgG, auto-anticorpo IgE.

Abstract

Systemic Lupus Erythematosus (SLE) is an autoimmune rheumatic disease, classified as type III hypersensitivity. It courses with exuberant autoantibody production of different specificities, and chronic inflammatory reaction. It is predominantly a female disease, showing a prevalence of 5-50/100.000, however some epidemiological studies have demonstrated race differences in both prevalence and clinical and laboratory aspects of SLE, that are mainly related with the frequency of anti-ENA and anti-dsDNA antibodies (AB). There are no data on the prevalence of these antibodies in Brazilian patients, mainly using sensitive immunoassays like ELISA. Thus, in this study were investigated antinuclear IgG and IgE autoantibodies against the ENA-proteins SSA, SSB, Sm and RNP, and also anti-dsDNA IgG antibodies. Twenty-one sera from SLE female (range 15-65 years) were screened for antinuclear IgG and IgE antibodies by indirect immunofluorescence with HEp-2 cells. Anti-dsDNA Ab and anti-ENA IgG and IgE antibodies were investigated by indirect ELISA using solid phase sensitized with purified autoantigens. Serum IgE concentration was determined by a capture ELISA. All sera were ANA-IgG positive (100% sensitivity, median titer = 640), while 15 out of 21(71%) serum samples were ANA-IgE positive (55.5% sensitivity). Anti-dsDNA antibodies were detected in 12 out of 21 sera (35.5% sensitivity, median titer = 777 IU/ml). Fourteen sera reacted in IgG-ELISA for ENA antibodies, presenting the following sensitivity: 40% anti-RNP, 20% anti-SSA and anti-Sm, and 10.5% for anti-SSB. Anti-ENA IgE autoantibodies were detected in seven sera, with 2.5% sensitivity for anti-SSA and SSB antibodies, and 5.3% and 17.6% sensitivity for anti-Sm and anti-RNP, respectively. ELISA for anti-Sm and anti-SSA IgE antibodies showed 100% specificity, while 95% specificity was found for anti-SSB and anti-RNP in IgE-ELISA. Higher concentration of serum IgE was observed in 6 (29%) sera (median level = 426 IU/ml), and a positive correlation was verified between ANA-IgG and anti-RNP IgG titers (r = 0.796), anti-RNP IgG and IgE titers (r = 0.594), and also between anti-RNP IgE and total IgE (r = 0.680). Concluding, the frequency of ANA-IgG and anti-ENA IgG antibodies to SSA, SSB and Sm antigens in SLE Brazilian patients was in accordance with

others international studies, but there was a strong predominance of anti-RNP autoantibodies in these individuals.

Key words: systemic lupus erythematosus, extractable nuclear antigens, IgG autoantibody, IgE autoantibody.

1.0 INTRODUÇÃO

O Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é uma doença auto-imune sistêmica, caracterizada imunologicamente como uma reação de hipersensibilidade tipo III, mediada primariamente por complexos imunes circulantes formados por auto-antígenos e auto-anticorpos, que se depositam em órgãos e tecidos, produzindo inflamação crônica. Acomete pessoas de todas as idades de ambos os sexos, sendo mais prevalente em mulheres em idade reprodutiva, principalmente da raça negra (Mok & Lau, 2003).

Vários fatores estão associados com o LES, incluindo fatores genéticos representados por genes HLA-II DR2 e DR3; HLA-III, envolvidos com a síntese dos componentes C2 e C4 do sistema do Complemento, além de genes não ligados ao MHC, responsáveis pela síntese de citocinas, receptores celulares destes mediadores imunes, receptores de Fcγ e CR1 (Hahn, 1997).

A maior incidência de LES em indivíduos do sexo feminino, alcançando uma relação de 9:1 na faixa de 20-40 anos de idade, revela a influência dos hormônios sexuais na manifestação clínica desta doença, devido aos efeitos moduladores sobre a resposta imune. Assim, é inquestionável o efeito dos estrógenos sobre a atividade do LES, a partir de observações sobre os efeitos adversos do uso de contraceptivos e reposição hormonal em mulheres lúpicas, influência do ciclo menstrual sobre a atividade da doença, além da remissão da doença em mulheres menopausadas. Tais observações são confirmadas pela associação do LES masculino com atividade androgênica inadequada (Lahita, 1997; Rood et al., 1998; Mok & Lau, 2003).

Por outro lado, fatores ambientais como radiação ultravioleta, tabagismo, medicamentos, ingestão aumentada de gorduras saturadas, cosméticos, em especial tinturas de cabelo, medicamentos e infecções virais, entre outros, parecem precipitar o início desta doença auto-imune (Mok & Lau, 2003; Riemekasten & Hahn, 2005).

1.1. EPIDEMIOLOGIA

Vários estudos têm mostrado o efeito da raça na incidência do LES e na sua apresentação clínica. A prevalência de LES tem sido descrita ser cerca de oito vezes maior em afroamericanos e afrocaribenhos em comparação com caucasianos, existindo evidências que a doença não é rara no oeste da África (Molokhia et al., 2001). Contudo, estudos epidemiológicos recentes também têm mostrado uma maior incidência e prevalência de LES em populações indígenas norte-americanas quando comparadas aos caucasianos (Bongu et al., 2002).

Embora os índices de mortalidade tenham diminuído nos últimos anos, principalmente devido aos avanços obtidos no diagnóstico e tratamento do LES, este último aperfeiçoado com o uso de hemodiálise e transplante em pacientes com insuficiência renal, o risco de óbito ainda é cerca de três vezes maior do que na população geral (Bongu et al.; 2002, Petri, 2002).

1.2. IMUNOPATOGENIA

O LES não possui uma causa determinada. Imunologicamente, tem sido documentado alterações funcionais e quantitativas em diferentes componentes celulares e moleculares da resposta imune inata e adquirida dos indivíduos portadores da doença (Hahn, 1997; Robson & Walport, 2001).

1.2.1 Imunidade inata

Os leucócitos polimorfonucleares neutrófilos e monócitos apresentam aumentada expressão espontânea de CD11b e diminuição na fagocitose e processamento de complexos imunes ou de células apoptóticas. Existe um *clearance* defeituoso de complexos imunes e restos celulares apoptóticos por deficiência na síntese dos componentes iniciais do complemento C1q, C2 e C4, e dos receptores celulares deste sistema, incluindo CR1 e o receptor de C1q (Fuente et al., 2001; Mok & Lau, 2003).

1.2.2 Alterações da regulação imune no LES

Células T reativas para diferentes auto-antígenos (ex. DNA nativo, histonas, snRNP, Sm-B, Sm-D) podem ser isoladas do sangue periférico. Por outro lado, a perda de regulação imune no LES é expressa nas células T por um aumento dos linfócitos ativados no sangue periférico, exacerbação da função T auxiliadora frente aos linfócitos B, diminuição da morte celular

induzida por ativação imune e alterações da bioquímica celular associadas ao aumento do influxo de cálcio e da fosforilação intracelular (Hoffman, 2004).

Estudos recentes com clones de células T CD4+ humanas, obtidos de linfócitos circulantes específicos para antígenos diferentes, têm mostrado que estas células compreendem principalmente duas populações funcionalmente distintas, caracterizadas por diferentes padrões de produção de citocinas: células T-helper (Th)1 que produzem citocinas pro-inflamatórias como interleucina (IL)-2, interferon (IFN-γ) e fator de necrose tumoral (TNF-β), e linfócitos Th2, que produzem citocinas antiinflamatórias como IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13. Um terceiro tipo de linfócitos T helper denominado Th0, produz ambos os tipos de citocinas (Romagnani,1994). Estudos recentes, têm demonstrado que o padrão Th0 melhor define o LES, sendo caracterizado por níveis séricos aumentados de IL-12, IFN-γ, IL-10 e TNF-α, exercendo este último aparentemente um papel protetor na doença (Gómez et al., 2004).

A molécula CD40L é uma molécula co-estimulatória da ativação dos linfócitos B presente na superfície dos linfócitos T. Ela pode mediar a ativação das células B de forma inespecífica, incluindo aquelas que reconhecem antígenos próprios, contribuindo para a produção de auto-anticorpos. Sob condições normais, CD40L é apenas rapidamente expresso na superfície de células T auxiliadoras seguindo a ligação de TCR ao antígeno, assegurando que a interação entre células T auxiliadoras e células alvos será restrito para aquelas células que encontraram componentes da mesma partícula antigênica. Assim, a expressão mais prolongada de CD40L na superfície de células T pode ser responsável pela geração de uma resposta imune generalizada indesejável para auto-antígenos (Vakkalanka et al., 1999).

A ativação de células B através da interação de CD40 com o seu ligante CD40L causa a apoptose de células B, através da ligação de CD95 induzido por células T Fas ligante positivas (Schattner et al. 1995).

A forma solúvel de CD40L está com a concentração aumentada nos soros da maioria dos pacientes com LES (Koshy et al., 1996). Assim, a abundância CD40L, na presença de antígenos próprios, aumenta a sobrevida de células B, estimulando a expressão de moléculas co-estimulatórias e diferenciação destas células, incluindo "switch" de classe de imunoglobulina e mutações somáticas.

Uma falta de regulação na produção da forma solúvel de CD40L representa um mecanismo patogênico associado com a capacidade de aumentar a produção de citocinas, a função co-estimulatória de células apresentadoras de antígenos, induzindo vasculopatia e estado protrombótico após a ativação de células endoteliais (Vakkalanka et al., 1999).

Além do aumento no número de linfócitos B ativados, produzindo imunoglobulinas no sangue periférico, estas células são mais sensíveis à ativação específica por antígenos e são mais facilmente submetidas à ativação policlonal. Adicionalmente, estas células tornam-se mais reativas aos efeitos de citocinas como IL-6 e IL-10, além de secretar espontaneamente imunoglobulinas in vitro. Também, a produção de auto-anticorpos é favorecida por diminuição da atividade supressora de células T regulatórias e células NK e perda da regulação idiotípica (Hoffman,2004; Mok & Lau, 2003).

1.2.3 Auto-anticorpos

Uma característica comum às doenças auto-imunes sistêmicas como lúpus eritematoso sistêmico, doença mista do tecido conjuntivo (MCTD), esclerodermia (ou esclerose sistêmica), síndrome de Sjögren, dermatomiosite e poliomiosite, é a ocorrência de anticorpos para antígenos intracelulares nucleares ou nucleolares, coletivamente denominados de anticorpos antinúcleo, designados na rotina laboratorial dos países de língua inglesa como ANA (antinuclear antibody) e conhecidos no Brasil como FAN (fator antinúcleo). Embora detectados em quase 100% dos pacientes portadores de LES sem tratamento, os anticorpos antinúcleo podem ser também encontrados na maioria das outras doenças reumáticas sistêmicas, entretanto em baixa freqüência. Geralmente os títulos de anticorpos antinúcleo são mais elevados no LES quando comparados àqueles obtidos com as demais doenças auto-imunes ou com a população sadia (Tan et al., 1997; Kavanaugh et al., 1999; Maddison, 2002; Paassen, 2003).

Uma importante observação é que os auto-anticorpos antinúcleo são dirigidos para muitos alvos antigênicos nas doenças reumáticas auto-imunes, sendo a prevalência destas diferentes imunoglobulinas bastante variável. Assim, já foi possível a caracterização imunoquímica de mais de 25 especificidades imunes, estando certos perfis de auto-anticorpos associados com categorias diagnósticas de doenças reumáticas auto-imunes e muitas vezes com um padrão particular de suas manifestações clínicas (Mahler et al., 2003; Paassen et al., 2003).

Entre os auto-anticorpos antinucleares, anticorpos para antígenos ENA, pequenas ribonucleoproteínas extraíveis (RNP, Sm, SSA e SSB) assim designadas devido as suas naturezas químicas, e mais freqüentemente em virtude dos nomes dos pacientes onde foram demonstrados pela primeira vez (ex. Sm, de Stephanie Smith), são especialmente investigados no LES (Maddison, 2002; Riemekasten & Hahn, 2005).

Dos anticorpos acima, aqueles dirigidos para complexos formados de U RNAs complexados com proteínas, que estão envolvidos com *splicing* do precursor de RNA mensageiro, denominados de anticorpos anti-Sm, são muito específicos para LES, inclusive correspondendo a um dos critérios preconizados pelo American College of Rheumatology (Hochberg, 1997), para diagnóstico desta doença. Contrastando com a sua alta especificidade, os anticorpos anti-Sm são pouco sensíveis para diagnosticar casos de LES, pois só ocorre em cerca de 10-25% dos pacientes, principalmente em mulheres jovens negras (Zieve & Khusial 2003, Migliorini et al. 2005).

Anticorpos direcionados contra a ribonucleoproteína U_1RNP, podem ser detectados no LES, contudo eles são detectados com maior freqüência em pacientes com doença mista do tecido conjuntivo. À semelhança dos anticorpos anti-Sm, eles são também mais freqüentes em mulheres negras (Migliorini et al., 2005).

Embora ambos auto-anticorpos sejam detectados no LES, as associações dos mesmos com manifestações clínicas particulares do LES não têm sido confirmadas (Benito-Garcia et al., 2004).

Os outros dois auto-anticorpos anti-ENA também pesquisados na rotina laboratorial das doenças reumáticas sistêmicas como LES são anti-SSA (Ro)

e anti-SSB (La). Anticorpos anti-SSA são vistos em aproximadamente 25% dos pacientes com LES, estando associados com fotossensibilidade e bloqueio cardíaco congênito de neonatos de mães com LES, enquanto os anticorpos anti-SSB (La), quando presentes, geralmente estão acompanhados de anticorpos anti-SSA. Os anticorpos anti-SSB são menos freqüentes em LES do que SSA, e quando encontrados, têm sido associados com eritema malar, fotossensibilidade, lesões cutâneas subagudas, artrite serosite e trombose ocorrendo em aproximadamente 10% dos pacientes com a doença (Swaak et al.,1993).

Dois auto-anticorpos têm sido mais diretamente implicados na patogênese do LES: anticorpos anti-DNA fita dupla e antinucleossoma, estes últimos com especificidade antigênica dirigida para unidades de cromatina formadas por histonas e DNA fita dupla. Os primeiros, além de comporem o elenco dos critérios imunológicos preconizados pelo ACR, são considerados marcadores específicos da atividade lúpica, enquanto os auto-anticorpos antinucleossoma têm sido destacados por sua sensibilidade diagnóstica e monitoração do tratamento do LES (Burlingame & Cervera, 2002; Cervera et al., 2003; Riemekasten & Hahn, 2005).

Auto-anticorpos de outras especificidades podem ser eventualmente detectados nos soros de pacientes com LES, como por exemplo o auto-anticorpo antiproteína ribossomal P, que aparentemente guarda uma relação com manifestações neuropsiquiátricas em pacientes lúpicos (Gerli et al., 2002)

1.3. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

O LES apresenta sinais e sintomas inespecíficos, que podem ser encontrados em diferentes situações clínicas: febre, mialgias, perda de peso e cansaço, este último, freqüentemente crônico, podendo refletir a reativação da doença (Lahita, 1997).

A presença de artralgias nas pequenas articulações das mãos e dos punhos é freqüente. As manifestações dermatológicas geralmente envolvem regiões cutâneas expostas à luz solar ou artificial, sendo o sinal clínico mais comum o eritema malar, que pode ser observado em cerca de 30 a 50% dos pacientes lúpicos (Brasington et al., 2003, Fernando & Isenberg, 2005).

Úlceras orais, nasofaríngeas, conjuntivais ou vaginais, podem também ser encontradas. Em menor freqüência, pode ser observados: alopecia, fenômeno de Raynaud, que é uma isquemia transitória causada pelo frio e localizada nas extremidades dos dedos das mãos, e livedo reticularis, eritema violáceo, de aspecto marmóreo e padrão vascular, que se localiza preferencialmente nos membros inferiores (Lahita, 1997; Hildebrand & Muller 2001; Font et al., 2004).

A doença renal, evidenciada laboratorialmente por alterações na urinálise (proteinúria superior a 0.5g/l, hematúria e cilindrúria), cujo diagnóstico confirmatório só é possível através da histopatologia de material de biópsia dos rins, pode estar presente em cerca de 30% dos portadores de LES. A doença hematológica se faz representar predominantemente por anemia de doença crônica e, menos freqüentemente, por anemia hemolítica auto-imune. Além de alterações na série vermelha, ocorre leucopenia e trombocitopenia em cerca de

50% dos pacientes. As reações inflamatórias podem envolver coração, pulmões, e o sistema digestivo. As alterações neuropsiquiátricas são manifestadas em freqüência variada, podendo ser múltiplas e simultâneas, concorrendo para um mau prognóstico do curso da doença (Lahita, 1997; Font et al., 2004).

1.4 . **CARACTERÍSTICAS LABORATORIAIS**

O LES cursa principalmente com a produção de auto-anticorpos de ampla especificidade, dirigidos contra componentes do núcleo celular e fosfolípides da membrana celular.

Os primeiros podem ser detectados através da reação de imunofluorescência indireta com células epiteliais HEp-2, onde tais anticorpos podem produzir diferentes padrões de fluorescência, que dependem da localização nuclear do antígeno reconhecido, ou então através de imunoensaios que usam extratos celulares destas células (Warchu, 2000; Egner, 2000; Maddison, 2002).

Com o desenvolvimento de novos métodos para detecção de auto-anticorpos e isolamento e produção biotecnológica de auto-antígenos nucleares, um grande número de novos testes diagnósticos vem sendo introduzido no laboratório clínico, como por exemplo os ensaios imunoenzimáticos heterogêneos de ELISA, DOT-ELISA e *Western immunoblotting* com as proteínas SSA, SSB, Sm, U1 snRNP, entre outras (Tan et al. 1999, Phan et al, 2002).

Anticorpos antieritrócitos, antileucócitos e/ou antiplaquetas podem ser encontrados em pacientes portadores de LES, contribuindo para a anemia, leucopenia e trombocitopenia nesta doença. Na pesquisa dos mesmos podem ser usadas técnicas de aglutinação como os testes de Coombs para pesquisa de anticorpos dirigidos para antígenos eritrocitários, e de imunofluorescência para a detecção de auto-anticorpos antileucocitários e antiplaquetários.

Testes para anticorpos antifosfolípides de diferentes isotipos já fazem parte da rotina laboratorial especializada do LES, sendo usados para detectar riscos de trombose ou de abortamento de repetição. (Loizou et al., 2000).

Embora as raras deficiências na síntese de componentes do sistema Complemento sejam fortemente associadas com LES, nos pacientes lúpicos sem esta imunodeficiência ocorre o consumo de componentes da via clássica durante a doença ativa, principalmente de C4, devido à ativação deste sistema por complexos imunes, os quais inclusive podem ser ocasionalmente detectados na circulação. Geralmente, na investigação laboratorial do sistema complemento no LES, é realizado testes de atividade funcional (atividade hemolítica CH50), dosagens imunoquímicas de C3 e C4, além da pesquisa de produtos de clivagem de componentes gerados durante a ativação deste sistema (Walport, 2002; Liu et al. 2005).

A atividade inflamatória é avaliada através da medida da velocidade de eritrossedimentação, aumentada na doença ativa, mantendo-se inalterado o nível de proteína C-reativa, que só se eleva existindo infecção no paciente lúpico (Paasen, 2003).

O acometimento renal no LES pode ser diagnosticado através da histopatologia de biópsia renal. Uma vez que tal procedimento fornece

informações pontuais e pode causar riscos ao paciente, a doença renal pode ser bem monitorada nos pacientes portadores de LES com doença renal através de dosagens laboratoriais de rotina como creatinina, proteinúria e urinálise, esta última detectando alterações no sedimento urinário como a presença de cilindrúria, hematúria e/ou leucocitúria (Lahita, 1997).

1.5. CRITÉRIOS PARA CLASSIFICAÇÃO

O LES é uma doença que apresenta múltiplas manifestações clínicas, várias presentes em outras doenças reumáticas, impondo a necessidade de verificação de um conjunto de sinais e sintomas para o seu diagnóstico. Assim, este é baseado no reconhecimento de um padrão de anormalidades clínicas e laboratoriais. A introdução dos testes sorológicos para identificar perfis típicos de auto-anticorpos associados ao LES tem revolucionado as atitudes clínicas frente à doença, aumentando a sensibilidade diagnóstica, além de permitir evidenciar casos em que a identificação de marcadores laboratoriais antecedeu significativamente o início dos sintomas atribuídos à doença (Arbuckle et al., 2001).

Há cerca de oito anos, o American College of Rheumatology (Hochberg, 1997), produziu a sua versão modificada dos critérios de classificação para LES. A mais importante modificação neste documento correspondeu à substituição da pesquisa de células LE, presente na versão de 1982, pela investigação de anticorpos antifosfolípides. Esta medida aboliu definitivamente do laboratório clínico um teste pouco sensível, de leitura subjetiva, e em desacordo com as normas atuais de biossegurança. Desta forma, são

preconizados quatro critérios laboratoriais (critérios 7, 9, 10 e 11) e sete critérios clínicos, aqui apresentados de forma simplificada:

1) Eritema malar
2) Rash discóide
3) Fotossensibilidade
4) Úlceras orais/nasais
5) Artrites: não erosivas
6) Serosites: pleurisia ou pericardite
7) Comprometimento renal: proteinúria persistente (0,5 g/24h ou >3+) ou cilindrúria anormal.
8) Alterações neurológicas: convulsão ou psicose (ambos na ausência de outras causas)
9) Alterações hematológicas: anemia hemolítica ou leucopenia ou linfopenia ou plaquetopenia.
10) Alterações imunológicas: anticorpo anti-DNA nativo ou anti-Sm, ou presença de anticorpos antifosfolipídes baseado em: a) níveis anormais de IgG ou IgM anticardiolipina ou b) teste positivo para anticoagulante lúpico ou c) teste falso-positivo para sífilis, por um período mínimo 6 meses e confirmado por teste de FTA-ABS ou similar.
11) FAN positivo

Os critérios foram desenvolvidos com o objetivo de uniformizar a inclusão de pacientes para estudos científicos sobre LES, e embora raro, alguns

indivíduos com lúpus podem não apresentar o mínimo de 4 parâmetros exigidos para classificação (Sato et al.,2002).

Vários são os motivos que continuam dificultando o diagnóstico do LES. Além das diferenças populacionais, refletidas nos resultados laboratoriais, uma proporção considerável de pacientes apresenta sintomas não específicos, tais como artrite, febre e cansaço. A idade e o sexo do paciente também são fatores importantes. O LES é uma doença de maior prevalência em mulheres na idade fértil, o que pode reduzir o índice de suspeita clínica em crianças, homens e mulheres idosas (Cervera et al., 1993; Ward et al., 1989).

1.6. **A imunoglobulina E no LES**.

Pacientes com LES ativo têm maior concentração de IgE no soro do que pacientes com LES em remissão, no entanto, maiores investigações são necessárias para saber se a elevação de IgE durante a doença ativa é primária ou secundária a um fator patogênico (Rebhun et al., 1983; Laurent et al., 1986).

Auto-anticorpos anti-IgE já foram também observados em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e podem contribuir para as lesões patogênicas características desta doença (Gruber et al., 1988).

Em pesquisa recente, Atta et al., (2004) mostraram que 17 de 21 pacientes (81%) apresentando FAN-IgG positivo pelo teste convencional de imunofluorescência indireta com células HEp-2, tinham também anticorpos IgE antinúcleo, 6 deles apresentando problemas renais. Em 15 dos 17 soros, foi observado um padrão de fluorescência pontilhado fino, à semelhança do

padrão obtido com FAN-IgG, enquanto que os outros dois reagiram com antígenos de membrana nuclear. Não existiu neste estudo correlação entre a alta concentração sérica de IgE e positividade para FAN-IgE, entretanto a positividade deste último foi mais freqüente em soros apresentando títulos de FAN-IgG acima de 160. Embora o papel imunopatogênico para IgE nas doenças mediadas pelos imunocomplexos não seja evidente, presume-se que auto-anticorpos deste isotipo participem das mesmas, induzindo reações inflamatórias que resultam em glomerulonefrites, indicando uma associação entre os níveis aumentados de IgE sérica e alteração da função renal, além de sugerir a participação desta imunoglobulina nas lesões dos rins (McPhaul et al., 1974; Tuma et al., 1981).

2.0. RELEVÂNCIA

Pelo exposto, a pesquisa de anticorpos antinúcleo é amplamente aceita como importante ferramenta laboratorial para diagnóstico de muitas doenças do tecido conjuntivo. Quando a triagem de FAN é positiva, é justificada a investigação da especificidade dos auto-anticorpos para uma série de antígenos nucleares, incluindo ENA e DNA dupla-fita. Por outro lado, a ausência de um teste de FAN positivo dispensaria a pesquisa desses auto-anticorpos (Kavenaugh et al., 1999; Egner, 2000).

A freqüência de auto-anticorpos anti-ENA em pacientes com LES depende da população investigada e das técnicas usadas nos estudos. Assim, as técnicas de imunodifusão radial dupla e de aglutinação embora possuam boa especificidade não têm a mesma sensibilidade dos imunoensaios com reagentes marcados, para a detecção destes auto-anticorpos (Sanchez-Guerreiro et al., 1996; Olaussen & Rekvig, 1999; Phan et al., 2002)

O emprego recente da técnica de ELISA para detecção de auto-anticorpos antinúcleo, e também anti-ENA, tem permitido superar as interpretações subjetivas dos resultados obtidos por técnicas de IFI, imunoprecipitação ou aglutinação, além de fornecer informações de forma automatizada e semiquantitativa dos níveis destas imunoglobulinas. Contudo, resultados controversos da prevalência de auto-anticorpos anti-ENA em pacientes com LES podem ser produzidos nos estudos usando diferentes conjuntos diagnósticos o que torna necessário mais estudos populacionais com aqueles de sensibilidade e especificidade asseguradas (Tan et al., 1999) .

Pacientes com LES produzem aparentemente mais imunoglobulina E do que seus controles sadios, existindo uma aparente relação entre os níveis destas imunoglobulinas com a doença renal lúpica (Rebhun et al., 1983). No entanto, maiores investigações são necessárias para elucidar os mecanismos envolvidos na elevação de IgE durante a doença ativa.

Uma vez observado a elevada freqüência de anticorpos antinucleares da classe IgE em pacientes com LES, torna-se necessário tentar identificar a especificidade destes anticorpos em comparação com os anticorpos IgG, o que poderia contribuir para a melhoria do imunodiagnóstico desta enfermidade, como também fornecer subsídios sobre as diferentes manifestações clínicas desta doença.

A seguinte hipótese orientou o presente estudo:

Pacientes portadores de lúpus eritematoso sistêmico, assistidos em Salvador-BA, produzem auto-anticorpos do isotipo IgE anti-ENA com a mesma freqüência e especificidade do isotipo IgG.

3.0. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral:

Avaliar a resposta imune humoral para antígenos nucleares extraíveis em pacientes portadores de lúpus eritematoso sistêmico assistidos clinicamente em Salvador (Bahia)

3.2. Objetivos Específicos:

3.2.1. Identificar a especificidade de anticorpos IgG e IgE para antígenos nucleares extraíveis (ENA) nesta população através de testes de ELISA indireto

3.2.2. Correlacionar os níveis dos auto-anticorpos IgG e IgE anti-ENA

4.0. PACIENTES E MÉTODOS

4.1. Amostras de soros

4.1.1 Soros de LES

As amostras de soros do presente trabalho foram provenientes da soroteca do LAPIM. Eles foram obtidos previamente de 21 pacientes do sexo feminino, idade entre 15 – 65 anos, com diagnóstico clínico e laboratorial de LES. Para inclusão foram usados os critérios do Colégio Americano de Reumatologia de 1997, conforme avaliação clínica realizada por médico reumatologista.

Todos estavam em uso de medicação convencional para tratamento de LES. Embora a maioria tivesse aumento discreto na velocidade de eritrossedimentação, não foram observadas alterações no hemograma indicadoras de anemia, leucopenia ou trombocitopenia. Ao exame parasitológico de fezes, todos os pacientes foram negativos. Adicionalmente, não foi detectado alergia alimentar ou respiratória, por diagnóstico clínico ou laboratorial, conforme dados de prontuário e pesquisa de anticorpos IgE específicos para alérgenos. Alterações no sumário de urina, demonstradas por proteinúria, cilindrúria e/ou hematúria, forma observadas em 7/21 pacientes.

4.1.2 Soros controles negativos

No presente trabalho foram usados como controles negativos para LES, soros de 26 doadoras sadias de banco de sangue, de idades correspondentes.

4.2. Pesquisa de anticorpos IgG antinúcleo (FAN-IgG).

A pesquisa de FAN-IgG nos soros de LES e controles sadios foi realizada com a técnica de imunofluorescência indireta, usando células epiteliais humanas HEp-2 como substrato e conjugado anti-IgG humano marcado com isotiocianato de fluoresceina (FITC), conforme preconizado pelo Colégio Americano de Reumatologia (Kavenaugh et al. 1999).

Na reação, os soros foram diluídos a 1:40 em PBS e colocados nos poços das lâminas com área reativas de células HEp-2 (WAMA, São Carlos, Brasil). As lâminas foram incubadas à temperatura ambiente por 30 minutos em câmara úmida a 25ºC e a seguir lavadas três vezes com PBS (NaCl 150 mM em tampão fosfato, 10 mM, pH 7.2). Posteriormente, as células foram incubadas nas mesmas condições com conjugado de anticorpos IgG de coelho anti-IgG humana marcados com FITC (SIGMA, Co. ,USA), na diluição de 1/100, por 30 minutos à temperatura ambiente. Após novas lavagens com PBS, as lâminas foram montadas com glicerina tamponada e lamínula e as reações foram observadas em microscópio de fluorescência com aumento de x 400. As amostras positivas foram tituladas por diluições seriadas na razão de 2, sendo considerado como título a maior diluição do soro que ainda fornecia uma reação positiva nítida.

4.3. Detecção de anticorpos IgE antinúcleo.

Na pesquisa de FAN-IgE, foi utilizada a técnica de Imunofluorescência Indireta com células HEp–2 e conjugado de anticorpos IgG de cabra anti-IgE

humana marcados com FITC (Sigma Co., USA), após depleção de IgG sérica (Atta et al., 2004). Desta forma, os soros foram inicialmente diluídos a 1/5 em solução de anticorpos IgG de cabra anti-IgG humano (Sigma Co., USA), diluídos a 1/16, incubados por 30 minutos à 25º C e a seguir centrifugados por 10 minutos a 6000 rpm. Vinte e cinco microlitros do sobrenadante desses soros, depletado de IgG foram colocados nos poços das lâminas contendo as células HEp-2 fixadas, seguindo-se incubação em câmara úmida, por 18 horas à 4^0 C. As lâminas foram lavadas 3 vezes por 5 minutos com PBS e as reações incubadas com conjugado de IgG de cabra anti-IgE humana marcado com FITC, previamente diluído a 1/20 em PBS, por 2 h à 37^0 C. As lâminas foram novamente lavadas, montadas com glicerina tamponada e lamínula e observadas ao microscópio de fluorescência com aumento de x 400.

4.4. Pesquisa de anticorpos IgG anti-ENA.

A pesquisa de anticorpos IgG para os antígenos nucleares extraíveis SSA, SSB, Sm e RNP foi realizada pela técnica de ELISA indireta, utilizando conjuntos diagnósticos comerciais da INOVA Diagnostics (USA), seguindo protocolos previamente estabelecidos pelo fornecedor.

Para detecção de anticorpos da classe IgG, SS-A, SS-B, Sm e U1-RNP, estes conjuntos usam fases sólidas de poliestireno revestidas individualmente com os antígenos SS-A, SS-B, Sm, U1-RNP purificados. Na reação primária, os soros foram testados e diluídos no diluente da amostra HRP (solução tampão salina Tris, Tween 20, estabilizadores protéicos e conservante) a 1/100, usando-se 100 μl/poço e 30 minutos de incubação à 25ºC. Após

lavagens com a solução de lavagem do conjunto, os poços foram incubados com 100 μl/poço de conjugado de anticorpos anti-IgG humano marcados com peroxidase nas mesmas condições acima.

Seguindo-se novas lavagens, os poços foram incubados com o substrato de peróxido de hidrogênio + tetrametilbenzidina (TMB), durante 30 min a 25ºC. Após, a reação foi bloqueada com 100 μl/poço de ácido clorídrico 2N, sendo as absorbâncias determinadas a 450nm-600 nm numa leitora de ELISA Diamedix BP-12. As unidades de anticorpos/ml em cada soro foram calculadas através de um soro calibrador contendo 25UI/ml, aplicando-se a seguinte fórmula:

Absorbância do teste/Absorbância do calibrador X 25= U do teste

Na interpretação dos resultados foi usado o seguinte critério de classificação em unidades de anticorpo por mililitro de soro (UI/ml), seguindo as instruções técnicas da INOVA Diagnostics:

Negativo	<20
Fracamente Positivo	20 - 30
Moderadamente Positivo	40- 80
Fortemente Positivo	> 80

4.5. Pesquisa de anticorpos IgE anti-ENA.

A pesquisa de anticorpos IgE específicos para os mesmos antígenos nucleares extraíveis, foi também realizada pela técnica de ELISA, usando placas sensibilizadas com antígenos SSA, SSB, Sm e RNP dos mesmos conjuntos diagnósticos empregados para a detecção dos anticorpos IgG (Inova Diagnostics, USA). Tal procedimento deveu-se à dificuldade de obtenção dos antígenos purificados no próprio laboratório.

Neste procedimento, soros de indivíduos sadios doadores de banco de sangue e de pacientes com LES foram previamente depletados de IgG da seguinte forma:

1) Diluição dos soros a 1/5 com solução de IgG de cabra anti-IgG humana (Sigma, USA) diluído a 1/16 em PBS com 0,5% de soroalbumina bovina.
2) Incubação 30 minutos a 25ºC.
3) Obtenção do sobrenadante depletado de IgG após centrifugação por 10 min a 6000 rpm à 4ºC.

Uma vez realizado o tratamento para a retirada de IgG, 100 μl do sobrenadante de cada soro foram adicionados aos poços sensibilizados individualmente com os auto-antígenos SSA, SSB , U1-RNP e Sm, usando-se os dois primeiros poços de cada tira de reação para branco de reação e controle de conjugado, respectivamente.

Após incubação por 18h à 4ºC, os poços foram lavados 5 vezes com solução de lavagem HRP (solução salina Tris e Tween 20) INOVA e em seguida incubados por 1 hora à 37^0C com conjugado de anticorpos IgG de cabra anti-IgE humana marcados com fosfatase alcalina, previamente diluído a

1/500. Ao final, os poços foram lavados novamente, sendo a reação revelada com 100 μl/poço de solução de p-nitrofenilfosfato (PNP) em tampão dietanolamina pH 9.8, durante 30 minutos à 37ºC. Como solução bloqueadora foram usados 50 μl de EDTA dissódico 100 mM, sendo as reações enzimáticas coradas monitoradas a 405-600 nm na mesma leitora acima. No cálculo do cutoff dos testes para anticorpos IgE anti-ENA foi usado a média das absorbâncias dos 26 controles acrescida de 3 desvios padrões. Assim, foram considerados como positivos para SSA, SSB, Sm e RNP os valores de absorbância iguais ou acima de 0,080, 0,040, 0,661 e 0,142, respectivamente.

4.6. Anticorpos IgG anti-DNA dupla fita (DNA nativo).

Foram pesquisados anticorpos IgG desta especificidade em todos os soros dos pacientes com LES pela técnica de ELISA indireta, utilizando Kit comercial (INOVA Diagnostics, USA). Na interpretação dos resultados foi usado o seguinte critério de positividade em UI de anticorpos/ml de soro, que tem como referência um padrão da World Health Organization (WHO), com concentração de anticorpos anti-DNA fita dupla conhecida:

Negativo	0 - 92,6
Inconclusivo	92,7 -138,9
Moderadamente positivo	139 - 370,4
Fortemente positivo	$\geq$ 370,5

4.7. Determinação quantitativa de IgE sérica total.

Foi realizada através da técnica de ELISA de captura, utilizando conjunto diagnóstico comercial (Genzyme Diagnostics, Brasil). Como valor referencial para adultos foi usado o limite superior de 150 mUI de IgE sérica /ml de soro.

4.8. Análise estatística

Os títulos de anticorpos IgG no presente trabalho foram expressos como medianas. Os títulos de anticorpos IgE foram comparados pelo teste U de Mann-Whitney. As análises de correlação foram realizadas através do teste não-paramétrico de Spearman. Foram consideradas significativas as diferenças quando $P < 0.05$. A especificidade e a sensibilidade destes testes foi calculada usando as fórmulas usuais:

Especificidade = VN / (VN + FP) x 100 e Sensibilidade = VP / (VP + FN) x 100, onde VN = verdadeiros negativos, VP = verdadeiros positivos, FN = falsos negativos e FP = falsos positivos.

5.0 RESULTADOS

5.1. Anticorpos antinúcleo (FAN-IgG e FAN-IgE)

Anticorpos IgG antinucleares foram detectados nos soros de todos os pacientes com LES, com títulos variando de 40 a 5120 , mediana igual a 640, enquanto anticorpos IgE antinúcleo foram detectados em 15 destes 21 soros. No grupo controle todos os soros foram FAN-IgG e FAN-IgE negativos (tabela 1). A sensibilidade diagnóstica dos testes foi 100% para FAN-IgG e 56,6% para FAN-IgE, enquanto a especificidade foi de 100% em ambos os testes.

Tabela 1. Freqüência de anticorpos antinúcleo IgG e IgE em 21 pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) e em 26 controles, determinados por Teste de Imunofluorescência Indireta.

Isotipo de anticorpo	Controles (%)	LES (%)
FAN-IgG	0/26 (0)	21/21 (100)
FAN-IgE	0/26 (0)	15/21 (71)

5.2. Anticorpos anti-DNA nativo.

Onze de 21 (52%) amostras de soros de pacientes com LES foram positivas no teste de ELISA, para anticorpos anti-DNA fita dupla da classe IgG, apresentando acima de 139 UI/ml. A mediana de anticorpos neste grupo de soros positivos foi 777 UI de anticorpos anti-DNA/ml (figura 1). A sensibilidade diagnóstica deste teste correspondeu a 35,5%.

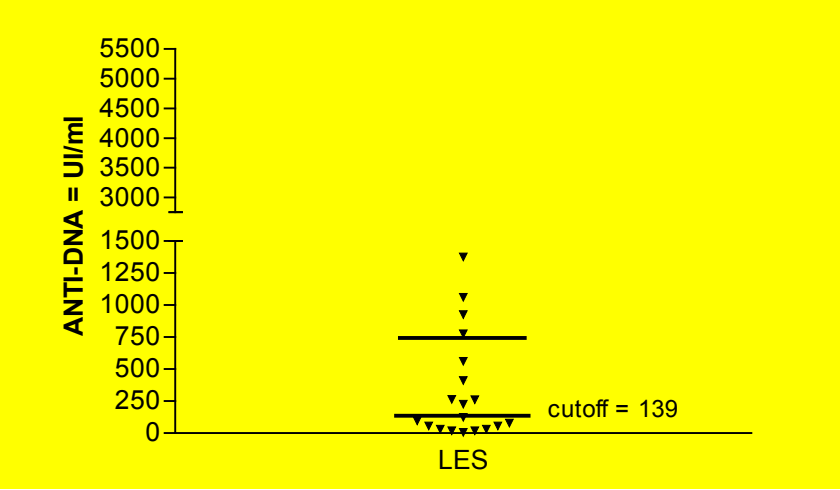

Figura 1. Freqüência de anticorpos anti-DNA fita dupla da classe IgG determinados por ELISA, nos soros de pacientes portadores de Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES). A barra horizontal superior corresponde à mediana dos valores.

5.3. Anticorpos IgG anti-ENA

Dos 21 soros de pacientes com LES testados pela técnica de ELISA para IgG anti-ENA, 14 foram positivos para pelo menos um dos auto-anticorpos investigados (Sm, RNP, SSA ou SSB). Destes soros, 7/21 foram positivos para SSA (mediana = 126,5 UI/ml), 3/21 positivos para SSB (mediana = 44 UI/ml), 4/21 para Sm (mediana = 93 UI/ml) e 12/21 para RNP (mediana = 158 UI/ml) (tabela 2 e figura2). Entre os 14 soros testados positivos para IgG anti-ENA, 4 apresentaram uma única especificidade (SSA, n = 2 e RNP, n = 2), 8 reagiram com dois ENAs simultaneamente (SSA, SSB, n = 3, Sm, RNP, n = 3 e SSA/snRNP, n = 2), enquanto os outros 2 reagiram com três tipos de auto-anticorpos (SSA, SSB, RNP e SSA, Sm,RNP). A sensibilidade diagnóstica dos testes para anticorpos IgG anti-ENA foram 7,7% para anti-SSB, 10,5% para anti-Sm, 20% para anti-SSA e 40% para anti-RNP

Tabela 2. Freqüência e especificidade antigênica dos anticorpos IgG anti-ENA (ELISA), nos soros de 21 pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES)

Especificidade antigênica	Freqüência (%)
SSA/Ro	07/21 (33,3)
SSB/La	03/21 (14,3)
Sm	04/21 (19)
RNP	12/21 (57,1)

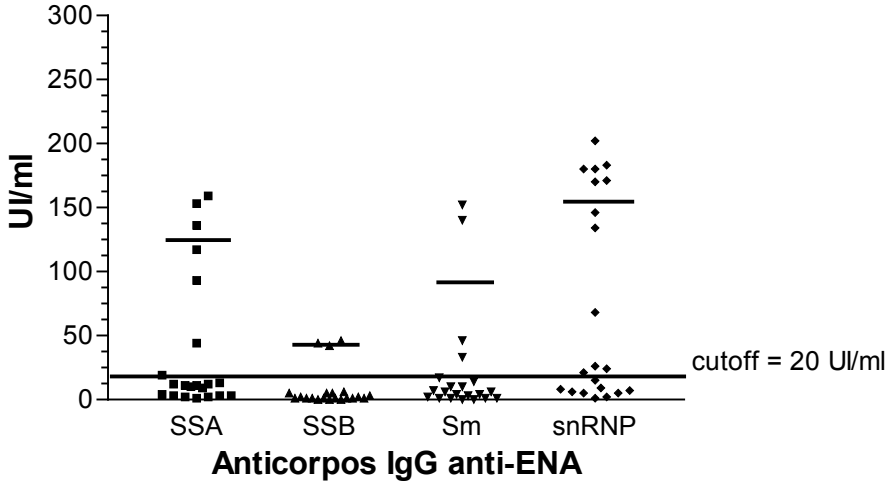

Figura 2. Títulos de anticorpos IgG para antígenos ENA (SSA, SSB, Sm, RNP) determinados por testes de ELISA indireto nos soros de pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES). As barras horizontais correspondem às medianas dos soros positivos (títulos acima de 20 UI/ml).

5.4. Anticorpos IgE anti-ENA

Vinte amostras de soros de LES foram avaliadas para anticorpos IgE anti-ENA, 8 apresentando reações positivas nos testes de ELISA. Destas, 6 reagiram com RNP (mediana = 0,223), duas com Sm e duas, apenas com SSA e SSB, respectivamente. Duas amostras reagiram com mais de um antígeno (SSA, Sm, RNP e Sm,RNP). Reações positivas com soros controles foram verificadas em apenas 1 amostra, que reagiu com o auto-antígeno SSB e RNP (tabela 3, figuras 3, 4, 5 e 6). Entre os quatro auto-anticorpos analisados, apenas para IgE anti-RNP foi observada uma diferença significativa comparando-se as absorbâncias de todos os soros controles e de LES (teste U de Mann-Whitney, U= 113.5, P = 0.0012).

A sensibilidade diagnóstica foI de 2,5% para anticorpos anti-SSA e anti-SSB; 5,3% para anti-Sm e 17,6% para anti-RNP. Por sua vez, a especificidade diagnóstica correspondeu a 100% nos testes de anticorpos anti-Sm e anti-SSA, e 95% para os testes de IgE anti-SSB e anti-RNP.

Tabela 3. Freqüência de anticorpos IgE anti-ENA (ELISA) no soro de pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) e nos controles.

Especificidade antigênica	Controles (%)	LES (%)
SSA	0/26 (0)	1/21 (4,8)
SSB	1/26 (3,8)	1/21 (4,8)
Sm	0/26 (0)	2/21 (9,5)
RNP	1/26 (3,8)	6/21 (28,6)

5.5. Níveis séricos de IgE total.

Dos 21 pacientes com LES, seis (29%) apresentaram níveis de IgE total elevados, acima do valor de referência de 150 UI/ml, com mediana igual a 426 UI/ml.

5.6. Análises de correlação.

Existiu uma correlação nos soros de LES apenas para anticorpos anti-RNP e alguns parâmetros sorológicos: entre os títulos de FAN-IgG e os títulos dos soros positivos para anticorpos IgG anti-RNP ($r = 0.796$, $P = 0.0020$); entre os títulos de anticorpos IgE anti-RNP e os níveis de IgE séricos totais (teste de Spearman , $r = 0.680$, $P = 0.0007$), e também entre os títulos em ELISA de IgG e IgE anti-RNP, quando avaliados por este mesmo teste estatístico ($r = 0.594$, $P = 0.0045$).

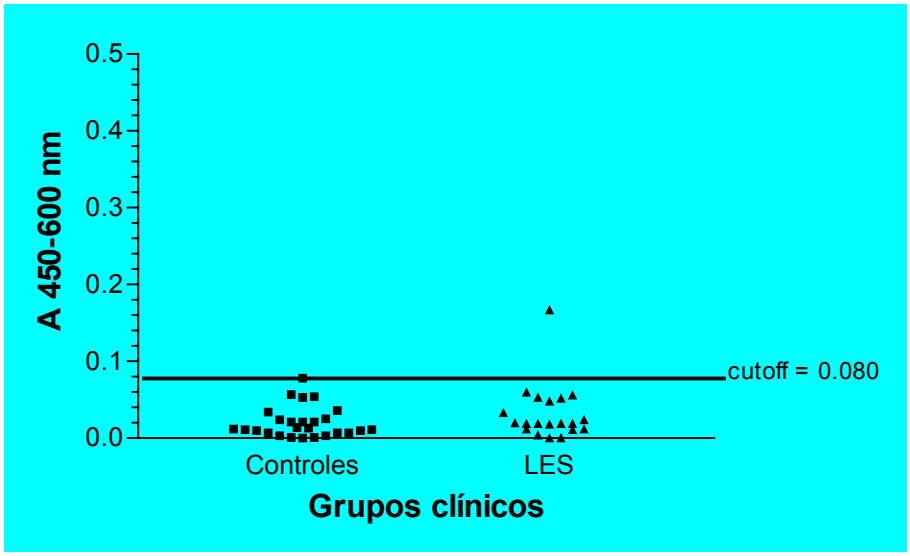

Figura 3. Títulos de auto-anticorpos anti-SSA da classe IgE, determinados por ELISA indireto, dos soros controles e de pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES).

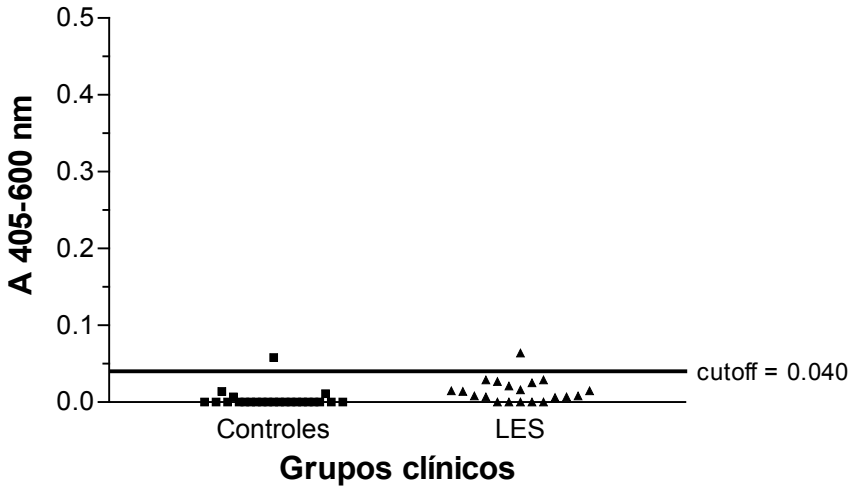

Figura 4. Títulos de auto-anticorpos anti-SSB da classe IgE, determinados por ELISA indireto, dos soros controles e de pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES).

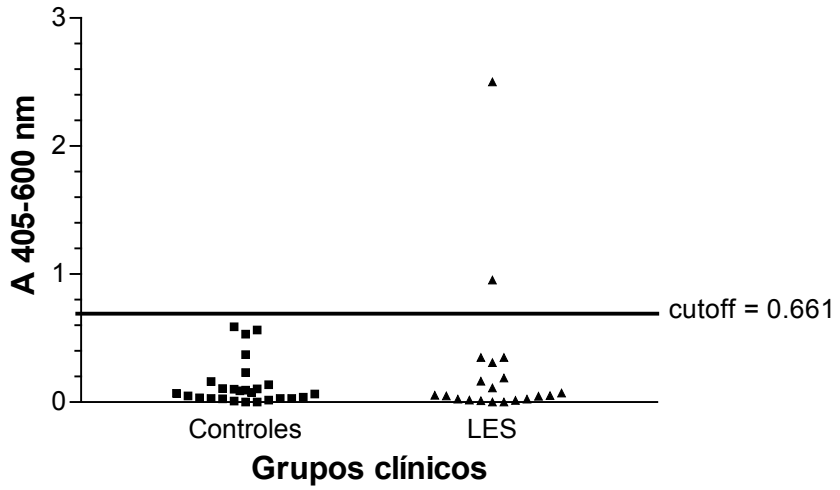

Figura 5. Títulos de auto-anticorpos anti-Sm da classe IgE, determinados por ELISA indireto, dos soros controles e de pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES).

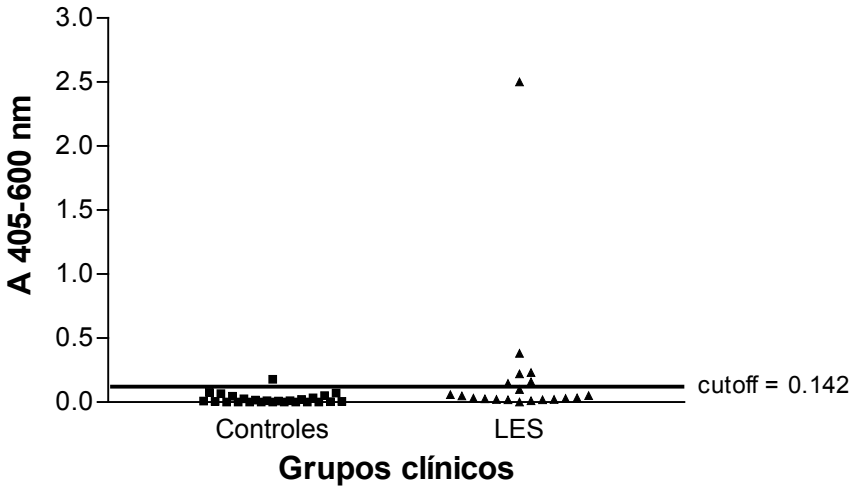

Figura 6. Títulos de auto-anticorpos anti-ENA (RNP) da classe IgE, determinados por ELISA indireto, dos soros controles e de pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES).

6.0. DISCUSSÃO

O LES é uma doença auto-imune caracterizada principalmente por inflamação sistêmica, presença de complexos imunes, e exuberante produção de anticorpos de diferentes especificidades, em particular contra auto-antígenos celulares, nucleares e citoplasmáticos.

Neste estudo, 100% dos indivíduos com LES apresentaram FAN-IgG positivo em IFI com células HEp-2, concordando com relatos prévios mostrando uma sensibilidade deste teste superior a 95% em pacientes com esta doença (Kavanaugh et al., 1999; Wanchu, 2000). No entanto, FAN-IgG pode ser observado em outras enfermidades, principalmente doenças auto-imunes sistêmicas e hepatites de base imunológica, ou mesmo em pessoas sadias idosas (Maddison ,2002; Tan et al., 1997; Xavier et al., 1995).

Resultados de FAN-IgE positivos foram observados com menor freqüência, em 71% dos pacientes, sem que tivesse sido detectado neste estudo soros de controles sadios reagindo neste teste. Por outro lado, confirmando relato anterior (Atta et al., 2004), a positividade para FAN-IgG ou FAN-IgE não esteve associada com os níveis de IgE sérica total dos pacientes com LES, discordando de observações recentes de que pacientes com LES apresentam uma correlação positiva entre os níveis de IgE e títulos de FAN (Sekigawa et al., 2003).

A presença de um resultado de FAN positivo é uma evidência sorológica da existência de auto-anticorpos dirigidos principalmente contra proteínas nucleares que participam ativamente da maquinaria envolvida com a síntese protéica, como o splicing de precursores de mRNA (Pen et al., 1997).

No presente estudo, foi observado que dos 21 pacientes com LES avaliados, apenas 7 não apresentaram algum tipo de auto-anticorpo IgG para ENA (SSA, SSB, Sm ou RNP). Auto-anticorpos IgG anti-ENA dirigidos para o antígeno SSA foram detectados em 30% dos portadores de LES, enquanto apenas um soro reagiu no teste de ELISA para anticorpos IgE anti-SSA, mostrando que este antígeno não é bom indutor de anticorpos deste isotipo. Freqüência semelhante de IgG anti-SSA tem sido verificada em vários estudos, envolvendo diferentes etnias, como aqueles realizados com populações européias e americanas (Font et al. ,2004; Sanchez-Guerrero et al., 1996).

Anticorpos IgG anti-SSA têm sido associadas principalmente com fotossensibilidade em pacientes com LES e estão envolvidos na imunopatogênese do bloqueio cardíaco congênito na síndrome de lúpus neonatal em filhos de mães lúpicas, devido a passagem transplacentária destas imunoglobulinas para o feto (Egner, 2000).

Anticorpos IgG anti-SSB foram detectados em apenas 3 soros, que também foram positivos para anticorpos IgG anti-SSA. Aparentemente, anticorpos IgG antinúcleo com esta especificidade não são freqüentes no LES, e quando encontrados, têm sido associados com eritema malar, fotossensibilidade, lesões cutâneas subagudas, artrite, serosite e trombose. Tais imunoglobulinas anti-SSB são mais facilmente encontradas na Síndrome de Sjögren, associadas aos anticorpos anti-SSA. Nesta doença auto-imune, tem sido sugerido que níveis aumentados dos auto-antígenos SSA e SSB são produzidos durante apoptose, os quais não são eficientemente eliminados por defeito no sistema de *clearance*, causando um acúmulo de suas formas

imunogênicas e estimulação na produção de seus auto-anticorpos correspondentes (Paassen et al., 2003). Contudo, as causas da presença de auto-anticorpos anti-SSB em um soro controle, respectivamente, não podem ainda ser determinadas.

A sensibilidade do teste de anticorpos IgG anti-Sm no presente trabalho foi de 20%, concordando com os resultados de vários estudos populacionais (Migliorini et al., 2005). A detecção de anticorpos anti-Sm é um dos critérios imunológicos de classificação de LES (Hochberg, 1997) , sendo considerada altamente especifica no diagnóstico desta doença reumatológica. Embora tais anticorpos tenham sido inicialmente associados com nefrite lúpica e/ou fotossensibilidade, estudos mais recentes têm contestado de forma inequívoca tais resultados, existindo contudo evidências da maior prevalência destes anticorpos em mulheres negras, afroamericanas e afrocaribenhas (Benito-Gracia et al., 2004).

Anticorpos IgE anti-Sm foram detectados em 2 soros de LES também reativos para anticorpos IgG com esta especificidade. Sabe-se que anticorpos anti-Sm constituem uma população heterogênea de imunoglobulinas que reagem com complexos formados de RNAs U1, U2, U4-6 e U5 e proteínas (B, B`, D, E, F e G), envolvidos em pré-mRNA *splicing*. No LES, a principal especificidade dos anticorpos anti-Sm é dirigida contra as proteínas B/B´, D1 e D3, reagindo com menor freqüência com a proteína D2 (Migliorini et al., 2005). O alto cutoff obtido na detecção de anticorpos IgE anti-Sm, usando os soros de doadores sadios, pode ser conseqüência de anticorpos dirigidos para a proteína viral EBVN1 do vírus EBV nesta população, que reagem cruzadamente com o antígeno SmD (Migliorini et al., 2005). Assim, torna-se

necessário a caracterização imunoquímica da especificidade dos anticorpos IgE detectados nos pacientes de LES, por técnicas do tipo western immunoblotting, identificando a localização dos epitopos envolvidos nesta reação.

Auto-anticorpos IgG anti-RNP apresentaram a maior freqüência sorológica entre os anticorpos anti-ENA no grupo de LES (57%), um pouco acima daquelas anteriormente descritas para estas imunoglobulinas (Font et al., 2004, Sanchez-Guerrero et al.,1996), existindo contudo uma correlação positiva entre os títulos de FAN-IgG e os títulos de anticorpos anti-RNP destes soros reativos. Por sua vez, auto-anticorpos IgE anti-RNP foram detectados em 30% dos soros de LES, todos possuindo anticorpos IgG com esta especificidade.

Anticorpos IgG anti-RNP são dirigidos para complexos que, à semelhança dos antígenos Sm, são também formados de RNA nuclear U1 complexado com proteínas nucleares denominadas de A, C e 70 k e um elenco de polipeptídeos, que inclui um core comum de polipetídeos Sm (B/B´, D1, D2, D3, E, F e G) (Migliorini et al., 2005). Estes auto-anticorpos ocorrem em cerca de 40% dos pacientes com LES, e na grande maioria dos pacientes com DMTC, que é caracterizada clinicamente por inflamação muscular, esclerodermia e manifestações de LES com pouco envolvimento renal. Diferentemente do LES, esta doença cursa com ausência ou baixa freqüência de anticorpos anti-DNA nativo (Paassen et al., 2003). À semelhança dos anticorpos anti-Sm, anticorpos IgG anti-RNP são mais freqüentes em mulheres negras afroamericanas e afrocaribenhas (Benito-Garcia et al., 2004).

Estes achados e as correlações encontradas entre IgE total e anticorpos IgE anti-RNP e entre anticorpos IgG e IgE com especificidade para este auto-antígeno ENA, sugerem a existência de uma estimulação antigênica sustentada comum dos linfócitos B por estas ribonucleoproteínas, capaz de induzir mudança no isotipo dos anticorpos. Contudo, as especificidades destas duas classes de anticorpos anti-RNP só poderão ser elucidadas em futuras abordagens imunoquímicas com extratos antigênicos de pequenas ribonucleoproteínas contendo os antígenos U1-A, U1-C e U1-70k. Por sua vez, os anticorpos IgG e IgE anti-RNP devem ser mais investigados em estudos populacionais brasileiros para esclarecer se os resultados aqui obtidos devem-se a uma característica imunológica particular dos pacientes lúpicos avaliados.

A freqüência de anticorpos IgG anti-DNA nativo observada neste trabalho (52%) foi compatível com aquelas previamente relatadas (Kavanaugh et al., 2000, Wanchu, 2000; Egner, 2000). Embora 8 dos 11 soros contendo anticorpos anti-DNA nativo apresentassem títulos considerados fortemente positivos (acima de 370 UI/ml), não existiu correlação entre os mesmos e os títulos de FAN-IgG, níveis de anticorpos IgG ou IgE anti-ENA, ou IgE total. Altos títulos de anticorpos anti-DNA podem ser causados ocasionalmente por anticorpos dirigidos para epitopos de DNA fita simples, os quais não possuem nenhuma importância diagnóstica. Contudo, o teste de ELISA usado neste estudo é de alta especificidade, utilizando na fase sólida apenas DNA fita dupla altamente purificado, não tendo sido observado em estudos prévios realizados na INOVA Diagnostics reações inespecíficas com soros de pacientes contendo anticorpos anti-DNA desnaturado.

Anticorpos anti-DNA nativo são considerados os melhores marcadores sorológicos de atividade da doença, e podem ser detectados antes do diagnóstico clínico do LES (Arbuckle et al., 2001). A elevação dos títulos de anticorpos anti-DNA nativo está associada especialmente com a nefrite lúpica classes III e IV, que se caracterizam por proliferação focal e difusa, respectivamente (Esdaile, 2002; Cervera, 2005).

Finalmente, os resultados aqui apresentados abrem novas perspectivas no estudo da soroepidemiologia do lúpus eritematoso sistêmico na nossa população, procurando identificar marcadores sorológicos e aspectos clínicos associados aos mesmos, possibilitando no futuro a definição de protocolos de diagnóstico clínico e laboratorial mais eficientes e possíveis de serem aplicados em serviços públicos de assistência à saúde humana no Estado da Bahia.

7.0. CONCLUSÕES

7.1 Anticorpos IgG anti-ENA, para os auto-antígenos SSA, SSB e Sm, podem ser detectados em pacientes baianos com LES com freqüências semelhantes àquelas descritas em estudos populacionais de diferentes etnias.

7.2 Os auto-antígenos SSA e SSB estimulam preferencialmente auto-anticorpos do isotipo IgG.

7.3 Anticorpos IgE anti-Sm e IgE anti-RNP podem ser detectados em pacientes com LES.

7.4 Existe uma relação direta entre títulos de anticorpos IgG antinúcleo e anticorpos IgG anti-RNP nos pacientes avaliados. Esta relação pode também ser demonstrada entre os anticorpos IgG e IgE com esta especificidade.

7.5 Anticorpos IgG anti-DNA nativo e anti-RNP são marcadores sorológicos sensíveis de LES nesta população, devendo ser incluídos na rotina laboratorial de pacientes com suspeita clínica desta doença e soropositivos para FAN-IgG.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ARBUCKLE, M. R.; JAMES, j. A.; KOHLHASE, K. F. *et al*. **Development of Anti-dsDNA Autoantibodies Prior to Clinical Diagnosis of Systemic Lupus Erythematosus**. Scandinavian Journal of Immunology , 54: 211-219, 2001.

ATTA A. M.; CARVALHO E. M.; SOUSA C. P. *et al*. **Immunoglobulin E and Systemic Lupus Erythematosus**. Brazilian Journal of Medical and Biological Research; 37: 1497-1501, 2004.

BENITO-GARCIA, E.; SCHUR P. H.; LAHITA, R. **Guidelines for Immunologic Laboratory Testing in the Rheumatic Diseases: Anti-Sm and Anti-RNP Antibody Tests.** Arthritis & Rheumatism; 51: 1030-1044, 2004.

BONGU, A.; CHANG, E. RAMSEY-GOLDMAN, R. **Can Morbidity and mortality of SLE be Improved?** Best Practices & Research in Clinical Rheumatology; 16: 313-32, 2002.

BRASINGTON, R. D.; KAHL, L. E.; RANGANATHAN, P. *et al.* **Immunologic Rheumatic Disorders.** Journal of Allergy and Clinical Immunology; 111:S593-601, 2003.

BURLINGAME, R. W.; CERVERA, R. **Anti-chromatin (Anti-nucleosome) Autoantibodies.** Autoimmunity Reviews; 1:321-328, 2002.

CERVERA, R.; VIÑAS, O.; RAMOS-CASALS, M. *et al.* **Anti-chromatin antibodies in systemic lupus erythematosus: a useful marker for lupus nephropathy.** Annals of The Rheumatic Diseases; 62:431–434, 2003.

CERVERA, R. **Systemic Lupus Erythematosus in Europe at the Change of the Millenium: Lessons from the "Euro-Lupus Proje CT".** Autoimmunity Reviews, 2005.

CERVERA, R.; KHAMASHTA, M. A.; FONT, J. *et al*. **Systemic Lupus Erythematosus: Clinical and Immunologic Patterns of Disease Expression in a Cohort of 1,000 Patients.** Medicine; 72: 113-124, 1993.

EGNER, W. **The Use of Laboratory Tests in the Diagnosis of SLE.** Journal of Clinical Pathology; 53:424-432, 2000.

ESDAILE, J. M. **How to Manage Patients with Lupus Nephritis.** Best Practice & Research Clinical in Rheumatology; 16: 195-210, 2002.

FERNANDO, M. M.; ISENBERG, D. A. **How to Monitor SLE in Routine Clinical Pratice.** Annals of The Rheumatic Diseases; 64: 524-527, 2005.

FONT, J.; CERVERA, R.; RAMOS-CASALS, M. *et al*. **Clusters of Clinical and Immunologic Features in Systemic Lupus Erythematosus: Analysis of 600 Patients from a Single Center.** Seminars in Arthritis and Rheumatism; 33: 217-30, 2004.

FUENTE, H.; RICHAUD-PATIN, Y.; JAKEZ-OCAMPO, J. *et al*. L. **Innate immune Mechanisms in the Pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus (SLE).** Immunology Letters; 77: 175-180, 2001.

GERLI, R., CAPONI, L. TINCANI, A. *et al*. **Clinical and serological associations of ribosomal P autoantibodies in systemic lupus erythematosus: prospective evaluation in a large cohort of Italian patients**. Rheumatology; 41: 1357-1366, 2002.

GÓMEZ, D.; CORREA, P. A.; GÓMEZ, L. M. *et al*. **Th1/Th2 Cytokines in Patients with Systemic Lupus Erythematosus: Is Tumor Necrosis Factor α Protective?** Seminars in Arthritis and Rheumatism; 33: 404-413, 2004.

GRUBER, B.L.; KAUFMAN, L.D.; MARCHESE, M.J. *et al.* **Anti-IgE autoantibodies in systemic lupus erythematosus**. Arthritis and Rheumatism; 31: 1000-1006, 1988.

HAHN, B.H. **Pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus**. In: Kelley, W.N., Harris Jr, E.D., Ruddy, S. & Sledge, C.B. (Editors), *Textbook of Rheumatology*. 15 th. ed. Philadelphia PA, Saunders Company, **63**: 1015, 1997.

HILDEBRAND, J.; MULLER, D. **Systemic Lupus Erythematosus.** eMedicine Journal. 2: 11, 2001.

HOCHBERG, M.C. **Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus**. Arthritis and Rheumatism; 40: 1725-1734, 1997.

HOFFMAN, I. E. A.; PEENE, I.; MEHEUS, L. *et al*. **Specific Antinuclear are Associated with Clinical Features in Systemic Lupus Erythematosus.** Annals of The Rheumatic Diseases; 63: 1155-1158, 2004.

HOFFMAN, R. W. **T Cells in the Pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus.** Clinical Immunology; 113: 4-13, 2004.

KAVANAUGH, A.; TOMAR, R.; REVEILLE, J. *et al.* **Guidelines for Clinical Use of the Antinuclear Antibody Tes and Test for Specific Autoantibodies to Nuclear Antigens.** Archives of Pathology and Lab oratory Medicine; 124: 71-81, 1999.

KOSHY, M.; BERGER, D.; CROW, M. K. **Increased Expression of CD40 Ligand on Systemic Lupus Erythematosus Lymphocytes**. Journal of Clinical Investigation; 98: 826-37, 1996.

LAHITA, E.G. **Clinical Presentation of Systemic Lupus Erythematosus**. In: Kelley, W.N., Harris Jr, E.D., Ruddy, S. & Sledge, C.B. (Editors), *Textbook of Rheumatology*. 15 th. ed. Philadelphia PA, Saunders Company, **64**: 1028, 1997.

LAURENT, J.; LAGRUE, G.; SOBEL, A. **Increased Serum IgE Levels in Patients with Lupus Nephritis**. American Journal of Nephrology; 6: 413-414, 1986.

LIU, C.C., MANZI, S., AHEARNAND, J. M. *et al*. **Biomarkers for systemic lupus erythematosus: a review and perspective**. Current Opinion in Rheumatology; 17:543-549, 2005.

LOIZOU, S.; SAMARKOS, M; NORSWORTHY, P.J. *et al*. **Significance of Anticardiolipin and Anti-β_2-glycoprotein I Antibodies in Lupus Nephritis.** Rheumatology; 39: 962-968, 2000.

MADDISON, P. J. **Is it SLE?** Best Practice & Research Clinical Rheumatology; 16: 167-180, 2002.

MAHLER, M.; BLUTHNER, M.; POLLARD, K. M. **Advances in B-cell Epitope Analysis of Autoantigens in Connective Tissue diseases.** Clinical Immunology; 107: 65-79, 2003.

MCPHAUL JR, J.J.; NEWCOMB, R.W.; MULLINS, J.D. *et al*. **Participation of Immunoglobulin E (IgE) in Immune-Mediated Glomerulonephritis**. Kidney International; 5: 292-299, 1974.

MIGLIORINI, P.; BALDINI, C.; ROCCHI, V. *et al*, **Anti-Sm and anti-RNP antibodies**. Autoimmunity; 38: 47-54, 2005.

MOK, C. C.; LAU, C. S. **Pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus**. Journal of Clinical Pathology; 56: 481-490, 2003.

MOLOKHIA, M.; MCKEIGUE, P. M.; CUADRADO, M. *et al*. **Systemic Lupus Erythematosus in Migrants from West Africa Compared with Afro-Caribbean People in the UK.** The Lancet; 357: 1414-1415, 2001.

OLAUSSEN, E.; REKVIG, O. P. **Screening Test for Antinuclear Antibodies (ANA): Selective Use of Central Nuclear Antigens as a Rational Basis for Screening by ELISA.** Journal of Autoimmunity; 13: 95-102, 1999.

PASSEN, P.; DAMOISEAUX, J.; TERVAERT, J. W. C. **Laboratory Assessment in Musculoskeletal Disorders.** Best Practices & Research Clinical Rheumatology; 17: 475-494, 2003.

PENG, S. L.; MOSLEHI, J.; CRAFT, J. **Roles of Interferon-γ and Interleukin-4 in Murine Lupus.** Journal of Clinical Investigation; 99: 1936-46, 1997.

PETRI, M. **Epidemiology of Systemic Lupus Erythematosus.** Best Practice & Research Clinical Rheumatology; 16: 847-858, 2002.

PHAN, T. G.; WONG, R. C. W.; ADELSTEIN, S. **Autoantibodies to Extractable Nuclear antigens: Making Detection and Interpretation more Meaningful.** Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology; 9: 1-7, 2002.

REBHUN, J.; QUISMORIO, F. Jr.; DUBOIS, E. *et al*. **Systemic Lupus Erithemathosus Activity and IgE.** Annals of Allergy; 50: 34-36, 1983.

RIEMEKASTEN, G. & HAHN, B.H. **Key autoantigens in SLE**. Rheumatology; 44: 975-982, 2005.

ROBSON, M. G.; WALPORT, M. J. **Pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus (SLE).** Clinical and Experimental Allergy; 31: 678-685, 2001.

ROMAGNANI, S. **Limphokine Production by Human T Cells in Disease State.**
Annual Reviews of Immunology; 12: 227-57, 1994.

ROOD, M.J.; VAN DER VELDE, E.A.; CATE, R.T. *et al.* **Female Sex Hormones at the Onset of Systemic Lupus Erythematosus Affect Survival**. British Journal of Rheumatology; 37: 1008-1010, 1998.

SATO, E. I.; BONFÁ, E. D.; COSTALLAT, L. T. L. *et al.* **Consenso Brasileiro para o Tratamento do Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES).** Revista Brasileira de Reumatologia; 42: 2002.

SANCHEZ-GUERRERO, J.; LEW, R. A.; FOSSEL, A. H. *et al*. **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 and Rheumatism; 39: 1055-1061, 1996.

SCHATTNER, E.; ELKON, K. B.; TUMANG, J. *et al*. **Signaling through the B cell antigen CD40 induces Apo I expression on human B lymphocytes and facilitates malignant B cell death**. Journal of Experimental Medicine; 182: 1557-65, 1995.

SEKIGAWA, I.; TOKANO, Y.; YOSHIIKE, T. e*t al*. **Relationship between Serum IgE and autoatibody Levels in SLE Patients.** Clinical Experimental Rheumatology; 21: 683, 2003.

SLATER, C.A.; DAVIS, RB,; SHMERLING, RH. **Antinuclear Antibody Testing: A Study of Clinical Utility**. Archives of Internal Medicine; 156: 1421-1425, 1996.

SWAAK A..J; HUYSEN V; SMEEKEN R.J; **Antinuclear antibodies in routine analysis: the relevance of putative clinical associations.** Annals of The Rheumatic Diseases; 1993: 52: 110 – 114, 1993.

TAN, E. M.; FELTKAMP, T. E. W.; SMOLEN, J. S.; *et al*. **Range of Antinuclear Antibodies in "Healthy" Individuals.** Arthritis and Rheumatism; 40: 1601-1611, 1997.

TAN, E. M.; SMOLEN, J. S.; MCDOUGAL, J. S. *et al*. **A Critical Evaluation of Enzyme Immunoassays for Detection of Antinuclear Autoantibodies of Defined Specificities.** Arthritis and Rheumatism; 42: 455-464, 1999.

TUMA, S.N.; LIACH, F.; SOSTRIN, S. *et al*. **Glomerular IgE Deposits in Patients with Lupus Nephritis**. American Journal of Nephrology; 1: 31-36, 1981.

VAKKALANKA, R. K.; WOO, C.; KIROU, K. A. *et al*. **Elevated Levels and Functional Capacity of Soluble cd40 Ligand in Systemic Lupus Erythematosus Sera**. Arthritis and Rheumatism; 42(5): 871-881, 1999.

WALPORT, M.J. **Complement and systemic lupus erythematosus.** Arthritis Research; 4 (suppl 3): S279-S293, 2002.

WANCHU, A. **Antinuclear Antibodies: Clinical Applications.** Journal of Postgraduate Medicine; 46: 144-148, 2000.

WARD, M. M.; POLISSON, R. P. **A Meta-Analysis of the Clinical Manifestations of the Older-onset Systemic Lupus Erythematosus**. Arthritis and Rheumatism; 32: 1226-1232, 1989.

XAVIER, R. M.; YAMAUCHI, Y.; NAKAMURA, M. *et al*. **Antinuclear Antibodies in Healthy Aging People: A Perspective Study.** Mechanism of Ageing and Development; 78: 145-154, 1995.

ZIEVE, G.W. & KHUSIAL, P.R. **The anti-Sm immune response in autoimmunity and cell biology**. Autoimmunity Reviews; 2: 235-240, 2003.