

Título: Detecção de anticorpos anti-dsDNA no Lupus eritematoso sistémico

Autor: Sara Maria Baptista Machado Moreira Ribeiro

Afiliação: Estudante do Curso de Mestrado Integrado em Medicina da
Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Portugal

Endereço: Rua Augusto Marques Bom, nº105 andar 6.1

3030-218 Coimbra

Sarabaptistaribeiro@gmail.com

*Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos
requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre de Medicina, sob
orientação científica do Doutor Jorge Manuel Gonçalves da Silva*

Índice

Legenda de siglas	4
Resumo	5
Abstract	7
Introdução	9
Material e métodos	11
Resultados	13
Discussão dos resultados	27
Conclusão	30
Agradecimentos	33
Referências bibliográficas	34

Legenda de Siglas

ACR - American College of Rheumatology

ANA - Anticorpos antinucleares

CLIA - Imunoensaio Quimioluminescente

CLIF - Imunofluorescência com Crithidia Luciliae

ELISA - Ensaio enzimático de imunoabsorção

EBV - Virus Epstein-Barr

FAN-Hep-2 - Imunofluorescência indirecta em células HEp-2

FARR-RIA - Radioimunoensaio de Farr

FEIA - Fluoroimunoensaio enzimático

LES - Lupus eritematoso sistémico

MPO - Mieloperoxidase

PCR - Proteína C reactiva

PEG - Polietilenoglicol

PEG-RIA - Radioimunoensaio de PEG

SPR - Espectrometria de ressonância de plasma de superfície

TMB - Tetrametilbenzidina

VS - Velocidade de sedimentação

Resumo

O lúpus eritematoso sistémico (LES) é uma doença inflamatória auto-imune, multissistémica caracterizada por desenvolver uma grande variedade de manifestações clínicas e imunológicas. Foram analisados e comparados os diversos resultados de vários ensaios como os de **imunofluorescência com Crithidia Luciliae (CLIF)**, com a sua elevada especificidade e sensibilidade mas que porém não fornece dados quantitativos, o **radioimunoensaio de Farr** que apesar de ser considerado o *gold standard* [10] utiliza material radioactivo, tal como o **radioimunoensaio de PEG** sendo que este no entanto não se apresenta tão específico como o radioimunoensaio de Farr, os **ensaios enzimáticos de imunoabsorção (ELISA) clássicos**, que apesar da sua alta sensibilidade apresentam uma especificidade mais baixa e detectam anticorpos de alta e de baixa avidéz e **ELISAs de segunda geração** que apareceram como uma alternativa perante as desvantagens dos ensaios já referidos, tendo vindo a substituir o radioimunoensaio de Farr em muitos laboratórios. Os ensaios **multiplex, microarray** e **Espectrometria de ressonância de plasma de superfície (SPR)** são técnicas promissoras que tem vindo a surgir nos últimos 10 anos, mas que ainda precisam de mais estudos e aperfeiçoamento. Conclui-se que na escolha do melhor método para a detecção de anticorpos anti-dsDNA é necessário considerar múltiplos factores tendo em atenção os objectivos do método (diagnóstico, follow-up e prognóstico) a sensibilidade, especificidade, avidéz, automatização, standardização, a qualidade dos reagentes, a qualificação dos resultados, trabalhadores especializados, o suporte técnico disponível nos laboratórios e o custo do exame.

Palavras chave: lúpus eritematoso sistémico; anti-dsDNA; imunofluorescência com Crithidia Luciliae (CLIF); radioimunoensaio de Farr; radioimunoensaio PEG; ensaios

enzimáticos de imunoabsorção (ELISA); multiplex; microarray; espectrometria de ressonância de plasma de superfície (SPR)

Abstract

The systemic lupus erythematosus (SLE) is an multisystemic inflammatory autoimmune disease, known to develop a series of clinical and immunological manifestations. Several immunoassays were analyzed and compared like the **immunofluorescence with Chrithidia Lucilae (CLIF)**, with its high specificity and sensitivity but which will not access quantitative data, the **radioimmunoessay of Farr**, which, however being considered the gold standard [2] uses radioactive matter, as does the **radioimmunoessay of PEG**, while this is not as specific as the radioimmunoessay of Farr, the **classical enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)**, in spite of its high sensitivity have a lower specificity when detecting antibodies of high and low avidity, and the **second generation ELISA**, which are an alternative against the other assays disadvantages mentioned above, becoming a substitute for the radioimmunoessay of Farr in several laboratories. The **multiplex assays, microarrays** and **surface plasmon resonance (SPR) spectroscopy** are promising technics which have appeared in the last decade, but which still need more studies and perfecting.

It can be inferred the need to consider several factors when choosing the best method for antibody anti-dsDNA detection, taking into account the aim of the diagnosis, the follow-up and the prognosis, the sensitivity, specificity, avidity, its automatization and standardization, the quality of the reagents, the qualification of the results, the necessity of qualified professionals, technical support available at the laboratories and, ultimately, the costs of the assay.

Keywords: systemic lupus erythematosus; anti-dsDNA; immunofluorescence with Chrithidia Lucilae; radioimmunoessay of Farr; radioimmunoessay of PEG, enzyme-linked immuno

sorbent assay (ELISA); multiplex, microarray, surface plasmon resonance (SPR)
spectroscopy

Introdução

O lúpus eritematoso sistémico (LES) é uma doença inflamatória auto-imune, multissistémica que se caracteriza pela deposição local de complexos imunes, iniciando processos inflamatórios e causando lesão tecidual [1,2].

Tal como para a maioria das outras doenças reumáticas inflamatórias, o American College of Rheumatology (ACR) estabeleceu um conjunto de 11 critérios para classificação do LES, sendo que a detecção simultânea ou sequencial de 4 ou mais, num determinado período de observação, estabelece o diagnóstico de LES [3]. São eles, o exantema malar, exantema discóide, fotossensibilidade, úlceras orais, artrite, serosite, afecção renal, afecção neurológica, afecção hematológica, afecção imunológica e anticorpos antinucleares [2,3].

Geralmente para a confirmação do diagnóstico de LES faz-se um teste de triagem, baseado na técnica de imunofluorescência indirecta em células HEp-2 (FAN-Hep-2) para Anticorpos antinucleares (ANA) [4]. Caso o teste de triagem tenha uma relação positiva com a clínica do doente para o lúpus eritematoso sistémico, não serão necessários mais exames [3]. No entanto, caso esta situação não se verifique, será necessário recorrer a outro tipo de ensaios para a detecção de anticorpos específicos para o LES. Sendo estes exames também usados para monitorizar o curso da doença.

O papel dos ANAs no lúpus eritematoso sistémico está bem esclarecido, quanto á sua função na doença, heterogenicidade, indução e expressão no tempo [5]. Podem-se encontrar diversos autoanticorpos que lhe estão associados, existindo por volta de 100 tipos de autoanticorpos diferentes, porém grande parte deles são apenas identificados em menos de 30% dos pacientes [6] e nem todos têm uma boa especificidade para a doença podendo estar presentes em muitas outras, perdendo por isso a sua relevância quanto ao diagnóstico diferencial [4].

Os anticorpos anti-dsDNA são, no entanto, os anticorpos mais pesquisado no LES, sendo muitas vezes considerados patogmónicos [2]. São anticorpos cujos níveis flutuam frequentemente com a actividade da doença [5], precedem muitas vezes o seu diagnóstico (às vezes por mais de um ano) [7] e apresentam uma alta especificidade para o LES, de aproximadamente 97%, sendo os seus altos títulos raros em outras patologias sistémicas auto-imunes [6]. Por esse motivo, passaram a ser tanto um marcador diagnóstico estabelecido para LES como usados para monitorizar o curso da doença.

Também existe uma associação bem conhecida entre a presença de um título elevado de imunoglobulina G (IgG) de anticorpos anti-dsDNA e de depósitos de complexos imunes de anti-dsDNA-histonas ou anti-dsDNA-nucleossomas no glomérulo de pacientes com nefrite lúpica activa [8]. Levando os investigadores a acreditar que estes anticorpos são de uma importância primária na patogénese da nefrite lúpica [9].

Inúmeras técnicas tem sido desenvolvidas para a detecção, caracterização e quantificação o anti-dsDNA tendo as suas características revelado um grande impacto quanto a sua utilidade clínica [6]. As que se destacam são a técnica de imunofluorescência com *Crithidia Luciliae*, radioimunoensaio (de Farr e de PEG), ensaios enzimáticos de imunoabsorção (ELISAs) e os novos exames emergentes como o ensaio multiplex, o “microarray” e espectrometria de ressonância de plasma de superfície (SPR), sendo que estes necessitam de mais estudos [10,8].

O objectivo deste artigo é a revisão e avaliação dos ensaios supranumerados frisando a sua importância na prática clínica.

Material e métodos

Para conhecimento do panorama geral do interesse científico e médico na detecção do anticorpo anti-dsDNA no lúpus eritematoso sistémico, a tabela 1 ilustra a distribuição da literatura referente à problemática no período de 2003 a 2013 e de acordo com os ensaios analisados.

A pesquisa de artigos foi realizada na plataforma <http://scholar.google.pt/> utilizando-se como palavras-chave, “lupus”, “dsDNA”, “Crithidia Luciliae”, “Farr”, “ELISA”, “FEIA”, “CLIA”, “Farrzyme”, “Organtec”, “Multiplex”, “Microarray”, “SPR” e “proteómica”. As palavras foram pesquisadas separadamente, conjugadas com a palavra “comparison” ou juntas. Foram seleccionadas 50 publicações, através do título, do factor de impacto da revista e número de citações.

Os artigos seleccionados focam a relação entre os diferentes ensaios ou simplesmente referem-se a um único ensaio ao longo do corpo do texto.

Entende-se esta revisão como uma colaboração para a divulgação deste tema junto da comunidade médico-científica.

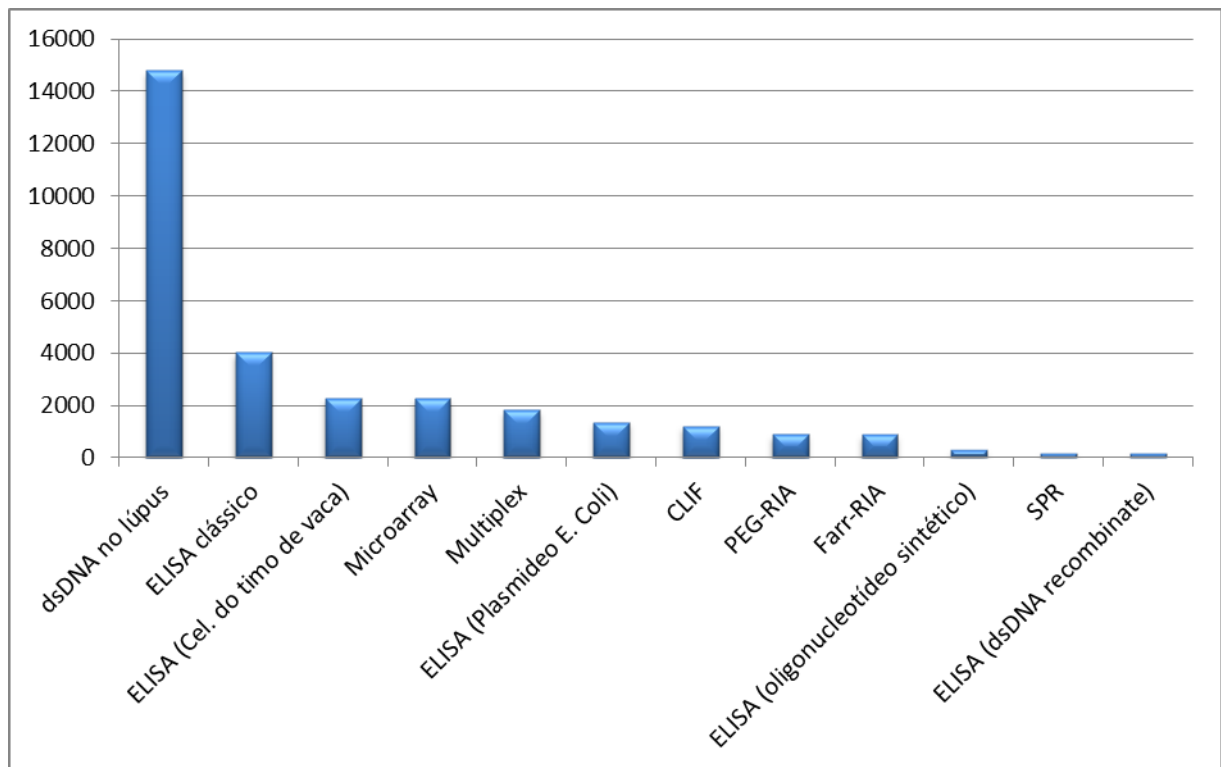


Tabela 1 - Distribuição do número de publicações de 2003 a 2013, de acordo com os diferentes ensaios disponíveis no mercado, com um total de 14800 publicações relativas ao dsDNA no lúpus eritematoso sistémico (Fontes: <http://scholar.google.pt/>).

Resultados

Durante a maior parte da história médica, o diagnóstico das doenças em geral era feito exclusivamente pelos dados clínicos, obtidos pela história e exame físico. Com a descoberta do envolvimento de anticorpos nas doenças do tecido conjuntivo, criou-se a necessidade de adaptar e criar diferentes métodos eficazes ao diagnóstico clínico.

Os mais antigos métodos usados para a detecção de anti-dsDNA, como métodos de precipitação, fixação ao complemento e hemaglutinação passiva, estão hoje em desuso e foram descartados [10] ao provarem apresentar uma sensibilidade muito baixa [8].

Cada método detecta uma parte do espectro dos anticorpos anti-dsDNA produzidos pelo paciente [11, 12]. Os métodos mais usados são a técnica de imunofluorescência indirecta com *Crithidia Luciliae*, radioimunoensaio (de Farr e de PEG) e ensaios enzimáticos de imunoabsorção (ELISAS) [10]. No entanto, nos últimos 10 anos tem-se assistido á emergência de mais estudos como o ensaio multiplex, o ensaio de “microarray” e a espectrometria de ressonância de plasma de superfície (SPR).

1. Radiomunoensaios (RIA)

Na revisão da literatura feita neste trabalho foram encontrados dois tipos de radioimunoensaio para detecção de dsDNA. Estes são o ensaio de Farr-RIA [13] e o ensaio de PEG-RIA.

1.1. Radioimunoensaio de Farr (Farr-RIA)

O radioimunoensaio de Farr (Farr-RIA) [13] é o sistema mais frequentemente utilizado na detecção de anticorpos anti-dsDNA [14]. O dsDNA radioactivamente marcado é

incubado com o soro do paciente e os complexos imunes de dsDNA/anti-dsDNA são então precipitados com uma solução de sulfato de amónio, separando assim os complexos DNA/anti-DNA do DNA livre marcado radioativamente. Os complexos de baixa avides DNA/anti-DNA são dissociados pela alta concentração de sal [10].

Este ensaio, **providencia medidas quantitativas** [6] e apenas detecta anticorpos para o dsDNA com uma **alta avides**, sendo assim, **altamente específico** para o LES, **fortemente associados às exacerbações da doença** [6] e a glomérulonefrite activa [6, 15]. No entanto, pelo mesmo motivo, as formas mais leves da doença, nas quais o paciente apresenta anticorpos para o dsDNA de baixa avides podem passar facilmente despercebidas [12].

Este é o teste considerado *gold standard* para os clínicos, e é até hoje o mais específico na discriminação entre outras doenças auto-imunes [10].

Num estudo de Smeenk [12], o valor diagnóstico de anti-dsDNA através do ensaio de Farr mostrou que grande parte dos pacientes assintomáticos, cujo resultado para anticorpos anti-dsDNA se mostrou positivo, vieram a desenvolver sintomas de lupus eritematoso sistémico no espaço de um ano.

Apesar das suas qualidades já estudadas, a utilização do ensaio de Farr pelos laboratórios tem decaído. Este facto deve-se a alguns dos seus inconvenientes como a **necessidade de utilização de material radioactivo e laboratórios devidamente preparados** [14, 6], o facto de **não poder ser automatizado** [6, 15], o **tempo que demora a fornecer resultados** e o seu **elevado custo** [10].

O radioimunoensaio de Farr também **não apresenta especificidade para os isótopos** detectando também anticorpos IgM [14] e **não está isento de reacções de falsos positivos** ao precipitar outras proteínas como o ssDNA [5].

1.2. Radioimunoensaio de Peg (PEG-Ria)

Numa alternativa ao radioimunoensaio de Farr, pode-se utilizar o radioimunoensaio de PEG (polietilenoglicol). Nele, os complexos DNA/anti-DNA são separados do DNA livre marcado radioactivamente por uma precipitação de 3.5% de polietilenoglicol. Assim, pode-se evitar a dissociação de complexos de baixa avidéz, permitindo a sua detecção [10].

No entanto, é um método que apresenta diversas desvantagens, pois os seus complexos só podem ser detectados se forem maiores que determinado tamanho, estabelecendo, por isso, **muitos falsos negativos** [12] e, tal como para o ensaio de Farr, este método **não tem especificidade para os isótopos** detectando também anticorpos IgM, a contaminação com ssDNA pode resultar em **falsos positivos**, continua a ser necessário um **marcador radioactivo**, precisando para isso de **laboratórios preparados** e é um **exame dispendioso** [14].

É também um método que se aproxima da alta sensibilidade do método de ELISA, e possui uma elevada especificidade para as exacerbações clínicas da doença, contudo esta é relativamente menor do que a especificidade atribuída ao radioimunoensaio de Farr [12]

2. Ensaio De Imunofluorescência Indirecta Com Crithidia Luciliae (CLIF)

Na técnica de imunofluorescência indirecta os anticorpos são detectados com um reagente marcado com moléculas (fluorocromo ou corante fluorescente) que têm a propriedade de absorver luz de um determinado comprimento de onda (excitação) e emitir luz fluorescente de outro comprimento de onda (emissão). Assim, os complexos imunes podem ser detectados pela emissão de luz colorida quando excitados por uma luz de comprimento de onda apropriado. Essa luz emitida pode ser vista com o auxílio de um microscópio de fluorescência equipado com uma fonte de luz UV. [16]

O imunoensaio CLIF tira vantagem das características do parasita flagelado unicelular *Crithidia Luciliae*, um microorganismo não patogénico ao ser humano que possui uma estrutura privilegiada chamada de cinoplasto (ou mitocôndria gigante), e contém um pequeno círculo de DNA que consiste exclusivamente em dsDNA. Sendo por isso, um substrato considerado com **alta especificidade**, de **moderada a alta avidéz** para anticorpos anti dsDNA [14, 10] e de sensibilidade relativamente inferior ao ensaio de Farr-RIA [15].

O método de CLIF tem a desvantagem de ser um método de **características qualitativas e não quantitativas**, tornando-o insuficiente para monitorizar a doença [15]. Existe também o facto de ter um **baixo grau de standardização e automatização**, havendo a necessidade da aplicação do teste por **profissionais experientes e qualificados** e estando os resultados sujeitos à **análise subjectiva** dos mesmos [17]. Também, em alguns estudos tem-se verificado a presença ocasional de histonas no cinoplasto e de complexos de lipoproteínas IgG na amostra o que pode conduzir a **resultados falsos positivos** [10, 11].

Em um estudo de Hu Y [18], foi sugerida uma inovação baseada nos princípios da digitalização das imagens e nas técnicas de reconhecimento de padrões com interpretação automática (positivo/negativo), na microscopia automatizada, câmaras de vídeo de grande sensibilidade e um software dedicado à análise de imagens digitais. No entanto, como discutido no artigo de Tozzoli [17], o sistema ainda carece de estudos e precisa ser melhorado no sentido de definir a sua especificidade relativa para as diferentes doenças autoimunes.

3. Ensaio Enzimático de Imunoabsorção (ELISA)

O ensaio enzimático de imunoabsorção, comumente conhecido por ELISA (ou EIA) é semelhante em princípio ao RIA, porém depende de uma enzima, em vez de um marcador radioactivo [16]. Neste método, para detectar os anticorpos dsDNA, as células de uma microplaca de titulação são preenchidas com dsDNA, servindo de substrato para a detecção

de anticorpos anti-dsDNA. Os anticorpos humanos são detectados usando a enzima peroxidase conjugada num antisoro secundário direccionado contra a imunoglobulina humana Ig G. A enzima cataliza uma reacção química que pode ser usada para quantificar os anticorpos anti-dsDNA [10].

É uma técnica que mostrou ser **quantitativa**, de **fácil execução**, **não muito cara** e completamente **automatizada** [14]. O método ELISA é adequado para o diagnóstico, porém não é adequado para o manuseamento da doença, tendo uma pobre correlação com a sua actividade [6].

O ensaio de ELISA foi descrito como **mais sensível mas menos específico** do que os ensaios de Farr-RIA e CLIF na medida em que **detectam anticorpos de baixa e alta avidéz** [14, 15]. Essa é a principal limitação da técnica, tendo em conta que os anticorpos de baixa avidéz geralmente tem uma relevância clínica menor e podem estar presentes em outras doenças do tecido conjuntivo, doenças inflamatórias, doenças infecciosas e muitas vezes em indivíduos saudáveis [14, 15, 6]. Calcula-se que este facto se deve ao uso de DNA que foi purificado a partir de tecido humano, podendo conter regiões de ligação para o ssDNA [8] e outras proteínas que interferem com os resultados levando a alguns falsos positivos [15]. No entanto quando estes casos ocorrem, geralmente utiliza-se um segundo exame para confirmação do diagnóstico de LES [6,12].

No sentido de responder às dificuldades supranumeradas foram desenvolvidas formas melhoradas deste método, descritas no artigo de Tozzoli [17] como técnicas de **ELISA de segunda geração**. Estes novos métodos diferem da técnica de ELISA clássica ao apresentarem uma **maior purificação de antígenos** (a partir de DNA recombinante (ORGENTEC), DNA extraído do timo de bovino (Farrzyme), de um plasmídeo circular de DNA (FEIA) e dsDNA sintético (CLIA)) permitindo uma **detecção qualitativa e quantitativa mais apurada** dos anticorpos anti-dsDNA [15, 10] e **alta capacidade para**

detectar anticorpos de avidéz intermédia e alta [15; 11]. No entanto, segundo um estudo de Antico [15], estas técnicas mantiveram-se mais sensíveis do que os ensaios de CLIF e de Farr-RIA.

Esta é uma geração que se encontra a ganhar relevância e a ser usada na rotina de muitos laboratórios, sugerindo que no futuro possam ser uma alternativa ao ensaio de Farr-RIA [15]. E tanto podem ser obtidos como kits comerciais como desenvolvidos no laboratório [10]. Apresenta-se em seguida uma breve descrição dos métodos enumerados.

3.1. ORGENTEC® dsDNA

Neste ensaio, as amostras de antígenos de dsDNA recombinante e do soro do paciente são adicionadas às células da microplaca para reagirem um com o outro em fase sólida. É então efectuada uma lavagem para remover os anticorpos não-ligados e outras proteínas do soro. É medida a ligação dsDNA/anti-dsDNA ao adicionar uma enzima de horseradish peroxidase conjugada num antisoro secundário contra a imunoglobulina humana IgG e após a incubação com o conjugado, forma-se um complexo estável de três partes se o resultado for positivo: antisoro – enzima peroxidase – anticorpos dsDNA/anti-dsDNA. Após a lavagem este complexo é detectado adicionando-se uma solução de tetrametilbenzidina (TMB) como substrato cromogénico. O grau de desenvolvimento da cor em cada poço é proporcional à concentração de anticorpos anti-dsDNA em cada amostra de soro e cada micropoço é lido em um espectrofotómetro em 450 nm [15].

No estudo de Antico [15] este é um método que mostrou existir uma correlação maior com a técnica de CLIFF do que da técnica de Farr e garante uma boa especificidade, sensibilidade e avidéz do anticorpo para o LES.

3.2. Farrzyme®

Nesta variação do ensaio de ELISA é utilizado um antígeno de dsDNA extraído do timo de bovino. Os poços da microplaca são então revestidos com este antígeno e as amostras diluídas dos doentes são pipetadas nos poços. A ligação antígeno-anticorpo estabelece-se então durante a primeira incubação. Após a lavagem dos poços, para a remoção das proteínas livres, é adicionado o conjugado anti-IgG humana purificado de coelho, marcado com peroxidase. O conjugado liga-se ao autoanticorpo humano capturado e o excesso é removido através de uma nova etapa de lavagem. É então adicionado o substrato cromogénico Tetrametilbenzidina (TMB) seguido de ácido fosfórico. A leitura é realizada a um comprimento de onda de 450nm.

Num estudo de Venner, correlacionou-se ensaio de Farrzyme e ensaio de ELISA clássico, tendo o primeiro apresentando melhorias significativas, mostrando-se mais específico para o diagnóstico de LES. No entanto, no mesmo estudo, no sentido de melhorar a sua performance foi proposto a diminuição dos seu nível limiar para melhorar a sensibilidade do diagnóstico [6].

É um método que na sua correlação com os métodos de Farr-RIA e de CLIFF se aproxima muito mais do ensaio de Farr, garantindo uma boa especificidade e avidéz do anticorpo para o LES [15]

No entanto tal como no ensaio de Farr, também apresenta a desvantagem de não manifestar especificidade para os isótopos, detectar anticorpos IgM e ter uma sensibilidade relativamente baixa [14]. Também foi mostrado que os níveis de anti-dsDNA não tiveram um boa correlação com a actividade da doença[6].

3.3. Liaison® dsDNA – Imunoensaio Quimioluminescente (CLIA)

Este imunoensaio quimioluminescente é um ensaio automatizado que usa uma cadeia dupla de oligonucleotídeo sintético dsDNA revestido por partículas magnéticas ligadas a biotina-estreptavidina. O que assegura não haver contaminação por histonas ou outras proteínas nucleares. Então, um anticorpo monoclonal de rato marcado com um derivado de isoluminol é usado como anticorpo conjugado para detectar anticorpos anti-dsDNA IgG ligados ao antígeno [15]. Este ensaio difere do ELISA clássico pelo uso de dsDNA exclusivamente sintético e da quimioluminescência para a detecção de anticorpos.

Este ensaio sugere ser o mais sensível comparado aos restantes ensaios de ELISA de 2ª geração e aos métodos de Farr-RIA e CLIF [15]. É um ensaio que em alguns estudos sugere uma alta especificidade para diagnóstico, pacientes com lúpus inicial e follow up [19,10] enquanto que em outros mostrou ser a técnica de especificidade mais baixa comparada com os métodos de CLIF, Farr-RIA e alguns de ELISAS de 2ª geração fazendo dele o pior exame complementar de diagnóstico em todo o leque de exames descrito [15]. Contudo ainda não existem estudos suficientes para que seja estabelecida uma conclusão sobre o assunto.

3.4. Elia™ dsDNA – FluoroImunoensaio Enzimático (FEIA)

O fluoroimunoensaio enzimático (FEIA) é um imunoensaio de fluorescência que tem sido recentemente desenvolvido para monitorizar e quantificar os anticorpos anti-dsDNA. Este ensaio usa uma única fonte irradiada de polistireno que reveste um plasmídeo de dupla cadeia circular de DNA purificado a partir da *Escherichia coli*. Os anticorpos para o dsDNA são detectados por fluorimetria usando um anticorpo IgG conjugado com uma galactosidade β monoclonal de rato e 4-metiumbeliferil β -D-galactosídeo (0.01%) como substrato. Faz-se uma lavagem rigorosa com tampão que removerá tanto os anticorpos não ligados como os de

baixa avidéz [15] . É um ensaio que evita os problemas correntes da técnica de ELISA clássica, pelo uso de de uma placa de plástico revestida com polistireno, o que deverá garantir uma melhor especificidade analítica através do uso de um tampão com uma alta força iónica, que deverá limitar a fracção de ligações por anticorpos de baixa afinidade, e ,consequentemente, aumentar a sua especificidade clínica, melhorando assim a sua performance [10].

As avaliações da concordância deste ensaio com o ensaio de Farr e de CLIF mostram uma tendência para trazer o FEIA para mais perto do ensaio de Farr quanto à sua especificidade e a uma alta ou moderada avidéz para o anti-dsDNA [15, 10]. No entanto, são necessários mais estudos para a correlação com o curso clínico da doença [10].

4. Imunoensaio Multiplex

Existem vários estudos antigos e outros mais recentes que nos indicam que outros anticorpos poderão exercer um papel importante no diagnóstico do LES como C1q, dsDNA IgM, SSA/Ro, SSB/La, Sm, histonas, anti-nucleossomas, P ribossómica, cardiolipina, células endoteliais e citocinas (incluindo as interleucinas) [2, 10, 20, 21, 22, 23, 24].

Devido aos avanços na tecnologia dos imunoensaios, no ano de 2003 começou-se a desenvolver um tipo de ensaio multiplex capaz de detectar simultaneamente múltiplos anticorpos distinguindo-se assim dos métodos monoplex convencionais [17].

O ensaio multiplex consiste na distinção de microesferas magnéticas marcadas com um revestimento colorido e de tamanho uniforme (5,5 µm). Cada antígeno (recombinante ou purificado) é conjugado com um conjunto individual de microesferas. Cada conjunto de microesferas é classificado com base na intensidade da sua fluorescência única laranja ou vermelha, o que permite a identificação do anticorpo. Esta fluorescência é excitada por um laser verde, identificada e posteriormente quantificada. As reacções são analisadas

directamente com base em testes estandardizados de citometria de fluxo e podem ser gerados automaticamente através do manuseamento de um software de base de dados apropriado [10]. É um sistema completamente **automatizado** que permite a **deteção semi-quantitativa e simultânea de múltiplos anticorpos numa única amostra**, num único tubo e com uma única calibração. São exemplos de deteção os anticorpos anti-dsDNA, anti-cromatina, anti-proteína ribossomal, anti-SSA, anti-SSB, anti-Sm, anti-RNP, anti-Scl-70, anti-Jo-1 e anti-centrómero B [25, 26]. É também um **ensaio flexível**, na medida em que, caso haja necessidade, podem ser adicionados novos antigénios-alvo às microesferas coradas [25].

Existe uma concordância de especificidade equiparada quando se comparam o ensaio multiplex com os métodos de imunoensaio enzimático (ELISA) e o radioimunoensaio de Farr [25,6] para deteção anticorpos dsDNA. Num estudo de Kim Y [26], foi verificado que a especificidade pode aumentar quando se combinam as especificidades individuais dos anticorpos anti-dsDNA, anti-Sm e anti-SSA, demonstrando que a presença de múltiplos anticorpos torna-o mais específico para o LES.

No entanto os ensaios multiplex mostram uma baixa sensibilidade para o LES como verificado nos estudos de Kim Y [26] e de Op [25], ao falhar na deteção de níveis positivos de anticorpos antinucleares já testados por imunofluorescência indirecta.

A técnica de multiplex é um ensaio automatizado relativamente **rápido**, podendo atribuir resultados em uma hora (em contraste com o ensaio de ELISA, que requer de 4-6 horas) [26]. De acordo com Venner, o ensaio multiplex tem uma **boa correlação com a actividade da doença** discriminando melhor a presença de nefrite activa [6].

É também uma técnica que pode ser usada como um ensaio de primeira linha, já que discrimina vários anticorpos ao mesmo tempo, rastreando de imediato vários tipos de doenças autoimunes e podendo dispensar o exame de triagem inicial com imunofluorescência indirecta em células HEp-2 (FAN-Hep-2) [25]. Uma desvantagem do ensaio multiplex é ter **elevados**

custos levando os clínicos a reflectir sobre a relação custo/benefício do mesmo [6, 10].

5. Ensaio de Microarrays

Após o conhecimento do genoma e da sua sequência completa, foi necessário criar um novo campo de estudo que se propusesse a investigar o controlo da expressão genética e o seu impacto no metabolismo celular através da análise do conjunto de proteínas expressas numa célula ou tecido (o proteoma) num determinado momento ou condição. Para o feito surgiu então a tecnologia proteómica. [27]

A tecnologia proteómica permitiu que fosse criado o ensaio de microarray [28]. Neste ensaio são empregues micromatrizes (pequenas placas de vidro com minúsculos furos) onde estão depositados e imobilizados antígenos específicos de alta densidade e avidéz destinados a detectar os alvos imunológicos presentes no soro dos pacientes. As amostras biológicas são adicionadas a estas micromatrizes seguindo-se passos de lavagem para eliminar as proteínas livres. A lâmina é então visualizada por imunofluorescência indirecta para identificar o complexo [10].

A maior vantagem deste estudo é que **não precisa de grandes quantidades tanto de reagente como de amostra** (< 1µL) por matriz, sendo capaz de fazer uma **detecção rápida** e simultânea de múltiplas reacções de anticorpos específicos-proteína extraíndo assim um quadro amplo de informações [29].

É também um exame **automatizado**, de **custo acessível**, no qual não só os dados clínicos e analíticos podem ser obtidos a partir das micromatrizes de autoantígenos mas é capaz de fornecer informações importantes ao **permitir o estudo do perfil molecular dos autoanticorpos**, as características fisiopatológicas da doença e determinação do seu tratamento ao longo do seu trajecto. Podendo constituir uma nova ferramenta na descoberta de novos antígenos e no desenvolvimento e selecção de terapias específicas [29]. Um exemplo

deste facto, foi o estudo de Fattal [24] que demonstrou, através do ensaio de microarray que o perfil dos anticorpos não altera independentemente as várias fases do lupus eritematoso sistémico (entre pacientes com SLE mas sem sinais de envolvimento renal, pacientes com sinais de nefrite lúptica activa ou pacientes em fase de remissão da mesma); se encontravam aumentadas a reactividade das imunoglobulinas específicas igG para com dsDNA, ssDNA, o vírus Epstein-Barr (EBV) e ácido hialurónico e diminuídas as reactividades de imunoglobulinas específicas ig M para com a mieloperoxidase (MPO), CD99, colagénio tipo III, Proteínas transportadoras do factor de crescimento semelhante à insulina (IGFBP1) e cardiolipina, sugerindo que estes últimos aumentam a resistência ao SLE.

No entanto, apesar de Hsueh [29] ter mostrado que a correlação entre o imunoensaio de microarray e o ensaio de ELISA (com antígeno purificado a partir de DNA recombinante) é aceitável, e Fattal [24] ter demonstrado a alta especificidade e sensibilidade do mesmo, Robinson e Joos [30, 28] demonstraram serem **necessários mais estudos** para se poder atribuir níveis de sensibilidade e de especificidade característicos.

As limitações que ele apresenta baseiam-se na ligação dos antígenos à superfície da micromatriz, podendo a mesma alterar os epítomos imunológicos, necessitando de revisão quanto à purificação e produção antigénica e aplicação de micromatrizes quimicamente modificadas [29] e a consideração da sua aplicação em fase líquida [30]. Outros aspectos que necessitam de ser melhorados são a sua identificação e quantificação da fluorescência [29].

De acordo com Hueber e Ghirardello [8, 31] é um ensaio que tem mostrado grande potencial e capaz de substituir os métodos convencionais, no entanto ainda necessitam mais estudos para poder entrar no rotina dos laboratórios.

6. Espectrometria de ressonância de plasma de superfície (SPR)

Na técnica de espectrometria de ressonância de plasma de superfície são utilizados biosensores ópticos, que são dispositivos analíticos que quantificam o anticorpo anti-dsDNA com base nas suas propriedades ópticas. [32 ,35]

Baseia-se incidência um feixe de luz polarizada (com um determinado ângulo Φ) que atravessa um substrato óptico (ex. fibra óptica), alcança uma biocamada e é reflectida de volta para o substrato óptico. Embora a luz incidente seja totalmente refletida internamente, uma componente desta radiação (campo evanescente) penetra na interface da biocamada. [35]

Entre a biocamada e o substrato óptico existe um fino filme de ouro revestido com estreptavidina, de espessura menor que um comprimento de onda da luz, que produz ondas de electrões livres oscilantes (plasma). Em um determinado ângulo de incidência, quando o vector de onda do plasma é igual ao vector de onda do campo evanescente, parte da radiação fica contida no filme de ouro, ocorrendo a ressonância de plasma de superfície. [32]

Em consequência, ocorre uma perda de energia da luz incidente para o filme de ouro, resultando na redução da intensidade da luz refletida, a qual pode ser detectada. [32]

Neste ensaio é utilizada uma biocamada constituída por moléculas de oligonucleotídeo sintético acoplado a tranferrina humana biotinilada e ligado a fragmentos de dsDNA humano recombinante. O anticorpo anti-dsDNA, ao entrar em contacto com a biocamada, imobilizada na superfície do biosensor, produz uma mudança no índice de refração. É uma interacção cinética que pode ser identificada em tempo real dando informações quanto á concentração e avidéz do anticorpo. [33, 34]

Nos estudos de Buhl e de Fiegel [33, 34] foi mostrado que esta técnica apresentava altas sensibilidades e especificidades aproximando a sua performance do ensaio de Farr, detectando

apenas anticorpos de alta avidéz [33] e dos ensaios de ELISA de 2ª geração [34]. Também o resultado da análise da amostra é obtido em poucos minutos [35].

Esta técnica apresenta as desvantagens de **não distinguir os isótopos G e M** detectando ambos e das concentrações e avidéz dos anticorpos anti-dsDNA **não poderem ser detectadas em soros policlonais** [33].

È contudo uma técnica que **ainda necessita de estudos** para que se defina definitivamente a sua capacidade e vantagens relativamente aos restantes ensaios.

Discussão

Como objecto de discussão foi elaborada uma tabela com as características de cada exame discriminado, no sentido de ter uma visualização óptima sobre os mesmos:

Método	Sumário do método	Avidez do anticorpo detectado	Classe do anticorpo detectado	Vantagem	Desvantagem
RIA - Farr	O dsDNA marcado radioactivamente é incubado com o soro do paciente. Complexos imunes de dsDNA/anticorpos anti-DNA precipitam por adição de uma solução de sulfato de amónio.	Alta	Todas	Alta especificidade para o LES Tem uma boa correlação com a actividade da doença	Não tem especificidade para os isótopos – também detectam anticorpos IgM. É necessário um marcador radioactivo. Laboratórios preparados para material radioactivo Dispendioso. A contaminação com ssDNA pode resultar em falsos positivos.
RIA - PEG	O dsDNA marcado radioactivamente é incubado com o soro do paciente. Complexos imunes de dsDNA/anticorpos anti-DNA precipitam por adição de uma solução de 3.5% de polietilenoglicol.	Alta a baixa	Todas	Detecta anticorpos de menor avidéz. Tem uma boa correlação com a actividade da doença	Não tem especificidade para os isótopos – também detectam anticorpos IgM. É necessário um marcador radioactivo. Laboratórios preparados para material radioactivo. Dispendioso. A contaminação com ssDNA pode resultar em falsos positivos. Só detecta os complexos de anticorpos anti-dsDNA acima de determinado tamanho

Método	Sumário do método	Avidez do anticorpo detectado	Classe do anticorpo detectado	Vantagem	Desvantagem
CLIF	Os anticorpos para o dsDNA ligam-se a dsDNA circular do cinoplasto. Os anticorpos ligados detectados com um reagente de fluoresceína conjugada e visualizada por microscopia epi-fluorescente	Média a alta	Depende da especificidade da conjugação	Específica Técnica laboratorial comum Pode ser determinado o isótipo dos anticorpos Não tem interferência com os anticorpos para o ssDNA	Falsos positivos ocasionais. A observação das lâminas dispense muito tempo. Laboratorialmente intensivo. Baixo grau de estandardização e automatização. Subjectividade na interpretação de resultados. Necessidade de profissionais especializados. Não fornece dados quantitativos não estabelecendo, por isso, uma correlação com a actividade da doença
ELISA	As amostras de dsDNA e do soro do paciente são adicionadas às células da microplaca. É medida a ligação dsDNA/anti-dsDNA ao adicionar uma enzima peroxidase conjugada num antisoro secundário contra a imunoglobulina humana IgG.	Alta a baixa	Mais frequentemente a classe IgG	Alta sensibilidade Não utiliza marcadores radioactivos Automatizado	É um método menos específico. Alguns falsos positivos para SLE Devem ser incluídos controlos para certificar a ausência de contaminação por ssDNA
Multiplex	Cada antigénio é conjugado com um conjunto individual de microesferas de revestimento colorido e tamanho uniforme. Cada conjunto de microesferas é classificado com base na intensidade e cor da sua fluorescência, permitindo a identificação do anticorpo. Esta fluorescência é identificada e quantificada por laser.	Alta	Depende da especificidade da conjugação	Elevada especificidade Automatizado Rápido Alta precisão diagnóstica Boa correlação com a actividade da doença Detecta vários anticorpos simultaneamente	Elevados custos de reagentes e sistemas A sensibilidade ainda não está adequada. Presença de falsos negativos Carece de mais estudos

Método	Sumário do método	Avidez do anticorpo detectado	Classe do anticorpo detectado	Vantagem	Desvantagem
MicroArrays	São usadas placas de micromatrizes contendo várias proteínas antigénicas de alta densidade e avides específicas para o anticorpo-alvo contido no soro do paciente. A visualização é feita por técnica de imunofluorescência indirecta	Carece de estudos	Depende da especificidade da conjugação	<p>Automatizado</p> <p>Rápido</p> <p>Barato</p> <p>Detecta vários anticorpos simultaneamente</p> <p>Utiliza quantidades muito pequenas de amostras e de reagentes</p> <p>Pode ser usado no estudo fisiopatológico do LES, tal como estabelecer novos desafios terapêuticos</p>	<p>Necessita de mais estudos</p> <p>Ainda não lhe está atribuído um grau de sensibilidade e especificidade</p> <p>Necessita de ser melhorado e identificação e quantificação da fluorescência.</p> <p>A ligação dos antígenos á superfície da matriz pode alterar os seus epítomos.</p>
SPR	È uma técnica baseada na interacção entre uma biocamada constituída por moléculas de oligonucleotídeo sintético acoplado a transferrina humana biotínilada e ligado a fragmentos de dsDNA humano recombinante com o anticorpo anti-dsDNA e detectada por um sistema biosensor óptico	Alta	Todas	<p>A interacção cinética é detectada em tempo real</p> <p>Os resultados são dados em minutos</p> <p>Alta especificidade para lupus</p> <p>Boa relação com a actividade da doença</p>	<p>Não tem especificidade para os isótopos – também detectam anticorpos IgM</p> <p>Os anticorpos anti-dsDNA não podem ser detectados em soros policlonais.</p> <p>Necessita de mais estudos</p>

Conclusão

Neste trabalho foram apresentados, de forma sucinta os diferentes métodos actualmente usados para a detecção e quantificação de anticorpos anti-dsDNA, sendo os mais comuns o radioimunoensaio de Farr, o ensaio de imunofluorescência indirecta com *Crithidia Luciliae* (CLIF) e os ensaios enzimáticos de imunoabsorção (ELISA).

O radiomunoensaio de Farr tem sido o ensaio considerado gold standard na detecção do anticorpo anti-dsDNA, estando actualmente em declínio por apresentar algumas desvantagens, como o uso de material radioactivo e laboratórios adequadamente preparados, a demora da execução, o custo e o aumento do número de falsos positivos.

De facto, os ensaios acima descritos tem-se vindo a apresentar discordantes entre si requerendo a procura de novas e melhoradas técnicas de detecção. Dessa forma, tem-se vindo a assistir a emergência de novas tecnologias como o ensaio de multiplex e o ensaio de microarrays respondendo a algumas das dificuldades que se lhes têm sido associadas.

A escolha do método ideal para detecção de anticorpos anti-dsDNA no lúpus eritematoso sistémico deverá compreender 3 objectivos principais: o diagnóstico da doença, o seguimento do paciente e a previsão de exacerbações da doença, nomeadamente sobre a forma de nefrite lúpica.

Para o efeito, devemos ter em conta os seus graus de sensibilidade, especificidade e avidéz, a sua automatização e standardização, a qualidade dos reagentes (nomeadamente os níveis de purificação do antigénio), a qualificação e quantificação dos resultados, o requerimento de trabalhadores altamente especializados, o suporte técnico disponível a nível dos laboratórios, o custo do ensaio, o espectro dos anticorpos anti-dsDNA produzidos pelo paciente e o próprio paciente, com as suas respostas individuais auto-ímmunes diversas e naturalmente policlonais para o DNA. Por fim, resultados dos exames deverão ser

interpretados tendo em conta as características principais do ensaio utilizado.

Os valores de especificidade parecem ter uma relação directa com o nível de avidéz do anticorpo e conseqüentemente inversa com os valores sensibilidade. Pode-se afirmar assim que, se o objectivo fôr um rastreio de anticorpos anti-dsDNA deve-se escolher um teste de maior sensibilidade e menor especificidade, para detecção de anticorpos de baixa e alta avidéz e assim diagnosticar as formas leves e moderadas das formas mais graves do lupus eritematoso sistémico, utilizando-se para o efeito o radioimunoensaio de PEG, os métodos de ELISA clássicos ou o ensaio de imunofluorescência indirecta com *Crithidia Luciliae*. Contudo, nestes casos não se pode excluir a presença de outros fenómenos que não LES, sendo quase sempre necessário um segundo ensaio de alta avidéz para confirmação diagnóstica.

Para monitorização da doença e folow up do paciente são preferíveis os exames que detectam anticorpos anti-dsDNA de alta avidéz e maior especificidade, como os métodos de ELISA de 2ª geração e o radioimunoensaio de Farr, estando os seus resultados intimamente relacionados com a exacerbação e eficácia terapêutica. Efectivamente, foram reportados estudos, onde os altos níveis de anticorpos anti-dsDNA precediam a exacerbação da doença decrescendo rapidamente no decurso da mesma [12]. No entanto, como não há regra sem excepção, no lúpus eritematoso sistémico, na prática, o exame clínico é fundamental, mas não devem ser negligenciados outros marcadores, como são os valores do complemento, velocidade de sedimentação (VS), e proteína C reactiva (PCR).

Contudo, após as descobertas da existência de complexos de dsDNA-histonas ou dsDNA-nucleossomas e da relação dos mesmos com episódios de exacerbação e glomerulonefrite lúpica activa, tem levado, nos últimos 10 anos, ao surgimento de tecnologias multiplex e de microarrays, as quais criam a possibilidade de detecção e quantificação destes imunocomplexos e outros anticorpos. Sendo que os ensaio multiplex e de microarray

estabelecem valores equiparáveis de sensibilidade e especificidade para detecção do anticorpo anti-dsDNA como o ensaio de Farr. São, no entanto, ensaios que tem carência de estudos suficientes ou que necessitam de ser melhorados para a sua valorização e aplicação nas rotinas laboratoriais.

Por último, o ensaio espectrometria de ressonância de plasma de superfície (SPR), que se baseia nas características do espectro produzido pela interação dos anticorpos anti-dsDNA com um substrato. É uma técnica monoplex que tal como nos ensaios de multiplex e microarray carece de estudos, no entanto tem revelado ter elevada performance e com a vantagem da análise dos resultados poder ser obtida em tempo real de interação garantindo dessa forma uma melhor qualidade dos mesmos.

Agradecimentos

Ao Doutor Jorge Silva, pela oportunidade que me deu ao aceitar o meu pedido de orientação. Pela orientação dada e pelo exemplo que é como estímulo à aprendizagem dos seus alunos.

Ao Doutor Fernando do serviço de análises clínicas dos CHUC, pela disponibilidade e ajuda prestada, tendo-me fornecido informações valiosas, essenciais à pesquisa da literatura.

Com particular carinho, aos meus pais e irmãos, o suporte maior desta minha longa caminhada.

Aos amigos José Diogo Branco, Mário Cenicante e Francisco Alexandre pela paciência e apoio incondicional.

Referências bibliográficas

- [1]. Marks SD, Tullus K. Autoantibodies in systemic lupus erythematosus. *Pediatr Nephrol.* 2012 Oct;27(10):1855-68.
- [2]. Burmester GR, Pezzuto A. *Imunologia – Texto e Atlas.* Lidel. 1a ed. 2005
- [3]. Kavanaugh A, Tomar R, Reveille J, Solomon DH, Homburger HA. Guidelines for clinical use of the antinuclear antibody test and tests for specific autoantibodies to nuclear antigens. American College of Pathologists. *Arch Pathol Lab Med.* 2000 Jan;124(1):71-81.
- [4]. Dellavance A, Leser PG, Andrade LEC. Importância do padrão de fluorescência na interpretação do teste do FAN – o caso do padrão pontilhado fino denso. *Rev. Bras. Reumatol.* 2007 July ; 47(4)
- [5]. Block DB, Shmerling RH, Romain PL. Antibodies to double-stranded (ds)DNA, Sm, and U1RNP. [document on the Internet]. Available from:
<http://www.uptodate.com/contents/antibodies-to-double-stranded-ds-dna-sm-and-u1-rnp>.
- [6]. Venner AA, Ibañez D, Gladman DD, Urowitz MB, Mackinnon A, Blasutig IM, et.al. Comparison of three anti-dsDNA assays: Performance and correlation with systemic lupus erythematosus disease activity. *Clin Biochem.* 2013 Mar;46(4-5):317-20.
- [7]. Žigon P, Lakota K, Čučnik S, Švec T, Ambrožič A, Sodin-Šemrl S, Kveder T. Comparison and evaluation of different methodologies and tests for detection of anti-dsDNA antibodies on 889 Slovenian patients' and blood donors' sera. *Croat Med J.* 2011 December; 52(6): 694–702.
- [8]. Ghirardello A, Villalta D, Morozzi G, Afeltra A, Galeazzi M, Gerli R, et. al. Evaluation of current methods for the measurement of serum anti double-stranded DNA antibodies. *Ann N Y Acad Sci.* 2007 Aug;1109:401-6.
- [9]. Bomback AS , Appel GB. Diagnosis and classification of renal disease in systemic lupus

erythematosus. [document on the Internet]. Available from:
<http://www.uptodate.com/contents/diagnosis-and-classification-of-renal-disease-in-systemic-lupus-erythematosus>

[10]. Rouquette AM, Desgruelles C. Detection of antibodies to dsDNA: an overview of laboratory assays. *Lupus*. 2006;15(7):403-7.

[11]. McCloskey LJ, Christner P, Jacobs-Kosmin D, Jaskowski TD, Hill HR, Lakos G, et. al. Myth and reality: practical test system for the measurement of anti-DNA antibodies in the diagnosis of systemic lupus erythematosus (SLE). *J Clin Lab Anal*. 2010;24(2):77-84.

[12]. Smeenk RJ, van den Brink HG, Brinkman K, Termaat RM, Berden JH, Swaak AJ. Anti-dsDNA: choice of assay in relation to clinical value. *Rheumatol Int*. 1991;11(3):101-7.

[13]. Wold RT, Young FE, Tan EM, Farr RS. Deoxyribonucleic acid antibody: a method to detect its primary interaction with deoxyribonucleic acid. *Science* 1968. 161:806-807.

[14]. Hughes R, UI-Hassan S. Anti-dsDNA antibodies: their role in the detection and monitoring of SLE. *Autoimmunity*. 2006 Nov; 12(7).

[15]. Antico A, Platzgummer S, Bassetti D, Bizzaro N, Tozzoli R, Villalta D. Diagnosing systemic lupus erythematosus: new-generation immunoassays for measurement of anti-dsDNA antibodies are an effective alternative to the Farr technique and the Crithidia luciliae immunofluorescence test. *Lupus*. 2010 Jul;19(8):906-12.

[16]. Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA. *Imunologia de Kuby*. Bookman. 6Th ed. 2008.

[17]. Tozzoli R, Bonaguri C, Melegari A, Antico A, Bassetti D, Bizzaro N. Current state of diagnostic technologies in the autoimmunology laboratory. *Clin Chem Lab Med*. 2013 Jan;51(1):129-38.

[18]. Hu Y, Murphy RF. Automated interpretation of subcellular patterns from

immunofluorescence microscopy. *J Immunol Methods*. 2004 Jul;290(1-2):93-105.

[19]. Radice A, Sinico RA. A new oligonucleotide-based ELISA for the detection of anti-double stranded DNA antibodies. *Autoimmunity*. 2006; 39: 113–119.

[20]. Silva JAP. *Reumatologia Prática*. Diagnóstico Lda. 2nd ed. 2005.

[21]. Putterman C. New approaches to the renal pathogenicity of anti-DNA antibodies in systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev*. 2004 Feb;3(2):7-11.

[22]. Jaekell HP, Trabandt A, Grobe N, Werle E. Anti-dsDNA antibody subtypes and anti-C1q antibodies: toward a more reliable diagnosis and monitoring of systemic lupus erythematosus and lupus nephritis. *Lupus*. 2006;15(6):335-45.

[23]. Bizzaro N, Villalta D, Giavarina D, Tozzoli R. Are anti-nucleosome antibodies a better diagnostic marker than anti-dsDNA antibodies for systemic lupus erythematosus? A systematic review and a study of metanalysis. *Autoimmun Rev*. 2012 Dec;12(2):97-106.

[24] Fattal I, Shental N, Mevorach D, Anaya JM, Livneh A, Langevitz P, et.al. An antibody profile of systemic lupus erythematosus detected by antigen microarray. *Immunology*. 2010 Jul;130(3):337-43.

[25]. Op De Beéck K, Vermeersch P, Verschueren P, Westhovens R, Mariën G, Blockmans D, Bossuyt X. Antinuclear antibody detection by automated multiplex immunoassay in untreated patients at the time of diagnosis. *Autoimmun Rev*. 2012 Dec;12(2):137-43.

[26]. Kim Y, Park Y, Lee EY, Kim HS. Comparison of automated multiplexed bead-based ANA screening assay with ELISA for detecting five common anti-extractable nuclear antigens and anti-dsDNA in systemic rheumatic diseases. *Clin Chim Acta*. 2012 Jan 18;413(1-2):308-

- [27]. Silva AMS. Efficacy of autoantigen microarrays for detecting autoantibodies in patients with systemic lupus erythematosus. Corrêa GC, Reis EM. *Proteomica – Uma abordagem funcional do estudo do genoma. Saúde & Ambiente em Revista*. 2007 jul-dez; 2(2):01-10.
- [28]. Joos TO, Schrenk M, Höpfl P, Kröger K, Chowdhury U, Stoll D, Schörner D, Dürr M, Herick K, Rupp S, Sohn K, Hämmerle H. A microarray enzyme-linked immunosorbent assay for autoimmune diagnostics. *Electrophoresis*. 2000 Jul;21(13):2641-50.
- [29]. Hsueh KC, Huang CM, Chen KJ, Hsu CHM. Efficacy of Autoantigen Microarrays for Detecting Autoantibodies in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Taiwan J Med* 2005; 10: 131-137.
- [30] Robinson WH, DiGennaro C, Hueber W, Haab BB, Kamachi M, Dean EJ, et. al. Autoantigen microarrays for multiplex characterization of autoantibody responses. *Nat Med*. 2002 Mar;8(3):295-301.
- [31] Hueber W, Utz PJ, Steinman L, Robinson WH. Autoantibody profiling for the study and treatment of autoimmune disease. *Arthritis Res*. 2002; 4(5): 290–295.
- [32]Carvalho RM, Rath S, Kubota LT. SPR: Uma nova ferramenta para biossensores. *Química Nova*. 2003 Jan; 26(1):97-10.
- [33]. Buhl A, Metzger JH, Heegaard NH, Von Landenberg P, Fleck M, Lippa PB. Novel biosensor-based analytic device for the detection of anti-double-stranded DNA antibodies. *Clin Chem*. 2007 Feb;53(2):334-4.
- [34]. Fiegel F, Buhl A, Jaekel HP, Werle E, Schmolke M, Ollert M, et. Al. Autoantibodies to double-stranded DNA–Intermethod comparison between four commercial immunoassays and a research biosensor-based device. *Lupus* (2010) 19(8): 957–964

[35]. Camara A R. Nanopartículas metálicas para sensoramento químico a fibra óptica. Msc. [dissertação]. Rio de Janeiro-Brazil: Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro; 2010