

## DESENVOLVIMENTO DE UMA TÉCNICA IMUNOENZIMÁTICA (ELISA) SIMPLES E RÁPIDA PARA A PESQUISA DE ANTICORPOS IgG ANTI-DNA NATIVO NO LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO

Bruna A. Brajeiro, Lisandra A. Suzuki, Elisângela O. R. Cavalcante, Cláudio L. Rossi.

### Resumo

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença autoimune crônica, que se caracteriza pela produção de autoanticorpos direcionados a um grupo amplo e heterogêneo de componentes do próprio indivíduo, podendo afetar diversos órgãos, resultando em várias manifestações clínicas e anormalidades laboratoriais. O diagnóstico do LES é baseado em observações clínicas e testes laboratoriais. O presente estudo teve como objetivo desenvolver uma técnica ELISA simples e rápida para a pesquisa de anticorpos IgG anti-DNA nativo (DNAn). A técnica ELISA para a pesquisa de anticorpos anti-DNAn apresentou ótimos resultados em termos de sensibilidade (93,7%) e especificidade (97,9%), podendo ser de grande utilidade tanto na pesquisa como na rotina diagnóstica.

### Palavras-chave:

*Lupus Eritematoso Sistêmico, ELISA, anticorpo anti-DNA.*

### Introdução

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença autoimune crônica, que se caracteriza pela produção de autoanticorpos direcionados a um grupo amplo e heterogêneo de componentes do próprio indivíduo, podendo afetar diversos órgãos, resultando em várias manifestações clínicas e anormalidades laboratoriais. A etiologia do LES não é completamente conhecida, porém acredita-se que a interação de fatores genéticos, ambientais e hormonais estejam envolvidos no desenvolvimento da doença.

O diagnóstico do LES é baseado em observações clínicas e testes laboratoriais, incluindo a pesquisa de anticorpos anti-DNA nativo (ou de dupla hélice, DNAn), utilizando imunofluorescência indireta (*Criethidia lucilliae* como substrato) e técnicas imunoenzimáticas (ELISA). O presente estudo teve como objetivo desenvolver uma técnica ELISA simples e rápida para a pesquisa de anticorpos IgG anti-DNAs.

### Resultados e Discussão

Para o desenvolvimento da técnica ELISA foram utilizadas 32 amostras de soros de pacientes com LES, 24 amostras de soros de pacientes com artrite reumatoide e 23 amostras de soros de pessoas saudáveis.

Resumidamente, cavidades de placas de poliestireno (Maxisorp, Thermo Scientific Nunc, EUA) foram tratadas com uma solução de poli-L-lisina. Após incubação por 1 h à temperatura ambiente (TA) e 12 h a 4° C e três lavagens com solução salina tamponada com fosfatos 0,15 M, pH=7,3 (SST), foram adicionados às cavidades das placas 100 µl de uma solução de DNAn de timo de vitelo a 20 µg/mL em SST. Após incubação por 2 h à TA, as cavidades das placas foram lavadas três vezes com SST contendo Tween 20 e soro albumina bovina (SST-T-SAB). Em seguida, foram adicionados às cavidades das placas as amostras de soros diluídas a 1:200 em SST-T-SAB, em triplicata. Após incubação por 20 min., seguida por três lavagens com SST-T, foram adicionados às cavidades das placas 100 µl do conjugado (anticorpos anti-IgG humana marcados com peroxidase) diluído em SST. Após incubação por 20

min., seguida por três lavagens com SST-T, foram adicionados às cavidades das placas 100 µl do sistema substrato (tetrametilbenzidina/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Após incubação por 5 min., no escuro, as reações foram bloqueadas pela adição de 50 µl de uma solução de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) a 2N em cada cavidade da placa. A leitura das absorvâncias das reações foi realizada a 450,630 nm em leitora de ELISA Multiskan (LabSystems, Helsinki, Finlândia) e a média das triplicatas considerada como resultado final. Utilizando o valor de *cut-off* determinado pelo índice J (Youden, 1950), a técnica ELISA apresentou sensibilidade de 93,7% e especificidade de 97,9%.

### Conclusões

A técnica ELISA para a pesquisa de anticorpos anti-DNAn apresentou ótimos resultados em termos de sensibilidade e especificidade, podendo ser de grande utilidade tanto na pesquisa como na rotina diagnóstica.

§ Fortuna G, Brennan MT. Systemic lupus erythematosus: epidemiology, pathophysiology, manifestations and management. *Dent Clin North Am* 2013; 57:631-55.

§ Pavlovic M, Kats A, Cavallo M, Chen R, Hartmann JX, Shoenfeld Y. Pathogenic and epiphenomenal anti-DNA antibodies in SLE. *Autoimmune Dis* 2010; 2010:1-19.

§ Sato, EL. Lúpus eritematoso sistêmico. In: Júlio C. Voltarelli. (Org.). *Imunologia Clínica na Prática Médica*. São Paulo: Atheneu, 2008, v.p.651-62.

§ Youden, WJ. Index for rating diagnostic tests. *Cancer*. 1950; 3: 32-5.