

IMPORTÂNCIA DO PADRÃO DE FLUORESCÊNCIA NA INTERPRETAÇÃO DO TESTE DO FAN - O CASO DO PADRÃO PONTILHADO FINO DENSO

ALESSANDRA DELLAVANCE*, PAULO GUILHERME LESER, LUÍS EDUARDO COELHO ANDRADE

Trabalho realizado no Fleury Centro de Medicina Diagnóstica e pela disciplina de Reumatologia da Universidade Federal do Estado de São Paulo

RESUMO

A pesquisa de anticorpos contra antígenos celulares (FAN-HEp-2), historicamente conhecida como FAN (fator antinúcleo), tem passado por modificações metodológicas que exigem reflexão sobre suas características de sensibilidade e especificidade, para que haja uma adequada valorização dos resultados obtidos. Atualmente, o exame é marcado por elevada sensibilidade e questionável especificidade, resultando em elevado número de exames positivos em indivíduos não auto-ímmunes. O reconhecimento de que uma fração substancial da população apresenta o teste de FAN-HEp-2 reagente ocasiona a necessidade de busca de características que possam distinguir os testes positivos em pacientes com doença auto-ímmune daqueles observados em indivíduos não auto-ímmunes. Entre essas características, encontram-se o título da reação e o padrão de fluorescência observado. Em particular, deve-se ter em mente que o padrão de fluorescência é resultante do reconhecimento de diferentes estruturas celulares pelos anticorpos e, portanto, o padrão de fluorescência fornece uma indicação preliminar dos possíveis antígenos que estão sendo reconhecidos. Um exemplo emblemático é representado pelo padrão nuclear pontilhado fino denso (PFd). Inicialmente pesquisado por Ochs et al. (1984), em grupo clínico restrito de pacientes com cistite intersticial, estudos posteriores demonstraram sua alta frequência na prática laboratorial em indivíduos com diversas condições não auto-ímmunes. De fato, este padrão é um dos mais frequentes entre indivíduos não auto-ímmunes com reação FAN-HEp-2 positiva. A presente revisão tem como objetivo fornecer elementos que permitam ao clínico exercitar uma interpretação crítica dos resultados de FAN-HEp-2, incluindo a análise do título e do padrão de fluorescência.

*Correspondência

alessandra.dellavance@fleury.com.br
paulo.leser@fleury.com.br
luis.andrade@fleury.com.br
luis@reumato.epm.br
55-11-5014-7731

UNITERMOS: Anticorpos antinucleares. Reumatologia. Imunofluorescência. Auto-anticorpos. Doenças auto-ímmunes. Auto-ímmunidade.

PERSPECTIVA HISTÓRICA

Em 1948, o fenômeno das células LE foi descrito por Hargraves, originando um teste laboratorial caracterizado por alta especificidade para o diagnóstico de lúpus eritematoso sistêmico (LES)¹, e que passou a ser extremamente importante, como um dos onze critérios estabelecidos pelo Colégio Americano de Reumatologia (CAR) para classificação dessa enfermidade².

Coons e Kaplan, em 1950³, utilizando anticorpos marcados com fluoresceína para identificar antígenos teciduais, demonstraram a aplicabilidade do teste de imunofluorescência indireta (IFI) para a pesquisa de auto-anticorpos antinúcleo (ANA), utilizando para isso cortes de tecido de roedores como substrato antígeno. Esta metodologia passou a ser amplamente utilizada para triagem de ANA e este item também foi incorporado aos critérios do CAR, para classificação de LES⁴. Tal inclusão, como um dos critérios de classificação, foi justificada pela sensibilidade e reprodutibilidade do método de IFI, uma vez que pacientes anteriormente negativos para a pesquisa de células LE, porém clinicamente definidos como lúpicos passaram a preencher os critérios de classificação⁵. Ademais, o método de IFI apresentava características técnicas mais simples, menor subjetividade e maior reprodutibilidade. Em uma reavaliação posterior, o teste de ANA-

IFI passou a substituir, definitivamente, o teste das células LE como critério para classificação do LES.

Algumas décadas depois, células tumorais derivadas de carcinoma de laringe humana (células HEp-2 – *American Type Culture Collection CCL-23*) passaram também a ser empregadas como substrato antígeno na técnica de IFI, o que causou um aumento substancial na sensibilidade do método de triagem, uma vez que auto-anticorpos contra antígenos como SS-A/Ro, antígenos de células em proliferação (PCNA), proteínas centroméricas, dentre outros, passaram a ser detectados no teste ANA-IFI, o que não era possível com cortes de tecido animal⁶. Além disso, a cultura de células HEp-2, em monocamadas sobre lâminas para microscopia, disponibiliza otimamente todos os compartimentos celulares, organelas, aparelho mitótico e complexos protéicos que participam da fisiologia eucariótica, com distribuição peculiar em cada fase do ciclo de divisão celular. Pelo fato de que cada antígeno celular tem uma distribuição topográfica própria ao longo do ciclo celular, o reconhecimento de padrões de fluorescência nucleares, nucleolares, citoplasmáticos e, ainda, outros associados ao aparelho mitótico, nas várias fases deste ciclo, fornece direcionamento sobre os possíveis auto-antígenos que estão sendo reconhecidos na reação. Estas associações vêm sendo definidas nas últimas décadas e foram sistematizadas no II Consenso Nacional de FAN⁷.

A SÍNDROME DO ANTICORPO ANTINÚCLEO IDIOPÁTICO

O aumento na sensibilidade do teste de ANA-IFI, entretanto, trouxe também um prejuízo na especificidade do mesmo, pois alguns indivíduos sem evidência clínica ou laboratorial de doença auto-imune também passaram a apresentar resultados positivos em células HEp-2, exigindo uma interpretação bastante criteriosa dos achados sorológicos⁸. A alta frequência de resultados positivos do teste ANA-IFI em indivíduos saudáveis ou com manifestações clínicas vagas tem trazido à tona uma situação denominada por alguns de "Síndrome do Anticorpo Antinúcleo Idiopático". A perda de especificidade do teste agravou-se também pelo fato de que uma vasta gama de especialistas médicos passou a utilizá-lo. Nos primórdios, reumatologistas e nefrologistas eram os grandes usuários deste exame, e, em decorrência de sua familiaridade com o mesmo e das características de sua clientela, tinham maior chance de solicitar o exame a quem realmente tivesse quadro auto-imune. Hoje, o ANA-IFI é um exame solicitado com menos critério por grande variedade de especialistas, que obviamente atendem uma clientela distinta, em que o diagnóstico de doença reumática auto-imune é menos prevalente. Assim, a chance de resultados positivos em indivíduos saudáveis, ou com apresentações clínicas pouco expressivas, tornou-se maior.

ELEMENTOS PARA A VALORIZAÇÃO DO TESTE DE ANA-IFI

O cenário descrito poderia desencorajar o uso do ANA-IFI na prática clínica. Entretanto, este é um teste extremamente valioso quando bem indicado e apropriadamente interpretado. Portanto, há que se exercitar critério rígido para sua solicitação e interpretação. Alguns elementos são importantes para a valorização adequada do teste do ANA-IFI. Em primeiro lugar, o exame deve ser solicitado apenas quando houver suspeita convincente de doença auto-imune. Sua solicitação frente a um paciente com queixas vagas, frequentemente trará mais confusão ao raciocínio clínico, visto que um resultado positivo não implica necessariamente em auto-imunidade. Um segundo ponto a ser considerado é o título do ANA-IFI, embora seu valor seja relativo. Em geral, os pacientes auto-ímmunes tendem a apresentar títulos moderados (1/160 e 1/320) e elevados ($\geq 1/640$), enquanto os indivíduos saudáveis com ANA-IFI positivo tendem a apresentar baixos títulos (1/80)⁹. Entretanto, é importante ter em mente que exceções de ambos os lados não são infreqüentes¹⁰.

Um outro ponto importante é o padrão de fluorescência que, como mencionado anteriormente, fornece uma indicação da identidade do(s) auto-anticorpo(s) em questão¹¹. É sabido que auto-anticorpos contra alguns antígenos têm associação bastante estrita a determinadas doenças auto-ímmunes ou ao estado de auto-imunidade em si, enquanto outros ocorrem indiscriminadamente em indivíduos auto-ímmunes e não auto-ímmunes. Desta forma, determinados padrões de fluorescência são mais específicos de doença auto-imune que outros. A importância do parâmetro padrão de fluorescência pode ser comparada à das características descritivas de um sopro cardíaco, que podem defini-lo como um sopro inocente ou indicar uma lesão valvar complexa. Este ponto será

debatido em maior detalhe abaixo. Finalmente, é importante a realização de testes complementares ao ANA-IFI, para que seja verificada se a reatividade encontrada no teste ANA-IFI corresponde a algum auto-anticorpo de especificidade conhecida, como por exemplo, anti-DNA nativo ou anti-Scl-70.

Estudos de biologia molecular e celular permitiram estabelecer a associação de diversos padrões de fluorescência, domínios celulares e seus respectivos auto-antígenos. Assim, o padrão nuclear pontilhado grosso (Figura 1-A), por exemplo, representa exatamente o mapa de distribuição das proteínas envolvidas no processamento (*splicing*) do RNA mensageiro¹², também conhecido como "spliceosome". Ocorre que as principais proteínas do "spliceosome" são exatamente aquelas reconhecidas pelos anticorpos anti-Sm (proteínas B, B', D, D', E, F e G)¹³ e anti-UI-RNP (proteínas A, C e 70kDa)¹⁴. Analogamente, o padrão nuclear pontilhado grosso é virtualmente específico de anticorpos anti-Sm e/ou anti-UI-RNP. Da mesma forma, o padrão nuclear homogêneo (Figura 1-B) representa a distribuição da cromatina no núcleo e, portanto, tende a ser ocasionado por anticorpos contra o DNA nativo, nucleossomo ou histonas¹⁵.

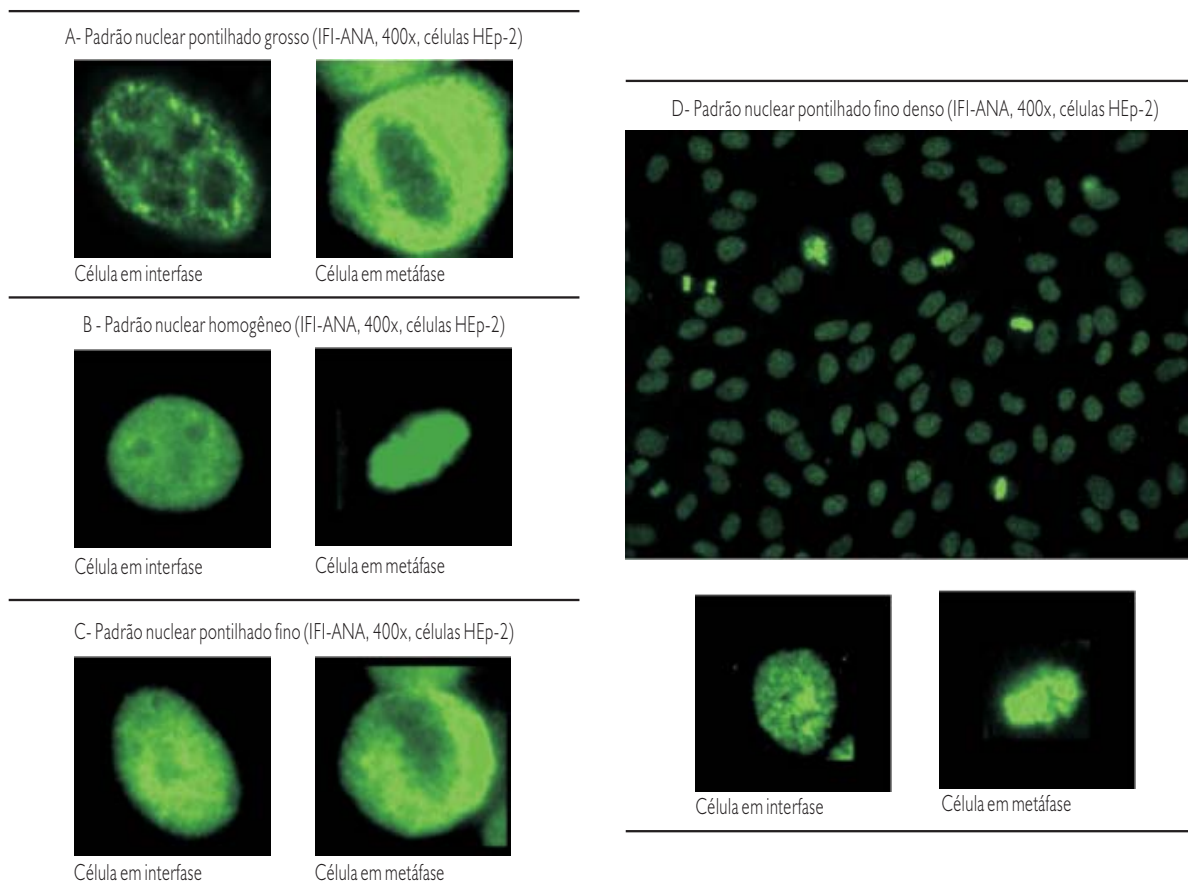
Outros padrões observados no teste ANA-IFI, também associados especificamente a determinados domínios nucleares e seus respectivos antígenos, não são considerados particulares a uma dada doença. Isto decorre do fato que os anticorpos, contra esses antígenos, não são estritamente associados a uma condição auto-imune ou mesmo à auto-imunidade em geral. Alguns dos padrões comumente encontrados na rotina laboratorial e seus respectivos auto-antígenos estão assinalados na Tabela 1.

O PADRÃO NUCLEAR PONTILHADO FINO DENSO

Em meados de 1994, passou a ser alvo de grande interesse um novo padrão nuclear, definido como Pontilhado Fino Denso (PFd/DFS70)¹⁶. Este padrão é caracterizado por um peculiar pontilhado fino cobrindo todo o núcleo de células em intérfase. Um ponto distintivo é que, diferentemente dos demais padrões nucleares pontilhados finos (Figura 1-C) que não coram a placa cromatínica na metáfase, o PFd apresenta coloração grosseira e intensa da placa metafásica (Figura 1-D). A importância prática do padrão PFd advém do fato que na rotina laboratorial o mesmo é observado em elevada frequência e em títulos médios a altos (1/160 a $\geq 1/640$). Vários estudos, por diferentes grupos, têm procurado definir as associações imunológicas e clínicas do padrão PFd.

O estudo pioneiro foi realizado por Ochs et al. (1994)¹⁶, em que 96 pacientes foram selecionados com base em questionário pré-estabelecido a partir de grupo de 374 indivíduos portadores de cistite intersticial. Um grupo controle foi composto por 17 indivíduos hígidos. As amostras de soros foram processadas por IFI, utilizando células HEp-2 como substrato antigênico. Dos 96 portadores de cistite intersticial, 35 (36%) apresentaram anticorpos antinúcleo, assim como 4 indivíduos do grupo controle. Destes 35 indivíduos, 24 (68%) apresentaram o padrão PFd em título superior ou igual a 1/160, sete (20%) padrão nucleolar, três (9%) padrão citoplasmático mitocondrial e um (3%) padrão nuclear pontilhado grosso.

Figura 1 - Imunofluorescência indireta em células HEp-2 exibindo os padrões nucleares pontilhado grosso (A), homogêneo (B), pontilhado fino (C) e pontilhado fino denso (D). Na célula em mitose, nesta figura demonstrada em metáfase, os antígenos alvos dos padrões homogêneo e pontilhado fino denso concentram-se na placa metafásica. Ao contrário, os antígenos alvos dos padrões pontilhado fino e pontilhado grosso não são encontrados na placa metafásica. Aumento de 400X.

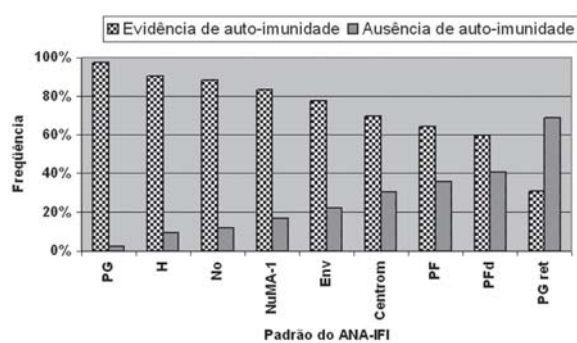


Em 2000¹⁷, os mesmos autores verificaram que de 64 pacientes, oriundos do departamento de dermatologia da Escola Universitária de Nagoya e criteriosamente classificados como portadores de dermatite atópica, 29,7% apresentavam o padrão nuclear PFd e reconheciam uma proteína de cerca de 70kDa no WB com extrato total de cultura celular. Este grupo foi capaz de clonar o DNA complementar do auto-antígeno em questão, denominado DFS70, e demonstrar que sua seqüência era idêntica àquela do fator de transcrição p75 e ao fator de crescimento derivado do cristalino¹⁸. A função fisiológica desta proteína está intimamente relacionada à sobrevivência celular, promovendo crescimento e resistência a apoptose induzida por estresse ambiental, como choque térmico e estresse oxidativo¹⁹. Finalmente, a análise da casuística deste grupo permitiu estender o espectro de abrangência clínica: 28% (18/64) dos pacientes apresentavam dermatite atópica, 16% (8/50) asma, 9% (9/103) cistite intersticial e 6,9% síndrome de Sjögren.

Ainda em estudos com indivíduos acometidos pela dermatite atópica, Ayaki et al.²⁰ verificaram a presença de auto-anticorpos contra DFS70 por teste imunoenzimático com frequência de 71,4% em 21 pacientes japoneses portadores da enfermidade. Este mesmo grupo também refere sucintamente o achado de 5,4% de positividade para o PFd entre 650 amostras de mulheres obtidas em banco de sangue de Chicago. Mais recentemente, Sugiura et al.²¹ consideraram o LEDGF/p75 como o principal auto-antígeno na patogênese da dermatite atópica. Tal afirmação advém do encontro destes auto-anticorpos em 30% dos pacientes acometidos pela enfermidade e avaliados em seu estudo.

Porém, outros grupos também investigaram possíveis associações clínicas dos anticorpos anti-LEDGF/p75 em indivíduos clinicamente distintos dos mencionados até aqui. Yamada et al.²² demonstraram, por análise sorológica utilizando método imunoenzimático com proteína recombinante, auto-anticorpos contra LEDGF/p75

Figura 2- Distribuição do padrão de fluorescência no teste de anticorpos antinúcleo em células HEP-2 (ANA-IFI), em 389 pacientes, de acordo com presença e ausência de evidência de auto-imunidade. PG: pontilhado grosso; H: homogêneo; No: nucleolar; NuMA-1: aparelho mitótico característico da proteína NuMA-1; Env: envelope nuclear; Centrom: centromérico; PF: pontilhado fino; PFd: pontilhado fino denso; PG ret: pontilhado grosso reticulado.



em 66,7% de pacientes japoneses com a síndrome de Vogt-Koyonagi-Harada, uma doença inflamatória auto-imune caracterizada por panuveíte bilateral aguda, vitiligo e alopecia, meningite e perda de audição. De especial interesse, anticorpos anti-LEDGF/p75 foram encontrados também em 21,6% dos indivíduos hígidos que faziam parte do grupo controle deste estudo. Okamoto et al.²³ constataram a presença de anticorpos anti-LEDGF/p75 em 22 (20%) de 111 pacientes japoneses com alopecia aerata e em 8 (8%) de 105 indivíduos hígidos. Nesse mesmo ano, Watanabe et al.²⁴ pesquisaram a frequência de anti-LEDGF/p75 em 597 trabalhadores hígidos de um hospital urbano no Japão (142 homens e 455 mulheres), utilizando IFI-ANA, WB e método imunoenzimático com LEDGF/DFS70 recombinante. Pela técnica de IFI-ANA, foi verificado que 20% dos indivíduos apresentaram reatividade nuclear e, destes, 64 apresentaram o padrão nuclear PFd, representando 11% do grupo estudado e 64% dos IFI-ANA positivos.

Mais recentemente, Muro et al.²⁵ estudaram as amostras do grupo de Watanabe²⁴ e lograram estabelecer associação entre alelos do HLA de classe II e a presença de auto-anticorpos anti-LEDGF/p75. Entre os pacientes portadores de anticorpos anti-LEDGF/p75 foi observada uma frequência aumentada dos alelos HLADRBI*0410, -DQB1*0402, e -DPB1*0301, enquanto o alelo HLA-DQB1*0302 apresentou-se em menor frequência quando comparado ao grupo controle. Todos os indivíduos anti-LEDGF/p75 positivos expressavam pelo menos um alelo HLA-DQB1 com um ácido aspártico no resíduo 57. De maneira interessante, o terreno imunogenético dos indivíduos japoneses com anti-LEDGF/p75 difere daquele observado em pacientes com doenças auto-imunes sistêmicas. Por isso, os autores sugerem que genes do HLA de classe II influenciam a produção de anti-LEDGF/p75 entre os indivíduos com diferentes manifestações clínicas.

Os estudos acima mencionados, exceto o de Watanabe et al.²⁴, partiram de coleções de amostras em instituições com interesse específico em determinadas enfermidades, o que poderia ter ocasionado viés amostral e falseado as associações clínicas obtidas. De fato, nossa prática clínica cotidiana tem nos apontado uma frequência extremamente elevada do padrão PFd, que não se coaduna à frequência esperada das enfermidades listadas como associadas ao mesmo. Passamos, portanto, a estudar a frequência e as possíveis associações imunológicas e clínicas do padrão PFd. Entre 30.728 amostras encaminhadas a um grande laboratório clínico de São Paulo para triagem de auto-anticorpos em células HEP-2 por IFI, no período de janeiro de 2001 a janeiro de 2003, observamos que 13.641 (44%) apresentavam reatividade com o núcleo celular, sendo que 41% destas apresentaram o padrão PFd e 47% apresentavam o padrão pontilhado fino (PF)²⁶. Entretanto, enquanto o padrão PF ocorreu predominantemente em baixos títulos (1/80; 66%), o padrão PFd foi observado igualmente em baixos (1/80; 35%), médios (1/160 e 1/320; 44%) e altos títulos (≥ 1/640; 22%).

Partindo do princípio de que boa parte das amostras analisadas em um laboratório clínico geral não deveriam representar pacientes auto-imunes, podemos suspeitar que os padrões mais frequentes nesta amostragem possam ser representativos dos padrões normalmente encontrados em indivíduos saudáveis ou pacientes não auto-imunes, mas que apresentem FAN positivo. Este raciocínio também nos sugere que o padrão de fluorescência pode ser um parâmetro importante na valorização do teste de ANA-IFI. Em particular, os padrões PF e PFd parecem estar frequentemente representados nos indivíduos não auto-imunes.

Para que estas hipóteses pudessem ser testadas de forma objetiva, passamos a levantar informações clínicas de forma sistemática junto aos médicos de uma amostragem aleatória de 394 pacientes¹⁰. De acordo com o protocolo preestabelecido, os pacientes puderam ser classificados como tendo enfermidades auto-imunes ou como não tendo qualquer evidência de auto-imunidade. Como podemos observar na Figura 2, os padrões nuclear pontilhado grosso e homogêneo associaram-se quase exclusivamente a pacientes com enfermidades auto-imunes. Em contrapartida, os padrões nuclear pontilhado fino denso, nuclear pontilhado reticulado e nuclear pontilhado fino associaram-se predominantemente a indivíduos sem qualquer evidência de auto-imunidade. Ao se conjugarem as informações de padrão de fluorescência e título, observou-se, para os padrões PF e pontilhado grosso reticulado, que a associação com ausência de auto-imunidade foi real apenas em títulos baixos. O mesmo não foi absolutamente verdadeiro para o padrão PFd, que apresentou alta taxa de associação com ausência de auto-imunidade em títulos baixos, médios e altos. Estes achados corroboram aqueles obtidos na análise inicial de toda a rotina de ANA-IFI em um grande laboratório clínico geral.

Em paralelo, trabalhamos na caracterização imunológica das amostras apresentando o padrão PFd e observamos que o mesmo apresenta alta associação com a especificidade imunológica anti-LEDGF/p75²⁶. Em outras palavras, 80 entre 81 amostras apresentando o padrão PFd continham anticorpos contra a proteína

Tabela I – Exemplos de padrões de IFI-ANA, auto-antígenos associados e possíveis correlações clínicas

Padrão de IFI-ANA	Auto-antígeno(s) associado(s)	Correlação clínica
Nuclear homogêneo	DNA nativo	LES
	DNA de hélice simples	Artrite juvenil idiopática; LES induzido por drogas e LES idiopático.
	Histona (H1, H2A, H2B, H3, e H4)	LES idiopático; LES induzido por drogas; AR; Síndrome de Felty; Artrite juvenil idiopática; Esclerose sistêmica; Cirrose biliar primária; Hepatite auto-imune.
Nuclear pontilhado fino	Nucleossomo	LES
	La/SS-B Ro/SS-A	Síndrome de Sjögren, LES, LES neonatal, LES cutâneo. Síndrome de Sjögren, LES, LES cutâneo, LES neonatal, AR, Esclerose Sistêmica, Polimiosite.
Nuclear pontilhado grosso	Sm U1-RNP (22, 34 e 70kDa)	LES DMTC; LES; Esclerose Sistêmica.
Nuclear pontilhado grosso reticulado	Ribonucleoproteínas heterogêneas (hnRNP)	LES, DMTC, outras doenças reumáticas, doenças inflamatórias crônicas e mesmo em indivíduos hígidos.
Membrana nuclear	Lamins, Lamin B, gp210	Doenças reumáticas auto-imunes, hepatopatias, doenças virais e também em indivíduos hígidos.
Raros pontos nucleares	p80 coilina (80kDa)	Síndrome de Sjögren, doenças inflamatórias, indivíduos hígidos.
Múltiplos pontos nucleares	Sp-100	Cirrose biliar primária
Nuclear pleomórfico	Antígenos de célula em proliferação (34kDa) (PCNA)CENP-F (340kDa)	LES, condições neoplásicas.
Centromérico	Proteínas associadas ao centrômero (CENP-A de 17kDa, CENP-B de 80kDa e CENP-C de 140kDa)	CREST; Esclerose Sistêmica, Cirrose biliar primária.
Nucleolar	Fibrilarina (34kDa) (Nucleolar grumoso)	Esclerose Sistêmica
	PM-Scl (20-110kDa) (Nuclear pontilhado fino e nucleolar homogêneo)	PM/ES; PM/DM, Esclerose Sistêmica.
	RNA polimerase I (10 a 220kDa) (Nuclear e nucleolar pontilhados com pontos isolados na placa metafásica)	Esclerose sistêmica.
	Scl-70 (100kDa) Nuclear e nucleolar pontilhado fino.	Esclerose Sistêmica, formas difusas.

LES: Lúpus eritematoso sistêmico, AR: Artrite reumatóide, DMTC: Doença mista do tecido conectivo; PM/ES: superposição entre polimiosite e esclerose sistêmica; PM/DM: polimiosite e dermatomiosite.

LEDGF/p75 pela técnica de *immunoblot*. Desta forma, concluímos que a presença do padrão Pfd no teste de ANA-IFI é virtualmente específica de anticorpos anti-LEDGF/p75. Neste estudo, observou-se que apenas 18,5% dos pacientes com anticorpos anti-LEDGF/p75 apresentavam algum tipo de doença reumática auto-imune e que a maioria não apresentava qualquer indício de auto-imunidade: cistite intersticial (1,2%), quadros alérgicos (4%), dores difusas, artralgia, fibromialgia e síndrome da fadiga crônica (26%), processos infecciosos (adenovirose, hepatite C, sinusite, infecção urinária e toxoplasmose aguda) (7,4%), neoplasias (2,4%), causas ginecológicas (aborto de repetição, endometriose e mioma) (4%), e causas diversas (acne, aneurisma, cefaléia, dor abdominal, prótese de fêmur, transplante hepático, varizes, verrugas e vertigem)

(18,5). Havia informação pregressa sobre dados sorológicos de 40 destes casos, por um período de até quatro anos, e observou-se que 37 (93%) mantiveram títulos altos e estáveis de anticorpos para este auto-antígeno.

No presente, estamos conduzindo estudo sobre a frequência e o padrão do ANA-IFI em trabalhadoras hígidas de uma hidrelétrica. Nossos dados preliminares corroboram os achados anteriores²⁴, uma vez que o padrão Pfd foi freqüentemente encontrado nas mulheres hígidas com ANA positivo, aparecendo em títulos baixos, médios e altos.

Vale alertar que embora o padrão Pfd e os anticorpos anti-LEDGF/p75 sejam predominantemente encontrados em indivíduos sem evidências atuais de auto-imunidade, uma parcela de até

20% dos casos pode apresentar alguma doença auto-imune. Por outro lado, o significado do encontro de anticorpos anti-LEDGF/p75 em indivíduos sem evidência de enfermidade auto-imune não está definido e não se pode descartar a existência de processos inflamatórios crônicos subclínicos induzindo a expressão anômala do fator de sobrevivência celular LEDGF/p75, que desta forma poderia tornar-se auto-imunogênico em indivíduos geneticamente predispostos.

Em conclusão, a presença de auto-anticorpos em pessoas hígdas ou sem evidência de auto-imunidade é considerável, variando de 10% a 15% nas várias casuísticas. A solicitação indiscriminada de ANA-IFI tem ocasionado situações conflitantes quando resultados positivos são confrontados com dados clínicos inconsistentes. Alguns elementos podem auxiliar na valorização correta de um resultado positivo de ANA-IFI, como a existência de elementos clínicos ou laboratoriais sugestivos de auto-imunidade e a presença concomitante de auto-anticorpos específicos. Características intrínsecas do teste ANA-IFI também podem ser úteis. O título do ANA-IFI é um parâmetro de valor limitado, enquanto o padrão de fluorescência pode ter impacto mais decisivo. Em especial, chama-se atenção para os padrões nucleares pontilhado grosso e nuclear homogêneo, via de regra associados a estados auto-imunes sistêmicos, e para os padrões nucleares pontilhado fino, pontilhado fino denso e pontilhado grosso reticulado, frequentemente presentes em indivíduos hígdos e em pacientes sem evidências de auto-imunidade. Entre esses, salienta-se o padrão nuclear pontilhado fino denso, por seu reconhecimento relativamente recente e por representar o padrão observado frequentemente e em maiores títulos em indivíduos não auto-imunes.

Conflito de interesse: não há.

SUMMARY

RELEVANCE OF THE IMMUNOFLOUORESCENCE PATTERN FOR INTERPRETATION OF THE ANA TEST – THE CASE OF THE DENSE FINE SPECKLED PATTERN

Determination of autoantibodies against cellular antigens (ANA-HEp-2) has undergone several methodological changes over the decades and for an appropriate evaluation of results requires reflection on its sensitivity and specificity properties. Currently the test is known to have high sensitivity and questionable specificity since it is frequently positive in a considerable number of non-autoimmune subjects. Awareness that a substantial portion of the population has a positive ANA-HEp-2 test demands that characteristics permitting to distinguish positive tests in autoimmune patients from positive tests in non-autoimmune subjects be identified. Among these characteristics are noteworthy the titer and the fluorescence pattern. In particular, one must bear in mind that the fluorescence pattern results from recognition by autoantibodies of distinct cellular structures and, therefore, the fluorescence pattern provides a preliminary indication of possible autoantigens targeted by the sera being tested. An emblematic example is the nuclear dense fine speckled pattern. It was originally studied by Ochs and

collaborators in 1994 in a restricted number of patients with interstitial cystitis. Further studies demonstrated its frequent occurrence in laboratory practice in individuals with diverse non-autoimmune clinical conditions. Indeed, this pattern is one of the most frequently observed in non-autoimmune patients with an ANA-HEp-2 positive reaction. The present review intends to provide elements allowing the clinician to perform a critical interpretation of results of an ANA-HE-2 test, including analysis of the titer and the fluorescence pattern. [Rev Assoc Med Bras 2007; 53(5): 439-45]

KEY WORDS: Antibodies. Antinuclear. Rheumatology. Fluorescent antibody technique. Indirect autoantibodies. Autoimmune diseases. Autoimmunity.

REFERÊNCIAS

- Hargraves M, Richmond M, Morton R. Presentation of two bone marrow elements: the "tart" cell or LE cell. *Mayo Clin Proc.* 1948;23:25-8.
- Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Mais AT, McShane DJ, Rothfield NF, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1982;25:1271-7.
- Coons AH, Kaplan MH. Localization of antigen in tissue cells II: improvements is a method for the detection of Antigen by means of fluorescent antibody. *J Exp Med.* 1950; 91:1-13.
- Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus [letter]. *Arthritis Rheum.* 1997;40:17-25.
- Harmon CE, Deng J-S, Peebles CL. The importance of tissue substrate in the SS-A/Ro antigen-antibody system. *Arthritis Rheum.* 1984;27:166-73.
- Maddison PJ, Provost TT, Reichlin M. Serological findings in patients with "ANA-negative" systemic lupus erythematosus. *Medicine.* 1981;60:87-94.
- Dellavance A, Gabriel Jr A, Cintra AF, Ximenes AC, B+Nuccitelli B, Tabilerti BH, et al. II Consenso Brasileiro de fator antinuclear em células HEp-2. Definições para a padronização da pesquisa de auto-anticorpos contra constituintes do núcleo (FAN HEp-2), nucléolo, citoplasma e aparelho mitótico e suas associações clínicas *Rev Bras Reumatol.* 2003;43:129-40.
- Forslid J, Heigl Z, Jonsson J, Scheynius A. The prevalence of antinuclear in healthy young persons and adults, comparing rat liver tissue sections with HEp-2 cells as antigen substrate. *Clin Exp Rheumatol.* 1994;12:137-41.
- Tan EM, Feltkamp TE, Smolen JS, Butcher B, Dawkins R, Fritzler MJ, et al. Range of antinuclear antibodies in "healthy" individuals. *Arthritis Rheum.* 1997;40:1601-11.
- Leser PG, Dellavance A, Barbosa SH, Guis G, Rodrigues SH, Sato EI, et al. Distinctive features of antinuclear antibodies observed in health and in subjects with autoimmune rheumatic diseases. In: Conrad K, Bachmann MP, Chan EKL, Fritzler MJ, Humbel RL, Sack U, et al., editors. From animal models to human genetics: research on the induction and pathogenicity of autoantibodies. Dresden: Pabst; 2004. v.4, p.493-510.
- Fritzler MJ, Pauls JD, Kinsella TD, Bowen TJ. Antinuclear, anticytoplasmic, and anti-Sjögren's syndrome antigen A (SS-A/Ro) antibodies in female blood donors. *Clin Immunol Immunopathol.* 1985;36:120-8.
- Cooper G.M. Estrutura e função celular: domínios funcionais dentro do núcleo. In: Cooper GM, editor. A célula: uma abordagem molecular. Porto Alegre: Artmed; 2002 p.356.
- Rokeach IA, Hoch SO. B-cell epitopes of Sm autoantigens. *Mol Biol Rep.* 1992;16:165-74.

14. Migliorini P, Baldini C, Rocchi V, Bombardieri S. Anti-Sm ans anti-RNP antibodies. *Autoimmunity*. 2005;38:47-54.
15. Gonzales C, Garcia-Berrocal B, Herraes O, Navajo JÁ, Gonzales-Buitrago JM. Anti-nucleosome, anti-chromatin, anti-dsDNA ans anti-histone antibody reactivity in systemic lupus erythematosus. *Clin Chem Lab Med*. 2004;42:266-72.
16. Ochs RL, Stein TW, Peebles CL, Gittes RF, TAN EM. Autoantibodies in interstitial cystitis. *J Urol*. 1994;151:587-92.
17. Ochs RL, Muro Y, Si Y, Ge H, Chan E, Tan EM. Autoantibodies to DFS 70 kd/transcription coactivator p75 in atopic dermatitis and other conditions. *J Allergy Clin Immunol*. 2000;105:1211-20.
18. Singh DP, Ohguro N, Kikuchi T, Sueno T, Reddy VN, Yuge K, et al. Lens epithelium-derived growth factor: effects on growth and survival of lens epithelial cells, keratinocytes, and fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;267:373-81.
19. Shinohara T, Singh DP, Fatma N. LEDGF, a survival factor, activates stress-related genes. *Prog Retin Eye Res*. 2002;21:341-58.
20. Ayaki M, Ohoguro N, Azuma N, Majima Y, Yata K, Ibaraki N, et al. Detection of cytotoxic anti-LEDGF autoantibodies in atopic dermatitis. *Autoimmunity*. 2002;35:319-27.
21. Sugiura K, Muro Y, Nishizawa Y, Okamoto M, Shinohara T, Tomita Y, et al. LEDGF/DFS70, a Major autoantigen of atopic dermatitis, is a component of keratohyalin granules. *J Invest Dermatol*. 2006;127:75-80.
22. Yamada K, Shinohara T, Nakatsura T, Nakatsura T, Murata Y, Ishihara M, et al. Humoral immune response directed against LEDGF in patients with VKH. *Immunol Lett*. 2001;78:1618.
23. Okamoto M, Ogawa Y, Watanabe A, Sugiura K, Shimomura Y, Aoki N, et al. Autoantibodies to DFS70/LEDGF are increased in alopecia areata patients. *J Autoimmun*. 2004;23:257-66.
24. Watanabe A, Kodera M, Sugiura K, Usuda T, Tan EM, Takasaki Y. Anti-DFS70 antibodies in 597 healthy hospital workers. *Arthritis Rheum*. 2004;50:892-900.
25. Muro Y, Ogawa Y, Sugiura K, Tomita Y. HLA-associated production of anti-DFS70/LEDGF autoantibodies and systemic autoimmune disease. *J Autoimmun*. 2006;26:252-7.
26. Dellavance A, Viana VS, Leon EP, Bonfa ES, Andrade LE, Leser PG. The clinical spectrum of antinuclear antibodies associated with the nuclear dense fine speckled immunofluorescence pattern. *J Rheumatol*. 2005;32:2144-9.

Artigo recebido: 8/11/06
Aceito para publicação: 16/6/07
