



# REVISTA BRASILEIRA DE REUMATOLOGIA

www.reumatologia.com.br



## Editorial

# Derramando luz fluorescente no mundo dos anticorpos antinúcleo

## Shedding fluorescent light into the antinuclear antibody world

Autoanticorpos são importantes biomarcadores para a investigação clínica de doenças autoimunes sistêmicas (DAS).<sup>1</sup> Com frequência, a triagem para anticorpos antinúcleo (ANA) é iniciada com o consagrado teste de imunofluorescência indireta em células HEp-2 (teste ANA-HEp-2). O teste ANA-HEp-2 foi recomendado pelo *American College of Rheumatology* como padrão de excelência para triagem de autoanticorpos.<sup>2</sup> A popularização e expansão no uso desse teste por diversos especialistas nos últimos 15 anos vêm provocando ansiedade e perplexidade em vários casos, nos quais um teste positivo não corresponde à apresentação clínica. Alguns especialistas no campo sugeriram que a interpretação correta do padrão ANA-HEp-2 ajuda na discriminação de um teste positivo em indivíduos autoimunes e não autoimunes. Em particular, o grupo brasileiro assumiu a dianteira na elaboração de um consenso nacional sobre a classificação da nomenclatura dos padrões de ANA. Essa iniciativa foi extremamente bem-sucedida em nosso país e outros programas afins foram desenvolvidos em outras regiões do mundo. Esse número da revista apresenta as resoluções do IV Consenso Brasileiro sobre Nomenclatura dos Padrões de ANA.

### O carisma do teste ANA-HEp-2

Provavelmente devido a razões históricas, o teste ANA alcançou fortíssima reputação entre clínicos e leigos. Isso pode ser parcialmente compreendido se nos debruçarmos no cenário médico nos anos 1960 e 1970, quando a ciência médica estava começando a entender o potencial diagnóstico dos autoanticorpos. A princípio, os autoanticorpos foram demonstrados em casos de DRAI. Especificamente, o fator reumatóide foi identificado como marcador para artrite reumatóide,<sup>3</sup> e o fenômeno da célula LE foi ligado ao lúpus eritematoso sistêmico (LES).<sup>4</sup> Logo se percebeu que a base para o fenômeno da célula LE estava nos autoanticorpos contra desoxirribonucleoproteína (o equivalente ao que atualmente denominamos

anticorpos anti-nucleossomo ou anti-cromatina). Os primeiros testes de imunofluorescência indireta para demonstração de anticorpos antinúcleo (ANA) se baseavam em cortes de tecido de animais e demonstravam limitada sensibilidade e um grupo restrito de padrões de imunofluorescência. Apesar disso, o teste de imunofluorescência indireta de ANA logo substituiu o teste de célula LE, tendo sido incluído como um dos critérios de classificação para LES.<sup>5</sup>

Um aspecto importante a ser levado em consideração é que o teste ANA era solicitado principalmente por reumatologistas, nefrologistas e dermatologistas, habitualmente para investigar pacientes com alta probabilidade diagnóstica para LES. Isso resultava em uma elevada probabilidade pré-teste, contribuindo para um desempenho diagnóstico favorável do teste. Portanto, não surpreende que o teste ANA tenha alcançado grande reputação como teste diagnóstico específico para LES e doenças afins.

Nos anos de 1980 houve uma mudança de rumo em favor de células HEp-2 como o substrato para o teste; isso acrescentou toda uma nova dimensão ao teste ANA, devido à mais elevada sensibilidade e à vasta gama de novos padrões de imunofluorescência. Foi se percebendo gradativamente que, além do próprio núcleo, havia dúzias de padrões associados a outros compartimentos celulares, a saber, nucléolo, citoplasma, membrana nuclear e aparelho mitótico. As culturas de monocamada de células HEp-2 ofereciam um registro único dos diversos domínios celulares a serem salientados no sistema de imunofluorescência. As fascinantes imagens obtidas no teste ANA-HEp-2 contribuíram decisivamente para o carisma do teste.

Uma consequência importante dessa mudança de rumo foi que os autoanticorpos associados a um espectro mais amplo de doenças autoimunes no âmbito da reumatologia ou fora de seus domínios eram passíveis de detecção pelo teste HEp-2-ANA. Em consequência disso, maior número de médicos passou a solicitar o teste.

## A síndrome do ANA positivo idiopático

Dissonâncias entre a realidade e a expectativa fundamentada na reputação não são infreqüentes, e isso também vale para qualquer parâmetro utilizado na medicina para diagnóstico e tratamento de pacientes. Com efeito, a dissonância de reputação é precisamente o que temos hoje em dia para o teste ANA-HEp-2. Nada pode estar mais fora da realidade do que o conceito de que um teste ANA-HEp-2 positivo é específico para o diagnóstico de LES ou de qualquer outra doença autoimune sistêmica. No entanto, essa concepção equivocada está firmemente arraigada nas mentes de muitos médicos e pacientes, pelas mesmas razões expostas na seção precedente. No caso do teste ANA-HEp-2, a dissonância tem sua origem em vários fatores, inclusive a mudança na sensibilidade do teste, o cenário clínico no qual o teste é solicitado, e o fenômeno do viés de generalização das observações científicas.

O teste ANA-HEp-2 demonstrou ser muito mais sensível do que os testes da célula LE e ANA com uso de secções histológicas de roedor. O ganho em sensibilidade foi acompanhado por uma perda na especificidade, pois é possível se ter um teste ANA-HEp-2 positivo em pacientes com diversas condições inflamatórias, em doenças infecciosas e neoplásicas e mesmo em indivíduos aparentemente saudáveis. Diversos estudos demonstraram consistentemente a ocorrência de um teste ANA-HEp-2 positivo em 13-20% da população normal, de acordo com o gênero e a idade.<sup>6,7</sup> Em paralelo, o teste ANA-HEp-2 se tornou cada vez mais popular entre diversos especialistas; assim, hoje em dia esse teste é frequentemente solicitado por ginecologistas, neurologistas, internistas, psiquiatras, otorrinolaringologistas, dermatologistas, gastroenterologistas, pneumologistas, entre outros.<sup>8</sup> O uso disseminado do teste resulta necessariamente em baixa probabilidade pré-teste.<sup>9</sup> A consequência da frequência relativamente alta de um teste ANA-HEp-2 positivo em pacientes não portadores de DRAI, juntamente com seu uso disseminado, é um número elevado de resultados “falso-positivos”. Essa situação vem sendo chamada de síndrome do ANA positivo idiopático.

A síndrome do ANA positivo idiopático é uma espada de dois gumes. Muitos pacientes com queixas musculoesqueléticas e com outros sintomas que podem sugerir DRAI têm a oportunidade de serem examinados por um reumatologista, por causa de um ANA positivo solicitado pelo clínico geral ou por médico de outra especialidade. Mas muito estresse e confusão têm sido causados por um teste ANA-HEp-2 positivo em um paciente sem evidência objetiva de DRAI ou em pacientes com uma apresentação clínica indefinida. Em tais circunstâncias, é frequente que o médicos se vejam diante de dificuldades para interpretar um teste ANA positivo.

## O estetoscópio e as três dimensões do teste ANA-HEp-2

Sopros cardíacos são sinais sobejamente conhecidos de cardiopatia, sendo cuidadosamente investigados no exame clínico. Mas também é do conhecimento geral que nem todos os sopros são clinicamente significativos. De fato, sabe-se que muitos indivíduos saudáveis apresentam alguma forma de

sopro cardíaco. Para ajudar na interpretação da auscultação cardíaca, existe à disposição uma ampla gama de parâmetros que devem ser levados em consideração. Exemplificando, um leve sopro mesossistólico de baixa intensidade auscultado no quarto espaço intercostal adjacente à borda esquerda do esterno em um menino de 7 anos provavelmente não tem maior significado, ao contrário de um sopro diastólico áspero com uma onda retrógrada pré-sistólica auscultada no ápice cardíaco em uma mulher com 30 anos. Cardiologistas e internistas treinados ficarão atentos e tomarão decisões a respeito ao prosseguimento da investigação, levando em consideração essas nuances.

Analogamente ao teste ANA-HEp-2, o estetoscópio e o procedimento de auscultação cardíaca representam um aspecto bastante carismático na medicina. Mas o carisma não é o único aspecto em comum entre o estetoscópio e o teste ANA-HEp-2. Como ocorre com o estetoscópio, uma miríade de nuances existe na interpretação do teste ANA-HEp-2. Esses aspectos podem ser divididos em três dimensões. A cuidadosa análise das três dimensões do teste ANA-HEp-2 oferece um guia útil para a correta interpretação dessa importante investigação sorológica. A primeira e mais óbvia é o resultado qualitativo: negativo ou positivo. A segunda, também bastante intuitiva, é semi-quantitativa e se refere à concentração de autoanticorpos na amostra analisada. Geralmente essa dimensão é expressa como o título de reatividade. Quanto mais elevado for o título, mais alta será a concentração de autoanticorpos na amostra. O raciocínio intuitivo, de que resultados com título elevado são mais relevantes sob o ponto de vista clínico em comparação com resultados com título mais baixo no teste ANA-HEp-2, é geralmente correto, mas existem várias exceções que fazem com que essa regra seja bastante relativa. Com efeito, existem pessoas com um teste ANA-HEp-2 positivo em diluições de até 1/5.120, bem como pacientes com LES com um teste positivo em baixo título, por exemplo, 1/80 ou 1/160.

A terceira dimensão do teste ANA-HEp-2 diz respeito ao padrão de imunofluorescência e oferece uma coleção bastante rica de informações. Ela reflete a distribuição topográfica dos antígenos que estão sendo identificados pelos autoanticorpos presentes na amostra. Os diversos autoantígenos têm padrões de distribuição específicos no interior da célula e essa relação ficará enriquecida se analisarmos o comportamento dinâmico ao longo dos sucessivos estágios do ciclo celular. Frequentemente uma cuidadosa análise do padrão de imunofluorescência permite a sugestão de certas especificidades dos autoanticorpos com graus de confiança variáveis. Entretanto, nem todos os padrões de imunofluorescência permitem uma firme afirmativa acerca das possíveis especificidades de autoanticorpos associadas. A robustez da relação entre determinado padrão de imunofluorescência e os autoanticorpos associados varia conforme o padrão em questão.

Tem sido muito enfatizada a diferenciação dos padrões de ANA-HEp-2 em que existe a coloração das placas mitóticas cromossômicas. Considerando que a cromatina, a principal substância dos cromossomos, é alvo importante de autoanticorpos associados a LES (anti-DNA nativo, anti-nucleossomo, anti-histonas), os padrões que englobam o núcleo como um todo e a placa de metáfase poderiam ser interpretados como indicativos de anticorpos anti-

-cromatina ou anti-DNA nativo. Mas nuances morfológicas desvendam um cenário heterogêneo. Uma coloração hialina homogênea das placas cromossômicas mitóticas e uma coloração homogênea do núcleo em interfase são, de fato, compatíveis com anticorpos anti-DNA nativo e anti-nucleossomo. Por outro lado, uma coloração em padrão fino denso salpicado do núcleo em interfase e uma coloração em padrão denso grosso das placas mitóticas cromossômicas são compatíveis com anticorpos anti-DFS70/LEDGF<sup>10,11</sup>. O primeiro padrão indica forte possibilidade de LES e o segundo praticamente exclui esse diagnóstico.<sup>6,12</sup> A relação entre padrões de ANA-HEp-2 e autoanticorpos específicos alcança um elevado grau de confiabilidade em padrões complexos, nos quais a distribuição do autoantígeno ocorre em mais de um compartimento celular, de modo tão dinâmico e peculiar ao longo do ciclo celular que o torna virtualmente exclusivo para aquele autoantígeno. Considerando que pouquíssimas macromoléculas compartilham a mesma “coreografia celular”, são observadas associações muito específicas. Alguns exemplos de tal situação são o padrão de centrômero,<sup>13</sup> o padrão do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA),<sup>14</sup> os padrões NuMA-1 e NuMA-2,<sup>15,16</sup> o padrão CENP-F,<sup>17</sup> e o padrão Scl-70.<sup>18</sup>

Em nosso país, a percepção da importância da identificação e classificação corretas dos diversos padrões ANA-HEp-2 foi logo reconhecida por vários especialistas. O primeiro Consenso Brasileiro para Pesquisa de Autoanticorpos em HEp-2 ocorreu em 2000,<sup>19</sup> por iniciativa de Paulo Francescantonio, da Universidade Católica de Goiás, com o incentivo de Paulo Leser, da Escola Paulista de Medicina. Desde então, ocorreram mais três edições do Consenso Brasileiro, cada uma delas fazendo avançar e complementando as realizações das edições precedentes.<sup>20-22</sup> Em cada edição, numerosos especialistas da área acadêmica e de laboratórios particulares discutem a fundo diversos aspectos, como a definição, nomenclatura, associações imunológicas e relevância clínica dos diversos padrões ANA-HEp-2. Cada uma das edições publicou um documento final aprovado por todos os participantes, e todos foram amplamente divulgados em vários tipos de mídia. As recomendações do Grupo de Consenso vêm sendo amplamente adotadas pela maioria dos laboratórios clínicos e universitários no país. Clínicos interessados têm tido acesso a essas informações em artigos científicos, websites e séries de conferências. A transmissão das recomendações do Consenso contribuiu muito para melhorar a capacidade de interpretação e diferenciação dos diversos padrões ANA-HEp-2 pelos analistas em todo o país. O presente número da Revista Brasileira de Reumatologia oferece as atas do IV Consenso Brasileiro para Pesquisa de Autoanticorpos em HEp-2 ocorrido durante o XXIX Congresso Brasileiro de Reumatologia em 2012, em Vitória. Além das importantes discussões concernentes a aspectos críticos na metodologia para a determinação de autoanticorpos, novos padrões ANA-HEp-2 foram caracterizados e incorporados ao algoritmo de classificação.

Iniciativas afins foram efetuadas em diferentes partes do mundo. A iniciativa francesa foi publicada em 2005, informando a melhora e harmonização progressivas na metodologia para a realização do teste, bem como na comunicação do título e do padrão por mais de 600 laboratórios em todo

o país.<sup>23</sup> Foram considerados apenas padrões nucleares: homogêneo, salpicado, e centromérico. A iniciativa alemã enfatizou as recomendações técnicas para a realização do teste, tendo considerado sete padrões nucleares (o nucléolo foi considerado como sendo um tipo de padrão nuclear) e quatro padrões citoplasmáticos. As recomendações foram publicadas em 2009, e incluíram uma proposição detalhada e engenhosa da associação de padrões ANA-HEp-2, especificidades de autoanticorpos e possíveis doenças.<sup>24</sup> A iniciativa da Europa Setentrional é aquela que maiores semelhanças tem com o Consenso Brasileiro. A iniciativa envolveu especialistas da Dinamarca, Grã-Bretanha e Suécia. Suas recomendações foram publicadas em 2010 e oferecem um conjunto extremamente detalhado de padrões nucleares, nucleolares, citoplasmáticos e do aparelho mitótico. Fotografias de alta qualidade foram disponibilizadas para cada padrão, tendo sido estabelecidas associações entre especificidades de autoanticorpos e associações clínicas.<sup>25</sup> Mais recentemente, foi publicada a iniciativa argentina, que nos traz um algoritmo cuidadosamente organizado com muita semelhança com o Consenso Brasileiro.<sup>26</sup>

Essas iniciativas independentes em vários países refletem a importância desse assunto. Além disso, expressam a preocupação dos especialistas com a necessidade de harmonizar as informações fornecidas pela análise com vistas ao teste ANA-HEp-2. Com efeito, essas diversas iniciativas isoladas estão a indicar que chegou a hora de se realizar um Consenso Mundial sobre Padrões ANA. Essa percepção foi levada em conta pela liderança do Comitê de Padronização de Autoanticorpos, afiliado à União Internacional de Sociedades de Imunologia (*International Union of Immunology Societies, IUIS*) e à Organização Mundial da Saúde (OMS). Dentro dessa linha, o Comitê de Padronização de Autoanticorpos comissionou o XII Seminário Internacional de Autoanticorpos e Autoimunidade (*12<sup>th</sup> International Workshop on Autoantibodies and Autoimmunity, IWAA*) para implementação do seminário para o Consenso Internacional sobre Padrões ANA (*International Consensus on ANA Patterns, ICAP*). Com a participação de especialistas renomados oriundos de todas as partes do mundo, o ICAP acontecerá durante o primeiro dia do XII IWAA, que ocorrerá em São Paulo de 28 a 30 de agosto de 2014. Este será um evento que irá abrir caminho para um significativo progresso no diagnóstico sorológico das doenças autoimunes sistêmicas.

## Conflito de interesses

O autor declara não ter conflito de interesses.

## REFERÊNCIAS

1. Tan EM. Autoantibodies to nuclear antigens (ANA): their immunobiology and medicine. *Adv Immunol* 1982; 33:167-240.
2. Solomon DH, Kavanaugh AJ, Schur PH. Evidence-based guidelines for the use of immunologic tests: antinuclear antibody testing. *Arthritis Rheum* 2002; 47(4):434-44.
3. Waaler E. On the occurrence of a factor in human serum activating the specific agglutination of sheep corpuscles. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1940; 17(2):172-88.

4. Hargraves M, Richmond H, Morton R. Presentation of two bone marrow components, the tart cell and the LE cell. *Mayo Clin Proc* 1948; 23(2):25-8.
5. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF et al: The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982; 25(11):1271-7.
6. Mariz HA, Sato EI, Barbosa SH, Rodrigues SH, Dellavance A, Andrade LE. Pattern on the antinuclear antibody-HEp-2 test is a critical parameter for discriminating antinuclear antibody-positive healthy individuals and patients with autoimmune rheumatic diseases. *Arthritis Rheum* 2011; 63(1):191-200.
7. Satoh M, Chan EK, Ho LA, Rose KM, Parks CG, Cohn RD et al: Prevalence and sociodemographic correlates of antinuclear antibodies in the United States. *Arthritis Rheum* 2012; 64(7):2319-27.
8. Abeles AM, Abeles M. The clinical utility of a positive antinuclear antibody test result. *Am J Med* 2013;126(4):342-8.
9. Meroni PL, Chan EK, Tincani A, García de la Torre I, Andrade LE: Antinuclear antibody test: when to order? *Am J Med.* 2013 126(10):e17. <http://dx.doi.org/10.1016/j.amjmed.2013.04.022>
10. Ochs RL, Stein TW Jr, Peebles CL, Gittes RF, Tan EM. Autoantibodies in interstitial cystitis. *J Urol* 1994;151(3):587-92.
11. 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(11):2144-9.
12. Mahler M, Parker T, Peebles CL, Andrade LE, Swart A, Carbone Y, et al. Anti-DFS70/LEDGF antibodies are more prevalent in healthy individuals compared to patients with systemic autoimmune rheumatic diseases. *J Rheumatol* 2012;39(11):2104-10.
13. Moroi Y, Peebles C, Fritzler MJ, Steigerwald J, Tan EM. Autoantibodies to centromere (kinetochore) in scleroderma sera. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77(3):1627-31.
14. Takasaki Y, Fishwild D, Tan EM. Characterization of proliferating cell nuclear antigen recognized by autoantibodies in lupus sera. *J Exp Med* 1984;159(4):981-92.
15. Andrade LE, Chan EK, Peebles CL, Tan EM. Two major autoantigen-antibody systems of the mitotic spindle apparatus. *Arthritis Rheum* 1996; 39 (10):1643-53.
16. Whitehead CM, Winkfein RJ, Fritzler MJ, Rattner JB. The spindle kinesin-like protein HsEg5 is an autoantigen in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1996;39(10):1635-42.
17. Casiano CA, Humbel RL, Peebles C, Covini G, Tan EM. Autoimmunity to the cell cycle-dependent centromere protein p330d/CENP-F in disorders associated with cell proliferation. *J Autoimmun* 1995; 8(4):575-86.
18. Dellavance A, Gallindo C, Soares MG, da Silva NP, Mortara RA, Andrade LE. Redefining the Scl-70 indirect immunofluorescence pattern: autoantibodies to DNA topoisomerase I yield a specific compound immunofluorescence pattern. *Rheumatology (Oxford, England)* 2009;48(6):632-7.
19. Dellavance A, Gabriel Jr A, Cintra AFU, Ximenes AC, Nuccitelli B, von Mühlen CA et al. The first Brazilian Consensus for Standardization of ANA in HEp-2 cells. *J Bras Patol Med Lab* 2002; 38(3):207-16.
20. Dellavance A, Gabriel Jr G, Cintra AFU, Ximenes AC, Nuccitelli B, Taliberti BH et al. II Brazilian Consensus on Antinuclear Antibodies in HEp-2 Cells. Definitions for standardization of autoantibody testing against the nucleus (ANA HEp-2), nucleolus, cytoplasm, and mitotic apparatus, as well as its clinical associations. *Rev Bras Reumatol* 2003;43(3):129-40.
21. Dellavance A, Gabriel Jr A, Nuccitelli B, Taliberti BH, von Mühlen CA, Bichara CDA et al. Third Brazilian Consensus for autoantibodies screening in HEp-2 cells (ANA). Recommendations for standardization of the autoantibody testing in HEp-2 cells, quality control, and clinical associations. *Rev Bras Reumatol* , 2009; 49(2):89-109.
22. Francescantonio PLC, Cruvinel WM, Andrade LEC, Dellavance A, Taliberti BH et al. IV Brazilian Guidelines for autoantibodies on HEp-2 cells. *Rev Bras Reumatol* 54: 44-50.
23. Pham BN, Albarede S, Guyard A, Burg E, Maisonneuve P. Impact of external quality assessment on antinuclear antibody detection performance. *Lupus* 2005;14(2):113-9.
24. Sack U, Conrad K, Csernok E, Frank I, Hiepe F, Krieger T, et al. Autoantibody detection using indirect immunofluorescence on HEp-2 cells. *Ann N Y Acad Sci* 2009;1173:166-73.
25. Carballo GO, Igénito FB, Ginaca AA, Carabajal P, Costa MA, Balbaryski J. First Argentine Consensus for standardization of Antinuclear Antibodies by Indirect Immunofluorescence-HEp-2. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2012;46(1):3-13.
26. Wiik AS, Hoier-Madsen M, Forslid J, Charles P, Meyrowitsch J. Antinuclear antibodies: a contemporary nomenclature using HEp-2 cells. *J Autoimmun* 2010;35(3):276-90.

Luís Eduardo Coelho Andrade<sup>a,b,c</sup>

<sup>a</sup>Divisão de Reumatologia, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP)

<sup>b</sup>International Union of Immunology Societies (IUIS)

<sup>c</sup>Organização Mundial da Saúde (OMS)

E-mail: rbreumatol@terra.com.br (L.E.C. Andrade).