

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

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

Alessandra Dellavance⁽¹⁾, Alexandre Gabriel Júnior⁽²⁾, Alice F. U. Cintra⁽³⁾, Antônio Carlos Ximenes⁽⁴⁾,
Barbara Nuccitelli⁽⁵⁾, Ben Hur Taliberti⁽⁶⁾, Caio Moreira⁽⁷⁾, Carlos Alberto von Mühlen⁽⁸⁾,
Carlos David Bichara⁽⁹⁾, Cláudio Henrique Ramos dos Santos⁽¹⁰⁾, Cristiane Martinez Yano⁽¹¹⁾,
Cristóvão Luis Pitangueira Mangueira⁽¹²⁾, Darlene Gonçalves Carvalho⁽¹³⁾, Eloísa Silva Dutra de O. Bonfá⁽¹⁴⁾,
Elvira M. Doi⁽¹⁵⁾, Fabiana Nunes de Carvalho Guimarães⁽¹⁶⁾, Flávia Ikeda e Araújo⁽¹⁷⁾,
Hugo Mendonça Mundim⁽¹⁸⁾, Jozelia Rego⁽¹⁹⁾, Lisiane Ericonio dos Anjos Vieira⁽²⁰⁾, Luciana Poli⁽²¹⁾,
Luís Eduardo Coelho Andrade⁽²²⁾, Maria Roseli Callado⁽²³⁾, Mauro Meira Mesquita⁽²⁴⁾, Mitiko Sugiyama⁽²⁵⁾,
Natasha Shlessarenko⁽²⁶⁾, Nilzio Antônio da Silva⁽²⁷⁾, Orlando Gabriel Carballo⁽²⁸⁾, Paulo Guilherme Leser⁽²⁹⁾,
Paulo Luiz Carvalho Francescantonio⁽³⁰⁾, Renata Jarach⁽³¹⁾, Ricardo Machado Xavier⁽³²⁾,
Roger Abramino Levy⁽³³⁾, Suzane P. F. Neves⁽³⁴⁾, Wilson de Melo Cruvinel⁽³⁵⁾, Wilton Silva dos Santos⁽³⁶⁾

* Trabalho realizado sob a coordenação de Fabiana Nunes de Carvalho Guimarães, Flávia Ikeda e Araújo, Paulo Luiz Carvalho Francescantonio e Wilson de Melo Cruvinel. Recebido em 15/4/2003. Aprovado, após revisão, em 21/4/2003.

1. Bióloga, mestre em Ciências/Reumatologia pela FMUSP.
2. Coordenador do curso de pós-graduação da Disciplina em Clínica Médica da UNIFESP.
3. Bio-Rad Laboratório Brasil/RJ.
4. Chefe do Departamento de Medicina Interna do Hospital Geral de Goiânia, Ministério da Saúde. Doutor em Reumatologia.
5. Biomédica. Padrão Laboratório Clínico.
6. Professor titular em Clínica Médica da Universidade Federal de Uberlândia/MG. Pós-doutorado no Rheumaforschung Institutes, Aachen, Alemanha.
7. Preceptor de residência do Serviço de Reumatologia do HC/UFMG. Presidente da Sociedade Brasileira de Reumatologia.
8. Professor adjunto de Reumatologia da PUCRS.
9. Patologista Clínico e Biomédico/PA.
10. New Life Produtos Hospitalares. Minas Gerais.
11. Professora assistente da disciplina de Imunologia da Universidade Católica de Goiás.
12. Reumatologista e patologista clínico, diretor do Serviço de Imunologia da Divisão de Laboratório Central do HC/FMUSP.
13. Patologista Clínica/MG.
14. Professora titular da Disciplina de Reumatologia do HC/FMUSP.
15. Laboratório Frischmann Aisengart. Paraná.
16. Professora convidada da Disciplina de Imunologia da Universidade Católica de Goiás.
17. Biomédica. Laboratório de Auto-Imunidade da Universidade Católica de Goiás.
18. Exame Medicina Laboratorial. Distrito Federal.
19. Reumatologista e responsável pelo Laboratório de Imuno-Reumatologia e HLA do HC/FMUSP.
20. Assessora de Imunologia da Lab. Santa Luzia. Santa Catarina.
21. Medivax/Bion. Rio de Janeiro.
22. Professor adjunto livre-docente da Disciplina de Reumatologia da UNIFESP.
23. Mestre em Clínica Médica/Reumatologia HSPE/SP.
24. Biomédico, coordenador do Laboratório da Área de Saúde da Universidade Católica de Goiás.
25. Farmacêutica-Bioquímica/SP.
26. Patologista clínica, mestre em Medicina pela USP. Professora da Univ. Fed. Mato Grosso. Presidente regional da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica.
27. Professor titular de Reumatologia. Chefe do Serviço de Reumatologia da FMUFG.

RESUMO

Objetivo: O Segundo Consenso Brasileiro de Fator Antinuclear (FAN) em Células HEP-2 ratificou os algoritmos de decisão para leitura dos padrões do FAN na imunofluorescência indireta vistos na primeira edição do Consenso Brasileiro, adicionando ainda um novo algoritmo relacionado com os padrões mistos. **Métodos:** Tendo em vista a habilidade do teste em detectar auto-antígenos nos distintos compartimentos celulares, e não apenas no núcleo, propõe-se novas denominações para este exame laboratorial. **Resultados e Conclusões:** Como novas denominações algumas sugestões foram igualmente aceitas, dentro do tema “pesquisa de auto-anticorpos contra constituintes do núcleo (FAN HEP-2), nucléolo, citoplasma e aparelho mitótico”. Foram abordadas as principais relevâncias clínicas com os padrões de FAN descritos, facilitando o melhor uso do ensaio pelo médico.

Palavras-chave: Auto-anticorpos, células HEP-2, FAN, imunofluorescência.

INTRODUÇÃO

O objetivo do médico ao solicitar exames laboratoriais para um doente reumático é de auxiliar no diagnóstico precoce da doença em questão. O número de auto-anticorpos para o diagnóstico de doenças sistêmicas ou órgão-específicas tem aumentado progressivamente desde que a técnica de imunofluorescência foi utilizada na sua triagem. Temos hoje uma variedade de padrões que pode ser resultado da ligação de vários auto-anticorpos distintos, de um número restrito deles, ou até mesmo de um único auto-anticorpo. Esses padrões têm grande importância, porquanto podem direcionar o raciocínio clínico e a investigação laboratorial adicional. De forma geral o clínico, com base no resultado da triagem de auto-anticorpos pela técnica do FAN, tem noção de qual deva ser o próximo passo na investigação. O diagnóstico em Reumatologia depende primariamente das

ABSTRACT

Objective: The Second Brazilian Consensus on Antinuclear Antibodies (ANA) in HEP-2 Cells approved and extended the decision trees developed during the First Brazilian Consensus in order to also offer information about mixed patterns of fluorescence. **Methods:** Since this test elicits reactions not only to nuclear autoimmune antigens but also to different cell compartments, new denominations for the test were approved. **Results and Conclusions:** These new denominations encompass variations on the “autoantibody testing against the nucleus (ANA HEP-2), nucleolus, cytoplasm, and mitotic apparatus” issue. Furthermore, major clinical associations were described for each immunofluorescent pattern, facilitating the interpretation of laboratory results in the clinical practice.

Keywords: Autoantibodies, HEP-2 cells, ANA, immunofluorescence.

formas de apresentação dos mais de cem tipos distintos de doenças reumáticas e o laboratório auxilia a referendar ou efetuar a hipótese diagnóstica.

A nomenclatura utilizada para definição dos padrões de FAN em nosso país foi inserida informalmente, muitas vezes sendo adaptada de nomenclatura estrangeira, principalmente dos idiomas inglês, francês e espanhol. O resultado inevitável desse processo foi o aparecimento de uma variedade de nomes de padrões, muitos dos quais destinados a descrever o mesmo aspecto morfológico. Por isso foi realizado nos dias 18 e 19 de agosto de 2000, em Goiânia, o I Consenso Nacional para a Padronização dos Laudos de FAN em Células HEP-2, com o propósito de reunir diversos especialistas de todo o Brasil e de padronizar as leituras de FAN, corrigindo a nomenclatura divergente até então utilizada. Sucintamente as recomendações do I Consenso podem ser vistas na Figura 1.

28. Bioquímico, Unidad Inmunología, Hospital Durand, Buenos Aires, Argentina.

29. Professor adjunto aposentado da Disciplina de Reumatologia da UNIFESP e assessor de imunopatologia do Laboratório Fleury.

30. Professor assistente da Disciplina de Imunologia da Universidade Católica de Goiás.

31. Biomédica do Padrão Laboratório Clínico/GO.

32. Professor adjunto doutor, PHD em Imunologia, médico reumatologista do Serviço de Reumatologia do HCPA/UFRGS.

33. Professor adjunto de Reumatologia da FCM/UERJ.

34. Professora adjunta da FM/UFMG. Doutora em Ciências pela FIOCRUZ.

35. Professor assistente da Disciplina de Imunologia da Universidade Católica de Goiás. Mestre em Medicina Tropical-Imunologia pela UFG.

36. Coordenador do Laboratório de Reumatologia do Hospital Universitário de Brasília e doutor em Reumatologia pela UNIFESP.

Endereço para correspondência: Laboratório de Apoio Didático/Departamento de Biomedicina/Universidade Católica de Goiás. Av. Universitária 1.069, Setor Universitário, CEP 74605-010, Goiânia, GO, e-mail: lad@ucg.br

- As diluições de triagem são 1/40 a 1/160 na dependência da lâmpada do microscópio (20W, 50W, 100W).
- Os critérios morfológicos a serem observados durante a leitura da lâmina são:
 - a) aspecto da matriz nuclear;
 - b) aspecto do nucléolo;
 - c) observação de todos os estágios de divisão celular;
 - d) aspecto do fuso mitótico;
 - e) aspecto do citoplasma.
- A combinação desses critérios resultou nos seguintes algoritmos de decisão:
 - 1) padrões nucleares;
 - 2) padrões nucleolares;
 - 3) padrões relacionados com o aparelho mitótico;
 - 4) padrões citoplasmáticos.
- A leitura do título final deve ser feita na última diluição em que o padrão é observável de forma definida.

Figura 1 – Recomendações do I Consenso Brasileiro de FAN HEp-2.

A pesquisa de auto-anticorpos em células HEp-2 tem grande valor clínico, porém⁽¹⁾, como qualquer exame laboratorial, deve ser analisada com cuidado. Um teste negativo para pesquisa de anticorpos antinúcleo é forte evidência contra o diagnóstico de lúpus eritematoso sistêmico. Podem ocorrer reações falso-negativas em alguns pacientes com anti-SS-A/Ro isolado⁽²⁾, anti-Jo-1⁽³⁾, anti-P ribossomal, baixos títulos de anticorpos ou presença de imunocomplexos⁽⁴⁾. Entretanto, no dia-a-dia do laboratório, o problema mais expressivo é a positividade do teste sem correlação clínica. Isso se deve em grande parte à utilização indiscriminada do exame como teste de triagem na população em geral e não em grupos selecionados de pacientes com clínica sugestiva.⁽⁵⁾ Antes de interpretar um resultado, devemos considerar que 5% da população normal e até 13% da população acima de 50 anos pode ter um teste positivo em título baixo^(4,6,7).

Após os resultados do I Consenso Nacional para Padronização dos Laudos de FAN em Células HEp-2⁽⁸⁾, considerado um modelo a ser seguido por seu pioneirismo em termos mundiais, estamos apresentando os resultados do II Consenso Nacional para Padronização dos Laudos de FAN em Células HEp-2 (pesquisa de anticorpos contra constituintes do núcleo, nucléolo, citoplasma e aparelho mitótico), cujos objetivos foram os seguintes: primeiro, aprimorar as diretrizes do I Consenso; segundo, enumerar as associações de cada padrão de fluorescência observado com um ou mais antígenos celulares; e, terceiro, listar as possíveis associações

clínicas de cada padrão/auto-anticorpo com doença específica ou manifestação clínica.

Um aspecto fundamental estabelecido neste II Consenso foi a própria terminologia empregada para designar o exame. A recomendação é que a terminologia tradicional FAN deva ser substituída por uma designação mais abrangente e que contemple a pesquisa de anticorpos contra todos os constituintes celulares, e não apenas contra os constituintes do núcleo celular. Isto em razão da introdução das células HEp-2 como substrato da reação de imunofluorescência, que passou a permitir a detecção de auto-anticorpos contra antígenos do núcleo, da membrana nuclear, do nucléolo e outros localizados no citoplasma. Ademais, as células HEp-2 permitem reconhecer auto-anticorpos contra estruturas protéicas expressas no aparelho mitótico e no núcleo nas diferentes fases do ciclo celular, tais como: proteínas do centrômero, as que se expressam durante a proliferação celular/antígeno nuclear de células em proliferação (PCNA, antígeno nuclear de células em proliferação), CENP-F (proteína F do centrômero) e inúmeras outras⁽¹⁾.

Outro aspecto relevante foi o reconhecimento da importância de se atentar para a marcação dos cromossomos na placa metafásica. Sabe-se que os diversos auto-antígenos nucleares apresentam grande dinamismo topográfico durante o ciclo celular⁽⁹⁾. O conhecimento de como cada auto-antígeno se comporta em cada fase do ciclo celular é um elemento-chave para se inferir os possíveis auto-anticorpos presentes em um determinado soro. A placa cromossômica metafásica é uma estrutura privilegiada sob esse aspecto, pois apresenta apenas a cromatina (DNA e histonas) e as proteínas a ela associadas. Assim, anticorpos contra DNA, histona, cromatina e DNA topoisomerase I (Scl-70) apresentarão marcação invariavelmente na placa metafásica. Por outro lado, anticorpos contra antígenos associados a RNA (Sm, U1-RNP, SS-A/Ro, SS-B/La) não coram a placa metafásica, ocasionando uma imagem negativa em seu lugar. A partir dessas observações, estabeleceu-se no II Consenso que o laudo deve conter um campo específico para descrição da marcação da placa cromossômica metafásica, principalmente nos laboratórios de pesquisa básica e aplicada.

Enfatizaram também os participantes do II Consenso a especificidade e sensibilidade do teste do FAN. Além de permitir a identificação de auto-anticorpos contra uma gama de antígenos extranucleares, a introdução da célula HEp-2 permitiu que alguns antígenos como SS-A/Ro, que não são adequadamente expressos nas células de camundongos, ratos ou cobaias, utilizados antigamente como substrato da reação, pudessem ter seus respectivos auto-anticorpos facilmente reconhecidos, tornando o teste muito mais sensível, mas em

contrapartida menos específico⁽¹⁰⁾. Como a pesquisa de anticorpos contra constituintes celulares (FAN) passou a ser solicitada por clínicos das especialidades mais diversas possíveis, neste II Consenso foi dado um alerta para lembrar a todos que solicitam este exame, que ele deve ser considerado como um teste de triagem e a interpretação e valorização do resultado devem estar fundamentadas no conhecimento da sensibilidade e especificidade do mesmo, bem como no contexto clínico particular.

O conhecimento prévio desta propriedade com relação à sensibilidade e especificidade permitirá entender a razão do achado do número crescente de reações positivas em indivíduos normais ou naqueles com diferentes processos inflamatórios específicos e inespecíficos, e que não guardam nenhuma relação com doenças reumáticas auto-imunes, para as quais o teste na maioria das vezes é solicitado.

Finalmente, os participantes deste II Consenso procuraram definir, baseados na experiência de cada um, e principalmente nos dados de revisão de literatura, quais as principais associações antigênicas e relevância clínica de cada padrão observado com diferentes patologias reumáticas e mesmo não reumáticas. Seguindo esse raciocínio, o II Consenso Brasileiro de FAN HEp-2 abordou a complexa análise dos padrões mistos que se encaixam em mais de um guia de classificação.

DENOMINAÇÃO DO TESTE

A interpretação da técnica de imunofluorescência indireta em células HEp-2 evoluiu acentuadamente no transcorrer dos últimos anos. Vivenciamos hoje uma pluralidade de padrões, cada qual com diversas opções de coloração histológica, permitindo-nos classificar mais de 25 possibilidades de laudos. Cada um desses pode refletir uma dada expressão antigênica reconhecida pelo seu auto-anticorpo, que norteia o clínico direcionando-o para uma melhor investigação diagnóstica. Diante dessa concreta evolução, o II Consenso Brasileiro de FAN HEp-2 tomou consciência dos prejuízos proporcionados pela denominação do ensaio Fator Antinúcleo (FAN), por não expressar as reais potencialidades do método que, além da triagem de auto-anticorpos nucleares, avalia a presença de anticorpos contra o nucléolo, citoplasma e aparelho mitótico. Atualmente é evidente o descaso, muitas vezes involuntário, com relação ao teste, em decorrência da não valorização dos resultados de padrões não nucleares que podem ser relevantes em determinadas circunstâncias. Exemplo claro disto são os padrões citoplasmáticos, de grande importância, como pode-se observar a seguir nas tabelas de associações clínicas.

Outro fator importante é o de que a maioria dos ensaios laboratoriais é remunerada por convênios que têm a sua referência no rol de procedimentos do Ministério da Saúde ou na lista de procedimentos da Associação Médica Brasileira, designada pelo ano de elaboração. No capítulo de patologia clínica o ensaio é denominado Fator Antinúcleo (FAN-HEp-2)-IFI, indicado pelo código 28.06.213-2, o que dificulta a implantação de uma nova forma de solicitar o ensaio, caso não seja tomada uma medida de renomeá-lo junto às novas listas de procedimentos da AMB.

Como resultado, o II Consenso adotou a estratégia imediata de incorporar à sigla FAN as outras pesquisas realizadas no ensaio, definindo seis opções possíveis de serem utilizadas pelos laboratórios brasileiros em seus laudos (Figura 2). Essa atitude objetiva divulgar, de forma mais proveitosa, as potencialidades de um exame de grande importância em áreas como Reumatologia, Nefrologia, Gastroenterologia, Neurologia e Psiquiatria.

1. FAN – Pesquisa de anticorpos contra componentes do núcleo, nucléolo, citoplasma e aparelho mitótico.
2. FAN – Pesquisa de auto-anticorpos.
3. Pesquisa de auto-anticorpos (FAN e citoplasmáticos).
4. Pesquisa de anticorpos contra componentes do núcleo (FAN), nucléolo, citoplasma e aparelho mitótico.
5. Pesquisa de auto-anticorpos – núcleo (FAN), nucléolo, citoplasma e aparelho mitótico.
6. Pesquisa de auto-anticorpos contra antígenos intracelulares (FAN).

Figura 2 – Novas denominações recomendadas para o teste do FAN.

CORPO DESCRITIVO DO LAUDO. O QUE MUDOU COM O SEGUNDO CONSENSO?

Os resultados do II Consenso incluem uma modificação nos algoritmos de classificação definidos no I Consenso Brasileiro, tendo sido criado um grupo de *padrões mistos* com o fim de resolver o problema dos padrões que não se encaixavam em apenas um algoritmo de classificação.

Outra mudança substancial ocorreu na denominação dos laudos dos *padrões citoplasmáticos que passaram a ser considerados como FAN positivos*. Essa mudança se coaduna com a necessidade de uma maior valorização desse grupo de padrões pelos clínicos, pois os mesmos têm atualmente importância comprovada no auxílio diagnóstico de enfermidades como lúpus eritematoso sistêmico, cirrose biliar primária, síndrome de Sjögren, polimiosite e esclerose sistêmica.

A partir desses resultados, ficam, portanto, desconsideradas as recomendações do I Consenso, que denominavam os

padrões citoplasmáticos como FAN negativos, por não haver reatividade nuclear em tais situações. Em contrapartida, o II Consenso recomenda que padrões citoplasmáticos sejam liberados como FAN positivos, buscando a maior valorização desses achados pelos clínicos, contanto que os laboratórios adotem uma das novas denominações do teste (Figura 2).

A alteração descrita acima, juntamente com a sugestão das denominações para o teste de triagem de auto-anticorpos em células HEp-2, preparam-nos para que em um futuro breve tenhamos condições de melhor definir o nome deste exame. A seguir, o corpo descritivo do laudo em três exemplos (Figuras 3, 4 e 5), seguindo as recomendações do II Consenso Brasileiro de FAN HEp-2.

- Paciente: J.S.
- Ensaio: Pesquisa de Auto-Anticorpos – Núcleo (FAN), nucléolo, citoplasma e aparelho mitótico.
- Núcleo: não reagente.
- Nucléolo: não reagente.
- Citoplasma: reagente.
- Aparelho mitótico: não reagente.
- Placa metafásica cromossômica: não reagente.
- PADRÃO: citoplasmático pontilhado polar.
- Título: 1280.

Figura 3 – Exemplo A.

- Paciente: M.R.
- Ensaio: FAN – Pesquisa de anticorpos contra componentes do núcleo, nucléolo, citoplasma e aparelho mitótico.
- Núcleo: não reagente ou negativo.
- Nucléolo: reagente ou positivo.
- Citoplasma: não reagente ou negativo.
- Aparelho mitótico: não reagente ou negativo.
- Placa metafásica cromossômica: não reagente.
- PADRÃO: nucleolar homogêneo.
- Título: 320.

Figura 4 – Exemplo B.

- Paciente: M.S.
- Ensaio: FAN – Pesquisa de auto-anticorpos.
- Núcleo: reagente.
- Nucléolo: não visível.
- Citoplasma: não reagente.
- Aparelho mitótico: não reagente.
- Placa metafásica cromossômica: reagente.
- PADRÃO: nuclear homogêneo.
- Título: 640

Figura 5 – Exemplo C.

No caso da descrição do padrão homogêneo, o relato da presença de fluorescência junto ao nucléolo remeterá para a classificação de padrão misto (veja adiante). A ausência de reatividade (não fluorescência) o classificará como padrão pontilhado fino denso. Neste caso o nucléolo, em especial, será relatado como não observável (Figura 5).

O NOVO ALGORITMO DE CLASSIFICAÇÃO: PADRÕES MISTOS

O II Consenso deparou-se com a dificuldade de classificar alguns padrões que apresentam de forma simultânea mais de uma característica de classificação (fluorescência de núcleo, nucléolo, citoplasma ou aparelho mitótico simultaneamente). Esses casos foram denominados padrões mistos por apresentarem células com decoração de diferentes regiões. Por exemplo, núcleo e citoplasma, núcleo e nucléolo, entre outras possíveis combinações dos quatro grupos básicos: nucleares, nucleolares, citoplasmáticos e aparelho mitótico. O padrão formado pelo anticorpo antitopoisomerase I (Scl-70) é clássico de uma combinação de achados. Observa-se o núcleo corado de forma pontilhada, nucléolos corados de forma também pontilhada e placa metafásica cromossômica reagente. Essas informações permitem concluir que se trata do padrão misto nuclear e nucleolar pontilhados, que caracteriza possivelmente a presença de anticorpos antitopoisomerase I (Figura 6).

- Paciente: J.S.
- Ensaio: pesquisa de auto-anticorpos contra antígenos intracelulares (FAN).
- Núcleo: reagente.
- Nucléolo: reagente.
- Citoplasma: não reagente.
- Aparelho mitótico: não reagente.
- Placa metafásica cromossômica: reagente.
- PADRÃO: misto do tipo nuclear e nucleolar pontilhado com placa metafásica positiva.

Figura 6 – Exemplo D.

Outra possibilidade é o padrão ocasionado por um soro com a presença simultânea de anticorpos antigolginas e anti-SS-A/Ro. Nessa circunstância visualiza-se uma coloração polar na região citoplasmática, que caracteriza o primeiro anticorpo, bem como uma fluorescência nuclear pontilhada fina com placa metafásica negativa, caracterizando o segundo auto-anticorpo. Nesse caso, recomenda-se desmembrar os padrões liberando os resultados possíveis com base na experiência do observador. Sabe-se então que o

soro apresenta dois padrões: nuclear pontilhado fino e citoplasmático pontilhado polar (Figura 7).

- Paciente: M.S.
- Ensaio: Pesquisa de auto-anticorpos: Núcleo (FAN), nucléolo, citoplasma e aparelho mitótico.
- Núcleo: reagente.
- Nucléolo: não reagente.
- Citoplasma: reagente.
- Aparelho mitótico: não reagente.
- Placa metafásica cromossômica: não reagente.
- PADRÃO: nuclear pontilhado fino e citoplasmático pontilhado polar.

Figura 7 – Exemplo E

Desta forma, o padrão misto ocorre a partir da combinação de dois auto-anticorpos distintos direcionados a componentes individuais da célula como núcleo e citoplasma (antigolgi e anti-SS-A/Ro), ou ainda pode sugerir a presença de um único auto-anticorpo específico, no caso da reatividade de núcleo e nucléolo, observada pela presença do Anti-Scl-70.

Pode-se observar, na Tabela 1, a classificação dos padrões mistos acordada no II Consenso Brasileiro de FAN HEP-2.

RELEVÂNCIAS CLÍNICAS

Com a finalidade de facilitar a interpretação do FAN pelos clínicos, durante o II Consenso foram discutidas as relevâncias

clínicas mais frequentes de cada padrão. Optou-se por não mencionar as doenças que ocorrem de forma mais rara, o que poderia na prática médica induzir o clínico a uma falsa interpretação dos resultados gerando a procura por entidades de muito baixa prevalência. A lista de descrições clínicas (Tabela 2) inclui a definição dos possíveis auto-anticorpos presentes em cada padrão com a respectiva relevância destes para a clínica reumatológica. Essas informações suprem a carência de maiores dados sobre a interpretação da pesquisa de auto-anticorpos, refletindo diretamente em um melhor auxílio diagnóstico para o clínico, principalmente o reumatologista.

É fundamental observar que as associações clínicas apresentadas na Tabela 1 referem-se aos auto-anticorpos específicos listados na segunda coluna. Estas são associações bem estabelecidas na literatura e podem ser bem apreciadas em publicações específicas sobre o tema. A relevância clínica do padrão de fluorescência foi estabelecida de forma indireta, mediante as associações antigênicas de cada padrão de fluorescência. Cabe, entretanto, frisar que essas associações antigênicas são relativas, em sua maioria. Por exemplo, o padrão nuclear pontilhado fino com placa cromossômica metafásica não corada pode corresponder a anticorpos anti-SS-A/Ro, anti-SS-B/La ou a auto-anticorpos de especificidade antigênica ainda desconhecida. Portanto, a relevância clínica do padrão de fluorescência fornece uma orientação provisória, que deve ser corroborada por testes imunológicos específicos para identificação dos auto-anticorpos sugeridos no teste de FAN.

TABELA 1
PADRÕES MISTOS DEFINIDOS PELO II CONSENSO BRASILEIRO DE FAN HEP-2

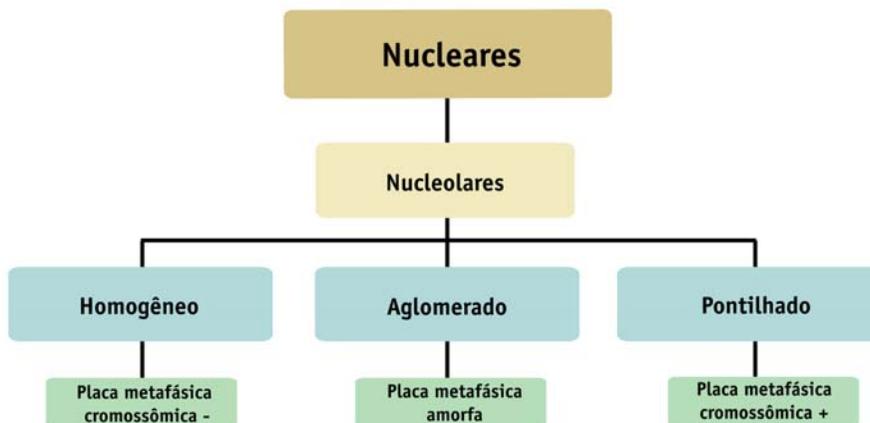
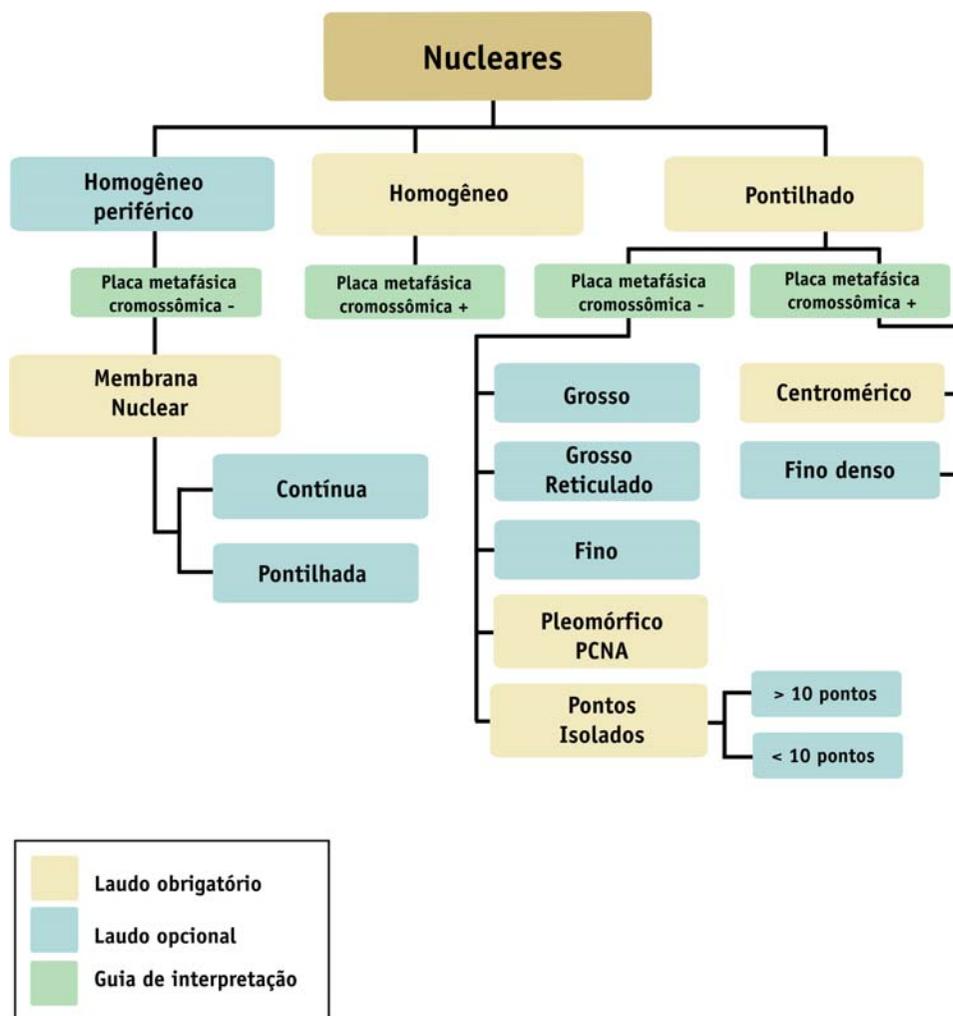
Padrão	Auto-anticorpo	Relevância clínica
Misto do tipo nucleolar homogêneo e nuclear pontilhado grosso com placa metafásica decorada em anel (cromossomos negativos)	Anticorpo anti-Ku	Marcador de superposição polimiosite e esclerose sistêmica. Podem ocorrer no lúpus eritematoso sistêmico e esclerodermia ⁽¹¹⁾
Misto do tipo nuclear e nucleolar pontilhado com placa metafásica positiva	Anticorpo antitopoisomerase I (Scl-70)	Associado a esclerose sistêmica forma difusa. Mais raramente pode ocorrer na síndrome CREST e superposição polimiosite/esclerodermia ⁽¹²⁾
Misto do tipo citoplasmático pontilhado fino denso a homogêneo e nucleolar homogêneo	Anticorpo anti-rRNP (antiproteína P-ribossomal)	Marcador de lúpus eritematoso sistêmico e mais frequentemente relacionado com a psicose lúpica ^(13,14)
Misto do tipo nuclear pontilhado fino com fluorescência do aparelho mitótico	Anticorpo anti-NuMa1	Associado à síndrome de Sjögren, podendo ocorrer também em outras condições auto-imunes ou inflamatórias crônicas ⁽¹⁵⁾

TABELA 2
PADRÕES DE FAN HEp-2 (NUCLEARES, NUCLEOLARES, CITOPLASMÁTICOS E APARELHO MITÓTICO),
PRINCIPAIS AUTO-ANTICORPOS ASSOCIADOS E RELEVÂNCIAS CLÍNICAS MAIS FREQUENTES

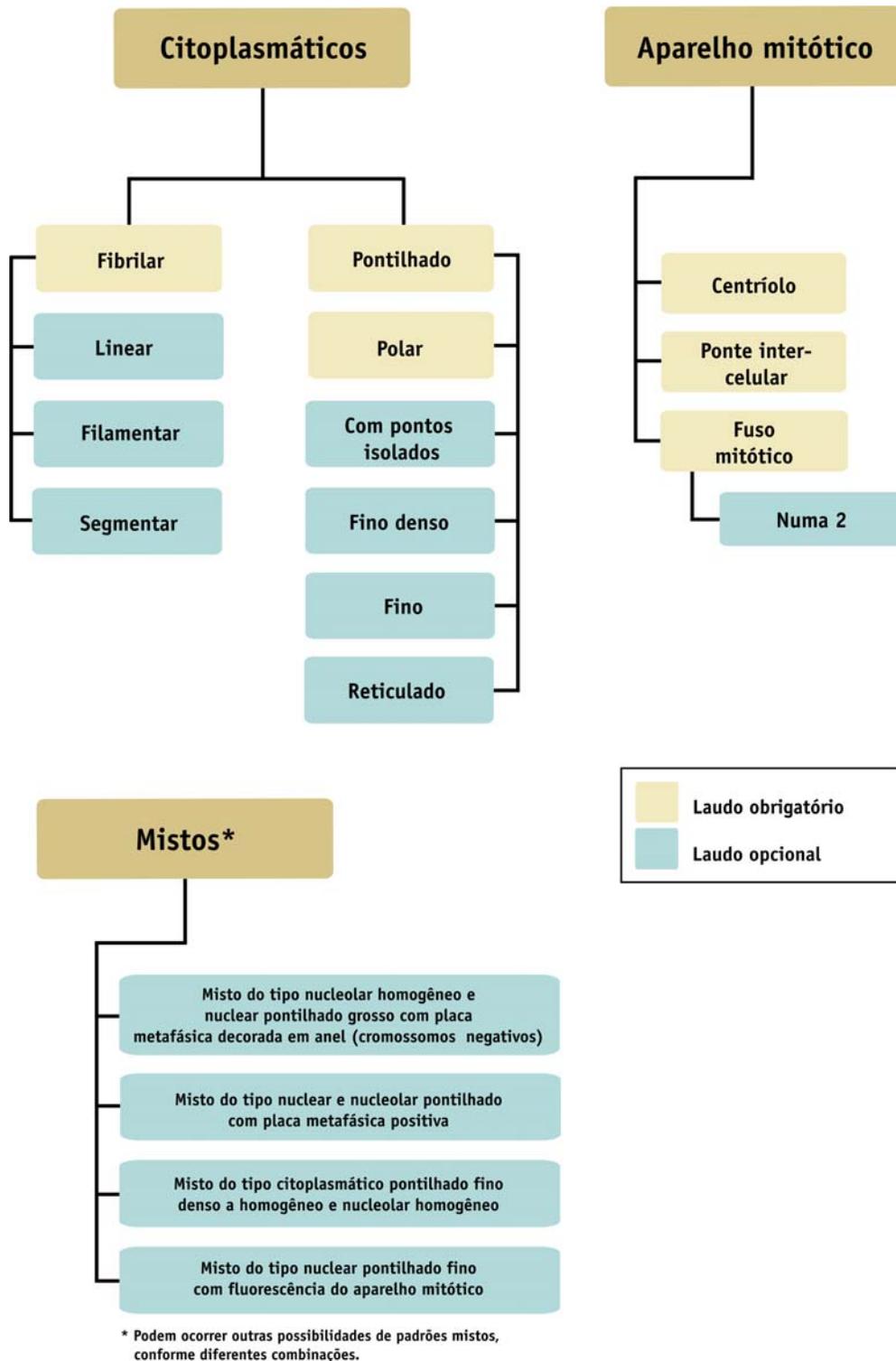
Padrões	Relevância clínica por auto-anticorpos
Nuclear pontilhado centromérico	Anticorpo anticentrômero (proteínas A, B e C). Esclerose sistêmica forma CREST (calcinose, fenômeno de Raynaud, disfunção motora do esôfago, esclerodactilia e telangiectasia). Cirrose biliar primária ^(16,17)
Nuclear homogêneo	Anticorpo anti-DNA nativo. Marcador de lúpus eritematoso sistêmico Anticorpo anti-histona. Marcador de lúpus eritematoso sistêmico induzido por drogas. lúpus eritematoso sistêmico idiopático ⁽¹⁸⁾ Anticorpo anticromatina (DNA/histona, nucleossomo) ⁽¹⁹⁾ . Artrite reumatóide. Artrite idiopática juvenil, importante associação com uveíte na forma oligoarticular. Síndrome de Felty. Cirrose biliar primária
Nuclear tipo membrana nuclear contínua	Anticorpo antilamina ⁽²⁰⁾ e contra componentes antigênicos do envelope nuclear – lamínas. Hepatites auto-ímmunes. Raramente associado a doenças reumáticas – algumas formas de LES e esclerodermia linear. Raramente associado à síndrome dos anticorpos antifosfolípidos
Nuclear pontilhado pleomórfico/PCNA	Anticorpo contra núcleo de células em proliferação ⁽²¹⁾ . Encontrado especificamente em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico
Nuclear pontilhado fino denso	Anticorpo antiproteína p 75 kDa (cofator de transcrição) ⁽²²⁾ . É um dos padrões mais frequentemente encontrados na rotina, cuja correlação clínica ainda não está bem estabelecida, podendo ser encontrado em indivíduos saudáveis. Anticorpo com especificidade para proteína de 75 kDa, encontrado em doenças reumáticas auto-ímmunes, mas com maior frequência em processos inflamatórios específicos e inespecíficos. Existem relatos na literatura do encontro deste padrão em pacientes com cistite intersticial, dermatite atópica, psoríase e asma
Nuclear pontilhado tipo pontos isolados com menos de dez pontos	Anticorpo anti-p80 coilina ⁽²³⁾ . É um padrão que não tem associação clínica definida
Nuclear pontilhado tipo pontos isolados com mais de dez pontos	Anticorpo anti-Sp100 (anti-p95). É descrito principalmente na cirrose biliar primária, mas pode ser observado em diversas outras condições clínicas ⁽²⁴⁾
Nuclear pontilhado grosso	Anticorpo anti-Sm. Marcador para LES ⁽²⁵⁾ Anticorpo anti-RNP ⁽²⁵⁾ . Critério obrigatório no diagnóstico da doença mista do tecido conjuntivo. Também presente no lúpus eritematoso sistêmico, e menos frequentemente esclerose sistêmica e artrite reumatóide
Nuclear pontilhado fino	Anticorpo anti SS-A/Ro ⁽²⁶⁾ . Síndrome de Sjögren primária, lúpus eritematoso sistêmico, lúpus neonatal (bloqueio átrio ventricular e outras manifestações do lúpus neonatal) e lúpus cutâneo subagudo Anticorpo anti SS-B/La ⁽²⁶⁾ . Síndrome de Sjögren primária, lúpus eritematoso sistêmico, lúpus neonatal (bloqueio átrio ventricular e outras manifestações do lúpus neonatal)
Nucleolar aglomerado	Anticorpo antifibrilarina (U3-nRNP) ⁽²⁷⁾ . Associado à esclerose sistêmica, especialmente com comprometimento visceral grave, entre elas a hipertensão pulmonar
Nucleolar pontilhado	Anticorpo anti-NOR-90 ⁽²⁷⁾ . Inicialmente descrito na esclerose sistêmica. Atualmente descrito em outras doenças do tecido conjuntivo, porém sem relevância clínica definida Anticorpo anti-RNA polimerase I ⁽²⁷⁾ . Esclerose sistêmica de forma difusa com tendência para comprometimento visceral mais frequente e grave

Padrões	Relevância clínica por auto-anticorpos
Nucleolar homogêneo	Anticorpo anti-PM/Scl. Ocorre na síndrome de superposição da polimiosite com esclerose sistêmica. Raramente encontrado em casos de polimiosite ou esclerose sistêmica sem superposição clínica. Outros auto-anticorpos mais raros podem apresentar esse padrão ⁽²⁸⁾
Citoplasmático fibrilar linear	Anticorpo antiactina ⁽²⁹⁾ . Encontrado em hepatopatias (hepatite auto-imune, cirrose) ⁽³⁰⁾ Anticorpo antimiosina ⁽³¹⁾ . Hepatite C, hepatocarcinoma, miastenia <i>gravis</i> . Quando em títulos baixos ou moderados podem não ter relevância clínica definida
Citoplasmático fibrilar segmentar	Anti-α-actinina, antivinculina e antitropomiosina ⁽³²⁾ . Anticorpos encontrados na miastenia <i>gravis</i> , doença de Crohn e colite ulcerativa. Quando em títulos baixos ou moderados podem não ter relevância clínica definida
Citoplasmático pontilhado polar	Anticorpo antigolginas (cisternas do aparelho de Golgi) . Raro no lúpus eritematoso sistêmico, síndrome de Sjögren primária e outras doenças auto-imunes sistêmicas. Relatado em ataxia cerebelar idiopática, degeneração cerebelar paraneoplásica e infecções virais pelo vírus Epstein Barr (EBV) e pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV). Quando em títulos baixos ou moderados podem não ter relevância clínica definida ^(33,34)
Citoplasmático pontilhado fino	Anticorpo anti-Histidil t RNA sintetase (Jo1) . Anticorpo marcador de polimiosite no adulto. Descrito raramente na dermatomiosite. Outros anticorpos anti-tRNA sintetases podem gerar o mesmo padrão ⁽²⁸⁾
Citoplasmático pontilhado com pontos isolados	Anticorpo Anti-EEA1 e antifosfatidilserina . Não há associações clínicas bem definidas Anticorpo anti-GWB ⁽³⁵⁾ . Associado à síndrome Sjögren primária, embora observado também em diversas outras condições clínicas
Citoplasmático pontilhado reticulado	Anticorpo antimitocôndria ^(11,36,37) . Marcador da cirrose biliar primária (M2), também visto na esclerose sistêmica. É relativamente comum o encontro deste padrão na ausência de anticorpos antimitocôndria
Citoplasmático pontilhado fino denso	Anti PL7/PL12 ⁽²⁸⁾ . Este padrão de fluorescência pode raramente estar associado a anticorpos encontrados na polimiosite Antiproteína P-ribossomal . Este padrão ocorre no lúpus eritematoso sistêmico se a associação é com anti-proteína P ribossomal ⁽¹³⁾
Citoplasmático fibrilar filamentar	Anticorpo antivimentina e antiqueratina ⁽³²⁾ . Anti-queratina é o anticorpo mais importante em doença hepática alcoólica. Descritos em várias doenças inflamatórias e infecciosas. Quando em títulos baixos ou moderados podem não ter relevância clínica definida
Aparelho mitótico tipo centríolo	Anticorpo anti-α-enolase . Em baixos títulos não tem associação clínica definida. Em altos títulos é sugestivo de esclerose sistêmica
Aparelho mitótico tipo ponte intercelular	Anticorpo anti-β-tubulina ⁽²⁹⁾ . Podem ser encontrados no lúpus eritematoso sistêmico e na doença mista do tecido conjuntivo. Outros anticorpos ainda não bem definidos podem gerar o mesmo padrão
Aparelho mitótico tipo NuMa ₁	Anticorpo anticentrossomal ou NuMa1 ⁽¹⁵⁾ . Mais freqüentemente associado à síndrome de Sjögren. Descrito também em diversas outras doenças auto-imunes
Aparelho mitótico tipo NuMa ₂	Anticorpo anti-HsEg5 ⁽³³⁾ . Associado a diversas condições auto-imunes com baixa especificidade
Padrão negativo	Ocorre FAN negativo em 1% de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (HEp-2). Nesta situação, os pacientes devem ser avaliados de acordo com a suspeita clínica, quanto à presença de anti-SS-A/Ro, anticardiolipina e anti-P ribossomal, que algumas vezes pode resultar em FAN negativo

ALGORITMOS DE CLASSIFICAÇÃO DO SEGUNDO CONSENSO BRASILEIRO DE FAN HEP-2



ALGORITMOS DE CLASSIFICAÇÃO DO SEGUNDO CONSENSO BRASILEIRO DE FAN HEP-2



AGRADECIMENTOS

Bio Rad • Bion/Virion/Medivax • BioSystems • Cedilab
 Medicina Laboratorial • Exame – Laboratórios de Patologia
 Clínica • Fundação de Assistência Estudo e Pesquisa de
 Uberlândia (FAEPU/HC/UFU) • GMK Diagnóstico/Hemagen
 Diagnósticos • Immunotech Sistemas Diagnósticos
 Imp. Exp. Ltda. • Instituto de Patologia Clínica Hermes
 Pardini • Laboratório Amaral Costa • Laboratório Atalaia
 • Laboratório de Imuno-Reumatologia e HLA (HC/UFU) •
 Laboratório Fleury • Laboratório Frischmann Aisengart •
 Laboratório Médico Santa Luzia • Laboratório Metanalysis

REFERÊNCIAS

- Tan EM: Autoantibodies and autoimmunity: a three-decade perspective. A tribute to Henry G. Kunkel. *Ann New York Acad Sciences* 815:1-14, 1997.
- Paprotnik S, Bozic B, Kveder T, Rozman B: Fluctuation of anti-Ro/SS-A antibody levels in patients with systemic lupus erythematosus and Sjögren's syndrome: A prospective study. *Clin Exp Rheumatol* 17:63-8, 1999.
- Slater CA, Davis RB, Shmerling RH: Antinuclear antibody testing: a study of clinical utility. *Arch Int Med* 156:1421-5, 1996.
- Charles PJ, Van Venrooij WJ, Maini RN: The consensus workshops for the detection of autoantibodies to intracellular antigens in rheumatic diseases: 1989-1992. *Clin Exp Rheumatol* 10:507-11, 1992.
- Von Mühlens CA, Nakamura R: Guidelines for Selecting and Using Laboratory Tests for Autoantibodies to Nuclear, Nucleolar and Other Related Cytoplasmic Antigens. In: Nakamura RM, Keren DF, Bylund DJ (ed.): *Clinical and Laboratory Evaluation of Human Autoimmune Diseases*. Chicago, ASCP Press, 1.^a ed, 183-198, 2002.
- Tan EM, Feltkamp TEW, Smolen JS, et al: Range of antinuclear antibodies in "healthy" individuals. *Arthritis Rheum* 40:1601-11, 1997.
- Nakamura RM, Tan EM: Update on autoantibodies to intracellular antigens in systemic rheumatic diseases. *Clin Lab Med* 12:1-23, 1992.
- Pfimer IA, Franciscantonio PL, Von Mühlens CA, et al: I Consenso Nacional para a Padronização dos Laudos de FAN em Células HEP-2. *Rev Bras Reumatol* 41:267-73, 2001.
- Humbel RL: Detection of antinuclear antibodies by immunofluorescence. In: Van Venrooij WJ, Maini RN (eds): *Manual of biological markers of disease*. Dordrecht, Kluwer Academic 1-16, 1993.
- Nakamura RM, Bylund DJ, Tan EM: Current status of available standards for quality improvement of assays for the detection of autoantibodies to nuclear and intracellular antigens. *J Clin Lab Anal* 8:360-8, 1994.
- Francoeur AM, Peebles CL, Gompfer PT, Tan EM: Identification of Ki (Ku 70-80) autoantigens and analysis of anti-Ki autoantibody reactivity. *J Immunol* 136:1648-53, 1986.
- Jarzabek-Chorzelska M, Balszczyk M, Jablonska S, Chorzelski T, Kumar V, Beutner EH: Scl-70 antibody, a specific marker of systemic sclerosis. *Br J Dermatol* 115:393-401, 1986.
- Bonfá E, Golombek SJ, Kaufman LD, et al: Association between lupus psychosis and anti-ribosomal P protein antibodies. *N Engl J Med* 317:265-71, 1987.
- Isshi K, Hirohata S: Differential roles of the anti-ribosomal P antibody and antineuronal antibody in the pathogenesis of central nervous system involvement in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 41:1819-27, 1998.
- Andrade LEC, Chan EKL, Peebles CL, Tan EM: Two major autoantigen-antibody systems of the mitotic spindle apparatus. *Arthritis Rheum* 39:1643-53, 1996.
- Fritzer MJ, Kinsella TD: The CREST syndrome: a distinct serologic entity with anticentromere antibodies. *Am J Med* 69:520-6, 1980.
- Göring HD, Panzner M, Lakota W, Zeiner A: Association of Scleroderma and Primary Biliary Cirrhosis – results of a systematic study on a dermatological clientele. *Hautartz* 49:361-66, 1998.
- Rubin RL: Autoimmune reactions induced by procainamide and hydralazine. In Kammüller M, Bloksma M, Siemen W (eds): *Autoimmunity and Toxicology: Immune Dysregulation Induced by Drugs and Chemicals*. Amsterdam, Elsevier, 119, 1988.
- Amoura Z, Koutouzov S, Chabre H, et al: Presence of antinucleosome autoantibodies in a restricted set of connective tissue diseases: antinucleosome antibodies of the IgG3 subclass are markers of renal pathogenicity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 43:76-84, 2000.
- Borg AA, Dawes PT, Matthey DL: Autoantibodies to nuclear lamins and to intermediate filament proteins. *J Rheumatol* 20:1988-90, 1993.
- Takasaki Y, Deng JS, Tan EM: A nuclear antigen associated with cell proliferation and blast transformation. *J Exp Med* 154:1899-909, 1981.
- Ochs RL, Muro Y, Si Y, Ge H, Chan EK, Tan EM: Autoantibodies to DFS 70 kd/transcription coactivator p75 in atopic dermatitis and other conditions. *J Allergy Clin Immunol* 105(6 Pt 1):1211-20, 2000.
- Andrade LEC, Chan EKL, Raska I, Peebles CL, Roos G, Tan EM: Human autoantibody to a novel protein of the nuclear coiled body: immunological characterization and cDNA cloning of p80-coilin. *J Exp Med* 173:1407-19, 1991.
- Lohse AW, Zum Büschenfelde KH, Franz B, Kanzler S, Gerken G, Dienes HP: Characterization of the overlap syndrome of Primary Biliary Cirrhosis (PBC) and Autoimmune Hepatitis: evidence for it being a hepatic form of PBC in genetically susceptible individuals. *Hepatology* 29:1078-84, 1999.

25. Notman DD, Kurata N, Tan EM: Profiles of antinuclear antibodies in systemic rheumatic diseases. *Ann Intern Med* 83(4):464-9, 1975.
26. Martinez-Lavin M, Vaughan JH, Tan EM: Autoantibodies and the spectrum of Sjögren's syndrome. *Ann Intern Med* 91(2):185-90, 1979.
27. Reimer G, Raska I, Tan EM, Scheer U: Human autoantibodies: probes for nucleolus structure and function. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 54:131-43, 1987.
28. Targoff IN: Autoantibodies in polymyositis. *Rheum Dis Clin North Am* 18:455-82, 1992.
29. Krapf A, Von Mühlen CA, Krapf F, Nakamura RMM, Tan EM: Human autoimmune diseases and autoantibodies. *Bol Com Íbero-Americano Reumatol* 9:55-58.
30. Leibovitch L, George J, Levi Y, Bakimer R, Shoenfeld Y: Anti-actin antibodies in sera from patients with autoimmune liver disease and patients with carcinomas by ELISA. *Immunol Lett* 48:129-32, 1995.
31. Agarwal N, Handa R, Acharya SK, Wali JP, Dinda AK, Aggarwal P: A study of autoimmune markers in hepatitis C infection. *Indian J Med Res* 113:170-74, 2001.
32. Krapf AR, Von Mühlen CA, Krapf FE, Nakamura RM, Tan EM: Atlas of immunofluorescent autoantibodies. Munich, Urban & Schwarzenberg, 1996.
33. Massabki PS, Accetturi C, Nishie IA, Silva NP, Sato EI, Andrade LE: Clinical implications of autoantibodies in HIV infection. *AIDS (archive)* 11:1845-50, 1997.
34. Yang Y, Fujita J, Tokuda M, Bandoh S, Ishida T: Clinical features of several connective tissue diseases with anti-Golgi antibody. *Ann Rheum Dis* 60:986-987, 2001.
35. Eystathioy T, Chan EK, Tenenbaum SA, Keene JD, Griffith K, Fritzler MJ: A phosphorylated cytoplasmic autoantigen, GW182, associates with a unique population of human mRNAs within novel cytoplasmic speckles. *Mol Biol Cell* 13:1338-51, 2002.
36. Alderuccio F, Toh BH, Barnett AJ, Pedersen JS: Identification and characterization of mitochondria autoantigens in progressive systemic sclerosis: identity with the 72,000 Dalton autoantigen in primary biliary cirrhosis. *J Immunol* 137:1855-59, 1986.
37. Chou MJ, Lai MY, Lee SL: Reactivity of anti-mitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis and systemic sclerosis. *J Form Med Ass* 91:1075-80, 1992.