

ATUALIZAÇÕES SOBRE O FAN

O Teste de Anticorpos Antinúcleo, mais conhecido como Fator Antinúcleo (FAN ou FAN-HEp-2) e, mais recentemente denominado de “Pesquisa de Anticorpos Contra Antígenos Celulares” (PAAC) trata-se de um excelente exame de rastreamento de autoanticorpos em soro de pacientes com suspeita de doenças autoimunes, principalmente Lupus Eritematoso Sistêmico (LES).^(1,5,7)

Em 1948, o fenômeno das células LE foi descrito por Hargraves, originando um teste laboratorial caracterizado por alta especificidade para o diagnóstico de LES⁽²⁾.

Em 1950, Coons e Kaplan⁽³⁾, utilizaram anticorpos marcados com fluoresceína para identificar antígenos teciduais, demonstrando assim a aplicabilidade do teste de imunofluorescência indireta (IFI) para a pesquisa de anticorpos antinúcleo (ANA), um método com características técnicas mais simples, menor subjetividade e maior reprodutibilidade que o teste das células LE. Posteriormente, o FAN ANA-IFI passou a substituir, definitivamente, o teste das células LE segundo os critérios do Colégio Americano de Reumatologia (CAR) para classificação do LES⁽⁴⁾.

No início, o FAN utilizava cortes de tecido de roedores (rim ou fígado) como substrato antigênico e isso tornava o teste de difícil padronização. Algumas décadas depois, células tumorais derivadas de carcinoma de laringe humana (células HEp-2 – American Type Culture Collection CCL-23) passaram a ser empregadas como substrato antigênico na técnica de IFI, o que causou um aumento substancial na sensibilidade do método de triagem, comparado com substratos de cortes de tecido animal, uma vez que autoanticorpos 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 animal. 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^(4,5).

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 desse ciclo, fornece direcionamento sobre os possíveis autoantígenos que estão sendo reconhecidos na reação. Essas associações vem sendo definidas nas últimas décadas e foram sistematizadas no III Consenso Brasileiro para pesquisa de autoanticorpos em células HEp-2 (FAN-HEp-2)^(4,5).

O FAN, de grande valor na triagem de autoanticorpos, foi tecnicamente modificado ao longo das últimas décadas de forma a conferir sensibilidade progressivamente maior. Como consequência do grande aumento de sensibilidade experimentado, a pesquisa de autoanticorpos contra antígenos celulares passou a apresentar menor especificidade⁽⁵⁾.

Nesse sentido, um fator importante a ser considerado é o título do FAN-HEp-2. Em geral, os pacientes autoimunes tendem a apresentar títulos moderados (1/160 e 1/320) e elevados ($\geq 1/640$), enquanto os indivíduos sadios com FAN-HEp-2 positivo tendem a apresentar baixos títulos (1/80). Entretanto, em ambas as situações pode haver exceções. Outro ponto de grande importância é o padrão de fluorescência, que fornece uma indicação da identidade do(s) autoanticorpo(s) em questão e deve ser analisado com bastante cautela, levando-se em consideração a experiência do observador^(5,6).

Como exemplo, é possível citar os padrões de fluorescência nuclear pontilhado grosso e nuclear homogêneo, quase sempre associados a um contexto de autoimunidade sistêmica. Por outro lado, o padrão nuclear pontilhado fino denso é um dos mais frequentemente observados em pessoas não autoimunes com exame positivo de FAN-HEp-2 ⁽⁷⁾.

Autoanticorpos contra alguns antígenos têm associação bastante específica com determinadas doenças autoimunes ou ao estado de autoimunidade em si, enquanto outros ocorrem, indiscriminadamente, em indivíduos autoimunes e não autoimunes. Dessa forma, determinados padrões de fluorescência são mais específicos de doença autoimune enquanto outros ocorrem com frequência em indivíduos saudáveis ou em pacientes com outras enfermidades não autoimunes ⁽⁵⁾.

Perante um resultado positivo de FAN-HEp-2 é imprescindível que se caracterize essa reatividade, buscando a presença de anticorpos peculiares de patologias autoimunes através de técnicas específicas (diagnóstico sorológico) ⁽⁵⁾.

Tabela 1 – Exemplos de padrões de FAN-HEp-2, autoantígenos associados e possíveis correlações clínicas.

Padrão de FAN-HEp-2	Autoantígeno(s) associado(s)	Correlação clínica
Nuclear homogêneo	- DNA de dupla fita “nativo” (dsDNA) - DNA de hélice simples (ssDNA) - Histona (H1, H2A, H2B, H3, e H4)	LES Artrite juvenil idiopática LES, Esclerose sistêmica; Cirrose biliar primária; Hepatite auto-imune.
Nuclear pontilhado fino	- La/SS-B - Ro/SS-A	Síndrome de Sjögren, LES Síndrome de Sjögren, LES , AR, Esclerose Sistêmica, Polimiosite
Nuclear pontilhado grosso	- Sm (Smith) - 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.
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.

Adaptado de Dellavance A, Leser PG, Andrade LEC⁽⁴⁾. 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.

Como dito anteriormente, o FAN-HEp-2 é um excelente exame de rastreamento de autoanticorpos, porém resultados falsos positivos são relativamente comuns. Alguns elementos podem auxiliar na valorização correta de um resultado positivo de FAN, como o título de reatividade, o padrão de fluorescência, a existência de elementos clínicos ou laboratoriais sugestivos de autoimunidade e a presença concomitante de autoanticorpos específicos⁽⁴⁾.

REFERÊNCIAS

1. Stevens CD. Autoimmunity. In: Stevens CD. Clinical Immunology and serology, A laboratory perspective. Philadelphia: Ed F.A. Davis Company, 1996. 180-197p.
2. 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.
3. 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.
4. Dellavance A, Leser PG, Andrade LEC. Importância do padrão de fluorescência na interpretação do teste do fan - o caso do padrão pontilhado fino denso. Rev Assoc Med Bras 2007; 53(5): 439-45.
5. Dellavance A, *et al.* 3º Consenso Brasileiro para pesquisa de autoanticorpos em células HEp-2 (FAN). Recomendações para padronização do ensaio de pesquisa de autoanticorpos em células HEp-2, controle de qualidade e associações clínicas. Rev Bras Reumatol 2009;49(2):89-109.
6. 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(9):1601-11.
7. Dellavance A, Leser PG, Andrade LEC. Análise Crítica do Teste de Anticorpos Antinúcleo (Fan) na Prática Clínica. Rev Bras Reumatol, v. 47, n.4, p. 265-275, 2007.