

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

MÔNICA DE JESUS SILVA

**REPRODUTIBILIDADE DE PADRÕES MORFOLÓGICOS NO TESTE DE
AUTOANTICORPOS CONTRA ANTÍGENOS CELULARES (FAN-HEp-2) EM
DIFERENTES SUBSTRATOS**

São Paulo

2020

MÔNICA DE JESUS SILVA

**REPRODUTIBILIDADE DE PADRÕES MORFOLÓGICOS NO TESTE DE
AUTOANTICORPOS CONTRA ANTÍGENOS CELULARES (FAN-HEp-2) EM
DIFERENTES SUBSTRATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde Aplicadas à Reumatologia da Escola Paulista de Medicina.

Orientador: Prof. Dr. Luis Eduardo Coelho Andrade
Coorientadora: Dra Alessandra Dellavance

São Paulo

2020

Silva, Mônica de Jesus³

Reprodutibilidade de padrões morfológicos no teste de autoanticorpos contra antígenos celulares (FAN-HEp-2) em diferentes substratos / Mônica de Jesus Silva.– [S.n.], 2020.

131 f. : il.

Dissertação de Mestrado em Ciências da Saúde Aplicadas à Reumatologia – Universidade Federal de São Paulo (Escola Paulista de Medicina), São Paulo, 2020.

Orientador: Prof. Dr. Luis Eduardo Coelho Andrade

Coorientador: Dra Alessandra Dellavance

1. autoanticorpos, anticorpos antinúcleo; imunofluorescência indireta; células HEp-2; doenças autoimunes.

Silva, MJ. **Reprodutibilidade de padrões morfológicos no teste de autoanticorpos contra antígenos celulares (FAN-HEp-2) em diferentes substratos.** 2020. 131 f. Dissertação (Mestrado) – Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2020.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. Adagmar Andriolo

Professor Associado, Livre Docente do Departamento de Medicina

Julgamento _____ Assinatura _____

Prof. Dr. Cristóvão Pitangueiras Mangueira

Doutor em Ciências (Patologia), Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo,

Julgamento _____ Assinatura _____

Prof. Dr. Eduardo Ferreira Borba Neto

Professor Associado da Disciplina de Reumatologia da FMUSP

Julgamento _____ Assinatura _____

Prof. Dr. Edgard Torres dos Reis Neto (Suplente)

Doutor na Disciplina de Reumatologia da Universidade Federal de São Paulo.

Julgamento _____ Assinatura _____

Á meus pais, Guilhermino e Otília, meus irmãos Maurício e Maura e meu sobrinho Enzo, que para muito além da genética contida na compreensão dos genes, somos laços eternos. Até depois do fim! A luz que reverbera minh'alma é alimentada pelo amor que vocês emanam. Diante das derrotas, filtram minhas tristezas, purificam meus pensamentos, e restabelecem minha fé! A conclusão deste longo ciclo, só foi possível, porque tenho vocês ao meu lado oxigenando meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, e a toda energia de luz que me inspira, e principalmente por me dar forças para lutar em meio aos empecilhos ao longo desta caminhada.

À minha família, por embarcar no meu sonho de prosseguir estudando, mesmo além de nossas possibilidades. Sou muito grata por vocês acalantarem o meu pranto a cada novo projeto de pesquisa frustrado.

Em especial, gratidão eterna aos meus pais Guilhermino e Oflia. Não existem palavras para descrever a minha admiração por estes, que são os verdadeiros doutores do saber. Formados pela Universidade da vida, foram meus primeiros professores. Os senhores me ensinaram o que carrego de mais precioso, os meus valores. Obrigada paizinho, por todos estes anos de trabalho dedicados a nós. Obrigada minha mamãe, por ser meu tudo, por me manter em pé, e mover nossas vidas pela fé inabalável. A vocês o meu amor incondicional.

Aos meus queridos irmãos Maurício e Maura, que junto aos meus pais, formaram o meu caráter. Vocês são o meu chão. Obrigada por acreditar em mim, quando nem eu mesma acreditava mais. Nosso amor vence tudo! Vocês são os meus heróis, o espelho que toda irmã mais nova deve seguir. Obrigada minha irmã por ser o que você é, e me ajudar em tudo. Obrigada meu irmão, por tudo que faz por mim, e principalmente, pelos finais de semana ao meu lado, trabalhando na tabulação dos dados estatísticos. Sua participação foi essencial.

Ao meu pequeno príncipe e sobrinho Enzo. Você faz brilhar a esperança no coração da tia Dinda, toda vez que sorri para mim. Amo-te sem medida! Agradeço também, aos meus cunhados Edimar e Elaine, por entrarem em nossas vidas para somar e me incentivar sempre.

A todos os tios, tias, primos e primas (em especial minhas primas irmãs Sandra Brito e Elisete Brito) que torcem pelo meu sucesso. Por mais doloroso que possa ter sido o inverno, ou alegre como as cores da primavera, vocês estão comigo, independente da estação do ano.

Com imenso peso de importância, agradeço ao professor e meu orientador, Dr. Luís Eduardo Coelho Andrade, um exemplo de princípios éticos em ciência. Seu profissionalismo é admirável. Diante de todas as dificuldades, o senhor me fez crescer. Seus conselhos e broncas me fizeram chorar e refletir, mas, mais que tudo, me fizeram evoluir como pessoa e profissional. Sobre a pessoa Luís Eduardo Coelho Andrade, o LECA, só tenho a agradecer pela sua simplicidade, e pelo seu caráter impar ao apostar em mim, e me julgar exclusivamente pela minha personalidade e competência.

Desejo igualmente agradecer, a Dra. Alessandra Dellavance, minha co-orientadora, amiga e conselheira. Alê, em cada pedacinho deste trabalho, tem seu toque. Certamente, os

conselhos mais sábios durante esta minha jornada de pós-graduação, foram os seus. Você é realmente muito especial. Minha eterna gratidão pelo carinho, paciência e disponibilidade ao me ensinar engatinhar, e por tantas vezes me dar voz, quando a minha não emitia som.

A inesquecível Dra. Neusa Pereira, um exemplo de profissionalismo e amor a profissão. Sua versatilidade combinada a sua personalidade forte e senso de justiça, fazem da senhora uma pessoa sem igual.

A todos os professores que antecederam esta minha jornada, em especial, a minha professora de graduação Viviana Arruk Galimbert por me despertar o amor pela Imunologia, e a Dra Kioko Takei, pelo ato de amor ao ensinar com bondade.

Ao Dr. Charlles Helden de Moura Castro, a Daniela Horvath, Pâmela Ebbing e a Marina Eloi por confiar no meu trabalho nos momentos em que mais precisei. Tenho certeza, vocês também mudaram o curso da minha história profissional.

A pesquisadora associada e também amiga Danielle Baldo, por me auxiliar na organização inicial dos dados e pelo incentivo pessoal. Sua participação foi fundamental ao longo da caminhada.

A pesquisadora associada Marcelle Grecco, pela sua participação em várias etapas experimentais, em especial, por ser minha grande amiga, e por me estender a mão nos momentos mais difíceis da minha vida. Obrigada por chorar por mim (nunca vou esquecer) e por tantos outros momentos especiais e felizes.

Aos pesquisadores associados e também colegas de pós-graduação Renan Agustinelli, Mônica Prado, Sandro Perazzio e Gerson Keppeke por me cederem amostras, e pela agradável convivência.

A minha amiga Viviane Cardoso, e minha eterna companheira de trabalho. Você foi fundamental nesta reta final. Obrigada principalmente por se fazer presente nos meus dias de maior angústia. Nossos cafés da manhã e nossas gargalhadas ficarão para sempre.

Gratidão a minha amiga Lorena Ponzoni, pelo seu apoio e companheirismo de todos estes anos. Ter você por perto e a sua experiência me fez amadurecer muito.

Minha gratidão aos colegas de pós-graduação Átila Granado, Nathália Regine, Vanessa Ferreira e tantos outros que já passaram por aqui, e abrilhantaram esta caminhada.

Manifesto gratidão, aos funcionários do Laboratório de Imunorreumatologia da UNIFESP (Rogério, Silene, Sílvia e Teresa) e da Secretaria (Eni, Patrícia e Joaquina), sempre presentes, nos momentos de fracasso e vitória, ajudando e apoiando.

Agradeço especialmente, à pesquisadora associada Sílvia Helena Rodrigues (minha mãe, minha amiga e irmã) pela contribuição em nosso trabalho e pelos ensinamentos e ajuda prestada, sempre com a paciência e generosidade.

Também agradeço a Silene Keusseyan e a Teresa (a Matê Costa) por sempre estarem dispostas a me ensinar, e por todas as vezes que se doaram sem pedir nada em troca.

Meus respeitosos agradecimentos ao Laboratório Fleury que me acolheu, e a todos os seus colaboradores que me auxiliaram em várias etapas experimentais e fundamentais para o desenvolvimento da tese.

A todos os amigos que a vida me deu, e para todo sempre, agradeço as minhas amigas /irmãs Ilana Honório, Fernanda Passarella, Dayse Gomes por todos estes anos de amizade e compreensão. Minha história é mais feliz, porque tenho vocês ao meu lado.

RESUMO

Silva, MJ. **Reprodutibilidade de padrões morfológicos no teste de autoanticorpos contra antígenos celulares (FAN-HEp-2) em diferentes substratos.** 2020. 131 f. Dissertação (Mestrado) – Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2020.

Introdução: O teste de imunofluorescência indireta em células HEp-2 (IFI-HEp-2) é considerado padrão ouro para pesquisa de autoanticorpos anticélula (AC). Contudo, condições de cultivo e fixação celular interferem diretamente na preservação e distribuição antigênica, podendo impactar o reconhecimento dos padrões de imunofluorescência ^(1,2). **Objetivo:** Avaliar o fenômeno da não reprodutibilidade de resultados no teste de IFI-HEp-2 em diferentes substratos (lâminas) comerciais, comparando pacientes com doenças autoimunes (DAI), doenças não-autoimunes (DNAI) e indivíduos hígidos. **Materiais e Métodos:** Foram testadas 868 amostras de soro de 275 pacientes DAI, 293 de pacientes com DNAI e 300 amostras de doadores de sangue (DS) diluídas a 1:80 e processadas em lâminas de IFI-HEp-2 de quatro fornecedores distintos, seguida das leituras realizadas por três observadores independentes, experientes que desconheciam as características clínicas das amostras. Analisamos separadamente a reatividade em cada compartimento celular e a reatividade global, definida como reatividade contra qualquer compartimento celular. O grau de concordância obtido entre as lâminas recebeu pesos proporcionais ao número de lâminas concordantes, estabelecendo-se um escore ponderado (variando de 1 a 100) para grupos específicos de amostras. As variáveis qualitativas foram analisadas pelo teste do Chi-quadrado e as análises de concordâncias pelo teste Kappa. Todos os dados foram analisados no software SPSS 20.0 em nível de significância de $p < 0,05$. **Resultados:** 402 amostras foram negativas nas quatro lâminas e excluídas do estudo. O escore ponderado de concordância de reatividade global nas 466 amostras restantes (238 DAI, 119 DNAI e 109 DN) foi considerado regular (74,5). O compartimento nuclear apresentou a maior pontuação de concordância (83,6) seguida do compartimento placa metafásica (78,9), compartimento citoplasmático (77,4), e nucléolo (72,4). Entre os grupos clínicos, o grupo DAI (78,0) apresentou escore de concordância global superior aos grupos DNAI (70,6) e DS (71,3). Amostras com menor intensidade de imunofluorescência (+/4) apresentaram maiores taxas de discordância que amostras com alta intensidade (++++/4). Por exemplo, no grupo DAI a taxa de discordância no compartimento nuclear foi de 12,5% para amostras ++++/4 e de 95,6%

para amostras +/4. O mesmo fenômeno foi observado nos grupos DNAI e DS. Os padrões morfológicos nucleares de maior robustez foram o Centromérico (escore 78,4), Múltiplos Pontos Isolados (73,6) Pontilhado Grosso, (71,3) e Homogêneo (67,9). Para os padrões citoplasmáticos, o Pontilhado Reticulado (68,6) foi o mais robusto. **Conclusão:** O fenômeno da não reprodutibilidade de resultados em distintas lâminas HEp-2 ocorre com alta frequência e predominantemente em amostras de baixa intensidade.

Palavras-chave: autoanticorpos, anticorpos antinúcleo; imunofluorescência indireta; células HEp-2; doenças autoimunes.

ABSTRACT

Silva, MJ. **Reprodutibilidade de padrões morfológicos no teste de autoanticorpos contra antígenos celulares (FAN-HEp-2) em diferentes substratos.** 2020. 131 f. Dissertação (Mestrado) – Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2020.

Introduction: The indirect immunofluorescence assay on HEp-2 cells (HEp-2 IFA) is the gold standard method for anti-cellular (AC) antibody screening. Cell culture and fixation methods influence in the distribution and preservation of autoantigens, therefore affect in antigen preservation and distribution, as well as the AC patterns ^(1,2). **Objective:** We aimed to evaluate the non-reproducibility phenomenon of HEp-2 IFA results in different HEp-2 slide brands from patients with Systemic Autoimmune Disease (SAD), patients with Non-Autoimmune (NAD), and samples from healthy individuals. **Methods:** Were evaluated 868 serum samples from 275 patients with SAD, 293 patients with NAD, and 300 samples from healthy blood donors (HBD). Samples were processed at 1:80 dilution according to standard procedure on four HEp-2 slide brands. The tests were interpreted by three experienced independent blinded observers. The agreement among slides was determined using proportional weights according to the number of concordant slides in each sample, yielding a weighted score (ranging from 1 to 100) in specific groups of samples. The qualitative variables were analyzed by the Chi-square test and concordance was analyzed using the Kappa test. All data were analyzed using SPSS20.0 software at a significance level of $p < 0.05$. **Results:** 402 samples were non-reactive in all slide brands and, therefore, were considered devoid of autoantibodies and eliminated from further analysis. The global reactivity agreement score obtained for the remaining 466 samples (238 SAD, 119 NAD, and 109 HBD) was considered regular (74, 5). The nuclear compartment showed the highest agreement score (83,6), followed by the metaphase plate (78,9), cytoplasm (77,4) and nucleolus (72,4). Among the clinical groups, the agreement score was higher in SAD (78,0) than in NAD (70,6) and HBD (71,3). Samples with low reactivity (+/4) had higher discordance rates than high intensity samples (++++/4). In the SAD group the discordance for nuclear reactivity was 12.5% for ++++/4 samples, as opposed to 95.6% for +/4 samples, and the same was observed with NAD and HBD samples. The most robust nuclear patterns (higher concordance rate) were, Centromeric (score 78,4), Multiple Nuclear Dots (score 73,6), Coarse Speckled (score 71,3), and Homogeneous (score 67,9). Among the cytoplasmic patterns, the Reticular Cytoplasmic was more robust (68, 6). **Conclusion:** The phenomenon of

non-reproducibility in the HEp-2 IFA among different slide brands occurs with highest frequency with samples with low intensity.

Keywords: autoantibody, antinuclear antibodies; immunofluorescence; HEp-2 cells; autoimmune diseases.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição de todas as amostras de acordo com a reatividade global em cada marca de lâmina HEp-2.....	47
Tabela 2 - Distribuição das amostras reagentes de cada grupo clínico de acordo com a reatividade global em cada lâmina HEp-2.....	48
Tabela 3 - Análise de concordância de reatividade global em pares de lâminas HEp-2 considerando-se todas as amostras reagentes	50
Tabela 4 - Análise de concordância de reatividade global em pares de lâminas HEp-2 considerando-se as amostras reagentes do grupo de doenças autoimunes	50
Tabela 5 - Análise de concordância de reatividade global em pares de lâminas HEp-2 considerando-se as amostras reagentes do grupo de doenças não autoimunes	51
Tabela 6 - Análise de concordância de reatividade global em pares de lâminas HEp-2 considerando-se as amostras reagentes do grupo de doadores de sangue	51
Tabela 7 - Distribuição das amostras reagentes de acordo com a concordância de reatividade em cada par de marcas de lâminas HEp-2 em cada compartimento celular.....	52
Tabela 8 - Índice Kappa de concordância de reatividade em cada par de marcas de lâminas HEp-2 em cada compartimento celular.....	53
Tabela 9 - Distribuição das amostras reagentes em cada compartimento celular de acordo com a reatividade em cada marca de lâminas HEp-2	54
Tabela 10. Índice Kappa de concordância entre pares de marcas de lâminas em relação à reatividade em cada compartimento celular.....	55
Tabela 11 - Distribuição das amostras reagentes de acordo com a concordância total de reatividade global e por compartimento celular nas quatro marcas de lâminas HEp-2.....	56
Tabela 12. Frequência de amostras reagentes apresentando concordância total com relação à reatividade global e por compartimento celular nos diferentes grupos clínicos	57
Tabela 13 - Distribuição das amostras reagentes de acordo com o grau de concordância de reatividade por compartimento celular nas quatro marcas de lâminas HEp-2	59
Tabela 14 - Distribuição das amostras reagentes de acordo com o grau de concordância de reatividade global em cada grupo clínico.....	60
Tabela 15 - Distribuição das amostras reagentes de acordo com o grau de concordância de reatividade em cada compartimento celular nos três grupos clínicos	61

Tabela 16 - Análise do grau de concordância de reatividade global e por compartimento celular entre os grupos clínico.....	62
Tabela 17 - Distribuição das amostras reagentes de acordo com a intensidade de reatividade e concordância total de reatividade por compartimento celular nos três grupos clínicos.....	63
Tabela 18 - Distribuição das amostras reagentes de acordo com a ocorrência de cada padrão nuclear nas quatro lâminas HEp-2, com derivação do escore ponderado de concordância de cada padrão.....	72
Tabela 19 - Distribuição das amostras reagentes de acordo com a ocorrência de cada padrão citoplasmático nas quatro lâminas HEp-2, com derivação do escore ponderado de concordância de cada padrão.....	73
Tabela 20 - Frequência de amostras de baixa e alta intensidade de imunofluorescência de acordo com o grau de robustez do padrão nuclear na IFI- HEp-2	77
Tabela 21 - Frequência de amostras de baixa e alta intensidade de imunofluorescência de acordo com o grau de robustez do padrão citoplasmático na IFI-HEp-2	78
Tabela 22 - Frequência dos padrões nucleares por grupo clínico nos quatro substratos de lâmina HEp-2.....	82
Tabela 23. Frequência dos padrões citoplasmáticos por grupo clínico nos quatro substratos de lâmina HEp-2.....	84
Tabela 24 - Distribuição da intensidade de fluorescência em amostras que apresentaram concordância subtotal.....	87

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Informações gerais sobre os Kits de lâmina HEp-2 utilizados no estudo	29
Quadro 2 - Classes de concordância de reatividade de amostras em quatro lâminas de HEp-2	36
Quadro 3 - Exemplo prático da elaboração e cálculo do escore ponderado de concordância de reatividade	37
Quadro 4 - Classes de concordância de reatividade de acordo com o escore ponderado de concordância	38
Quadro 5 - Classificação semi-quantitativa da intensidade de fluorescência	38
Quadro 6 - Exemplos de possibilidades de concordância na intensidade de fluorescência entre os substratos IFI-HEp-2	39
Quadro 7 - Número de amostras consideradas reagentes por compartimento celular para a análise de concordância na intensidade de imunofluorescência	40
Quadro 8 - Possibilidade de concordâncias de padrões morfológicos IFI-HEp-2	42
Quadro 9 - Classes de robustez dos padrões morfológicos IFI-HEp-2	43
Quadro 10. Interpretação dos valores do Coeficiente Kappa	45
Quadro 11 - Lista dos padrões morfológicos IFI-HEp-2 encontrados no estudo.....	69
Quadro 12 - Distribuição das amostras reagentes de acordo com o padrão de imunofluorescência nuclear e a marca de lâmina HEp-2	70
Quadro 13 - Distribuição das amostras reagentes de acordo com o padrão de imunofluorescência citoplasmático e a marca de lâmina HEp-2.....	71

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática com imagens de diferentes fases do ciclo celular avaliadas em células HEp-2, com ênfase para a fases da mitose	15
Figura 2 - Diferenças nos padrões de imunofluorescência em células HEp-2 de acordo com a marca de lâmina utilizada	18
Figura 3 - Comportamento do padrão nuclear pleomórfico (AC-13) em diferentes substratos antigênicos.....	19
Figura 4 - Comportamento do padrão nuclear Pontilhado Grosso, observado em amostra com autoanticorpos anti-U1 RNP, em diferentes substratos.	20
Figura 5 - Fluxograma de leitura de lâminas de IFI-HEp-2.....	32
Figura 6 - Árvore de Classificação do Consenso Brasileiro para pesquisa de autoanticorpos harmonizada para os padrões classificados pelo International Consensus on ANA Patterns	41
Figura 7 - Figura representativa da influência da intensidade de fluorescência no compartimento nuclear sobre o grau de concordância total de reatividade das amostras nos quatro substratos de células HEp-2.	64
Figura 8 - Figura representativa da influência da intensidade de fluorescência no compartimento nucleolar sobre o grau de concordância total de reatividade das amostras nos quatro substratos de células HEp-2.	65
Figura 9 - Figura representativa da influência da intensidade de fluorescência no compartimento placa metafásica sobre o grau de concordância total de reatividade das amostras nos quatro substratos de células HEp-2.....	66
Figura 10 - Figura representativa da influência da intensidade de fluorescência no compartimento citoplasmático sobre o grau de concordância total de reatividade das amostras nos quatro substratos de células HEp-2.....	67
Figura 11 - Figura representativa do grau de robustez dos padrões nucleares.....	74
Figura 12 - Figura representativa do grau de robustez dos padrões citoplasmáticos.	75
Figura 13 - Variação da frequência de alta e baixa intensidade de imunofluorescência de acordo com a robustez dos padrões nucleares IFI-HEp-2.	79
Figura 14 - Variação da frequência de alta e baixa intensidade de imunofluorescência de acordo com a robustez dos padrões citoplasmáticos IFI-HEp-2.....	80
Figura 15 - Distribuição dos mais prevalentes padrões nucleares por grupo clínico entre os quatro substratos de lâmina HEp-2	83

Figura 16 - Distribuição das ocorrências de concordância subtotal (3X4)	85
Figura 17 - Distribuição da frequência de amostras apresentando concordância subtotal (3x4) envolvendo o padrão nuclear pontilhado fino (AC-4) de acordo com a intensidade de fluorescência.....	86

GLOSSÁRIO

AC	Códigos Alfanuméricos
AC-0	Não reagente
AC-1	Padrão Nuclear Homogêneo
AC-2	Padrão Nuclear Pontilhado fino denso
AC-3	Padrão Nuclear Centromérico
AC-4	Padrão Nuclear Pontilhado Fino
AC-5	Padrão Nuclear Pontilhado Grosso
AC-6	Padrão Nuclear Múltiplos Pontos Isolados
AC-7	Padrão Nuclear Raros Pontos Nucleares Isolados
AC-8	Padrão Nucleolar Homogêneo
AC-9	Padrão Nucleolar Aglomerado
AC-10	Padrão Nucleolar Pontilhado
AC-11/12	Padrão Nuclear Envelope Nuclear
AC-13/14	Padrão Nuclear Pleomórfico
AC-15/16/17	Padrão Citoplasmático Fibrilar
AC- 18	Padrão Citoplasmático Pontilhado
AC-19	Padrão Citoplasmático Pontilhado Fino Denso
AC-20	Padrão Citoplasmático Pontilhado Nino
AC-21	Padrão Citoplasmático Reticulado
AC-22	Padrão Citoplasmático Aparelho de Golgi
AC-23	Padrão Citoplasmático Rods and Rings
AC-24	Padrão Mitótico Centríolo
AC-25	Padrão Mitótico NuMA-2
AC-26	Padrão Mitótico NuMA-1
AC-27	Padrão Mitótico Ponte intercelular
ACPA	Anti-peptídeos citrulinados
ANA	Anticorpos antinucleares
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AR	Artrite Reumatóide
CAP	Colégio Americano de Patologia
CAR	Colégio Americano de Reumatologia

CBP	Colangite Biliar Primária
Células LE	Células do Lúpus Eritematoso
Célula HEp-2	Linhagem celular derivada de contaminação a partir de células HeLa
CENP-A	Proteínas Centroméricas A
CENP-B	Proteínas Centroméricas B
CENP-C	Proteínas Centroméricas C
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CONC	Concordantes
CREST	Calcinosis, Raynaud phenomenon, esophageal dysmotility, sclerodactyly, and telangiectasia(Calcinose, Fenômeno de Raynaud, Dismotilidade Esofágica, Telangiectasia)
CP	Contribuição ponderada
DAI	Doenças Autoimunes
DFS70	Dense fine Speckle protein of 70 kDa
DISC	Discordante
DMTC	Doença mista do tecido conjuntivo
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DNAI	Doenças não autoimunes
DS	Doadores de Sangue
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ENV-IV/AC-XX	Padrão Nuclear Envelope nuclear de intensidade variável
ES	Esclerose Sistêmica
FAN	Fator antinúcleo
Fuso Mit/AC-XX	Padrão Mitótico Fuso Mitótico
HAI-1	hepatite autoimune-1
HAS	hipertensão arterial sistêmica
HCV	vírus da hepatite C
ICAP	International Consensus on ANA Patterns
IFI	Imunofluorescência Indireta
IFI-HEp-2	Imunofluorescência Indireta em células HEp-2
IgA	Imunoglobulina de cadeia pesada alfa
IgM	Imunoglobulina de cadeia pesada m.u
IgG	Imunoglobulina de cadeia pesada gama

IUIS	Autoantibody Standardizing Committee da International Union of Immunology Societies
Jo-1	Antihistidil-tRNA sintetase
kDa	Kilo Dáltons
LEDf/p75	Lens epithelium-derived growth factor of 75 kDa
LES	Lúpus Eritematoso Sistêmico
LKM	Liver kidney Microsomal
MISTO	Múltiplos Padrões
PAMA/AC-XX	Padrão Citoplasmático Pseudo –AMA
PBS	Phosphate Buffer Solution (Solução tampão de Fosfato)
PCD/AC-XX	Padrão Citoplasmático Pontos Isolados
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen (antígeno de célula em proliferação)
PFCOA/AC-XX	Padrão Nuclear Pontilhado Fino Associado a Pontos que Coalescem
PF-IV/AC-XX	Padrão Nuclear Pontilhado Fino de Intensidade Variável
PF-PL/AC-XX	Padrão Nuclear Pontilhado Fino com Placa Metafásica
pH	Potencial Hidrogênio
Polo Mit/AC-XX	Padrão Mitótico Polo Mitótico
Ponte Int./AC-XX	Padrão Mitótico Ponte Intercelular
QH/AC-XX	Padrão Nuclear Quasi-homogêneo
REA	Reagente
SM	Antígeno Smith
RPM	Rotação por minuto
SSJ	Síndrome de Sjögren
SSA/Ro	Sjögren syndrome antigen A (Antígeno da Síndrome de Sjögren A) / ribonucleoproteína Ro
SSB/La	Sjögren syndrome antigen B (Antígeno da Síndrome de Sjögren B) ribonucleoproteína La
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
U1-RNP	Ribonucleoproteína nuclear pequena U1 (anticorpos anti U1RNP)
U3-RNP	Ribonucleoproteína nuclear pequena U3 (antifibrilarina)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. Implicações da utilização das células HEP-2 como substrato antigênico por diferentes marcas de lâminas.....	17
2. JUSTIFICATIVA	23
3. OBJETIVOS	24
3.1. Geral	24
3.2. Específicos.....	24
4. CASUÍSTICA E MÉTODOS	25
4.1. Seleção dos participantes do estudo e material biológico	25
4.1.1. Casuística.....	25
4.2. Critérios de inclusão e exclusão para o estudo	25
4.2.1. Critérios de inclusão	25
4.2.2. Critérios de Exclusão.....	26
4.3. Obtenção das amostras	26
4.4. Pesquisa de autoanticorpos contra antígenos celulares por imunofluorescência indireta em células HEP-2 (IFI-HEP-2).....	26
4.4.1. Critérios de inclusão e características dos substratos selecionados para o estudo	27
4.4.1.2. Morfologia celular e número de mitoses por campo	27
4.4.1.3. Confluência Celular.....	27
4.4.1.4. Escolha dos conjugados fluorescentes.....	27
4.4.1.5. Titulação do conjugado	28
4.4.1.6. Características dos substratos selecionados para o estudo	28
4.5. Processamento das amostras.....	29
4.6. Leitura das lâminas	30
4.7. Análise consolidada de consistência interna	31
4.8. Reatividade global das amostras usando distintas marcas de lâminas HEP-2.....	33
4.8.1. Distribuição de todas as amostras de acordo com a reatividade global em cada marca de lâmina HEP-2.....	33
4.8.2. Avaliação da concordância na reatividade global	33
4.9. Comparação da reatividade entre pares de marcas de lâminas HEP-2.....	34
4.9.1. Fase 1:Concordância de reatividade global	34
4.9.2. Fase 2: Concordância de reatividade por compartimento celular em pares de lâminas HEP-2 considerando-se todas as amostras reagentes	34

4.9.3. Fase 3: Distribuição das amostras reagentes em cada compartimento celular de acordo com a concordância de reatividade nas distintas lâminas HEp-2.....	35
4.10. Concordância intra-amostra da reatividade em diferentes marcas de lâminas HEp-2 ...	35
4.10.1. Fase 1: Concordância total de reatividade.....	35
4.10.2. Fase 2: Escore ponderado de concordância de reatividade	36
4.10. Análise da reatividade de acordo com a intensidade de fluorescência em diferentes marcas de lâminas HEp-2.....	38
4.11.1. Caracterização da concordância em intensidade de fluorescência por compartimento celular entre os grupos clínicos.	39
4.11. Análise da robustez dos padrões morfológicos IFI-HEp-2.....	40
4.12. Caracterização da reprodutibilidade de padrões morfológicos no teste IFI-HEp-2 em diferentes substratos em função de outras variáveis.....	43
4.12.1. Reprodutibilidade de padrões morfológicos no teste IFI-HEp-2 de acordo com a intensidade de imunofluorescência das amostras	43
4.12.2. Reprodutibilidade de padrões morfológicos no teste IFI-HEp-2 em diferentes substratos de acordo com o grupo clínico das amostras.....	44
4.12.3. Identificação de padrões com tendência a maior representatividade nas ocorrências de concordância subtotal	44
4.13. Cálculo estatístico	44
4.13.1. Coeficiente Kappa - Nível de concordância.....	44
4.13.3. Teste do <i>Qui-quadrado</i> e Teste Exato de Fisher	45
4.13.4. Teste de Kruskal Wallis.....	46
5. RESULTADOS	47
5.1. Reatividade global das amostras usando distintas marcas de lâminas HEp-2.....	47
5.2. Análise da reatividade entre pares de marcas de lâminas HEp-2.....	49
5.2.1 Análise da reatividade global	49
5.2.2 Análise da reatividade por compartimento celular	53
5.3. Concordância intra-amostra da reatividade em diferentes marcas de lâminas HEp-2 ..	55
5.4. Análise do grau de concordância.....	57
5.4.1. Comportamento de cada grupo clínico em relação ao grau de concordância de reatividade das amostras entre distintas marcas de lâminas HEp-2	59
5.5. Análise da concordância total de acordo com a intensidade de fluorescência em diferentes marcas de lâminas HEp-2.	62
5.6. Análise do grau de concordância e robustez dos padrões morfológicos FAN-HEp-2...	67

5.5.1. Análise do grau de concordância dos diversos padrões IFI-HEp-2 em quatro marcas de lâminas HEp-2.....	71
5.5.2 Análise de robustez dos diversos padrões IFI-HEp-2em quatro marcas de lâminas HEp-2	73
5.5.3. Reprodutibilidade de padrões morfológicos de IFI-HEp-2 em diferentes substratos em função do grau de intensidade da imunofluorescência.....	75
5.7. Comportamento de padrões morfológicos no teste IFI-HEp-2 em diferentes substratos em função da natureza clínica das amostras	80
5.8. Identificação de padrões com tendência a maior representatividade nas ocorrências de concordância subtotal	84
6. DISCUSSÃO	88
7. CONCLUSÕES	100
8. REFERÊNCIAS	101
9. LISTA DE ANEXOS	101
9.1. ANEXO I: Lista de critérios de classificação para o diagnóstico das doenças autoimunes.....	110
9.2. Critérios codificados para o Diagnóstico de Hepatite autoimune pelo Grupo Internacional	112
9.3. Critérios de classificação para o diagnóstico para a Síndrome de Sjögren	114
9.4. Anexo II: Parecer Consubstanciado do CEP via Plataforma Brasil	115
9.5. ANEXO III Relação dos projetos de pesquisa aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP com anuência para utilização de amostras em projetos futuros contidas no banco de dados da disciplina de Reumatologia da UNIFESP	118
9.6. Anexo IV: Termo de Consentimento livre e Esclarecido.....	119

1. INTRODUÇÃO

Anticorpos ou imunoglobulinas são proteínas sintetizadas e secretadas por linfócitos B e plasmócitos, sendo moléculas essenciais na resposta imune adaptativa humoral para o reconhecimento de diferentes determinantes antigênicos ^(1,2). Os autoanticorpos, por sua vez, pertencem a um grupo restrito de imunoglobulinas autoreativas, que reagem contra alvos moleculares endógenos (autoantígenos). Os autoanticorpos reconhecem diferentes constituintes próprios (proteínas, ácidos nucleicos, lipídios e carboidratos) situados em várias regiões celulares (núcleo, nucléolo, citoplasma, membrana celular) ou mesmo livres no meio extracelular. Podem reconhecer antígenos de expressão restrita a um único órgão, tecido ou célula, ou antígenos expressos de forma ubíqua ^(1,2,3,4).

Ao contrário do que se acreditava inicialmente, a produção dos autoanticorpos não ocorre somente em contexto patológico, sendo um processo fisiológico. De fato, a população sadia apresenta uma proporção significativa de imunoglobulinas autoareativas ^(4,5,6,7). Os autoanticorpos observados no contexto fisiológico são demonimados autoanticorpos naturais, pois surgem independentemente de imunização prévia e estão associados ao estado de autoimunidade fisiológica. Em contraposição, os autoanticorpos observados em estados autoimunes patológicos apresentam características que sugerem uma resposta imune adaptativa específica. De forma geral, estas duas classes anticórpicas se diferenciam sob alguns aspectos importantes, tais como: a classe isotípica, níveis séricos, avides pelo antígeno, e pela capacidade de reconhecimento de apenas um (monorreatividade) ou mais antígenos (polirreatividade) ^(3,8). Anticorpos naturais ocorrem em baixos títulos e predominantemente pertencem à classe IgM, porém os isotipos IgA e IgG também são relatados. Esses anticorpos são polirreativos, reagindo com a gama de antígenos distintos, apresentam afinidade intrínseca moderada ou baixa pelos alvos antigênicos e tendem a ocorrer em baixos níveis séricos.

Por outro lado, os autoanticorpos observados em condições inflamatórias autoimunes crônicas, ditos patológicos, ocorrem habitualmente em altos títulos, com predomínio da classe IgG. São relativamente monoespecíficos e apresentam alta avides intrínseca ao antígeno ^(3,5,8).

A presença dos autoanticorpos também deve ser analisada sob o aspecto do seu potencial patogênico e o seu papel na evolução das doenças. Existem autoanticorpos, que embora característicos de algumas doenças autoimunes, não exercem papel direto na patogênese desses distúrbios e não guardam correlação com a atividade ou progressão da doença. De fato, parecem representar um epifenômeno sem associação causal direta ^(9,10).

Em contrapartida, alguns autoanticorpos induzem à progressão de doenças por diferentes mecanismos ⁽¹¹⁾ e parecem ter papel patogênico direto, como os anticorpos anti-desmogleína 3 no pênfigo vulgar e o anticorpo contra o receptor da acetilcolina na miastenia gravis. Independentemente de seu potencial papel patogênico, vários autoanticorpos são de grande relevância na elucidação diagnóstica e são considerados biomarcadores específicos para o diagnóstico de algumas doenças autoimunes e alguns fazem parte dos critérios de classificação de diferentes doenças autoimunes ⁽⁷⁾. Alguns exemplos de autoanticorpos com papel de biomarcadores diagnósticos incluem: anti-DNA nativo e antinucleossomo no Lúpus eritematoso sistêmico (LES) ^(12,13), anti-peptídeos citrulinados (ACPA) na artrite reumatoide (AR) ^(14,15), antimitocôndria na colangite biliar primária (CBP) ⁽¹⁶⁾, antiactina F e anti-LKM-1 na hepatite autoimune (HAI) tipo-1 ⁽¹⁷⁾, anticardiolipina na síndrome antifosfolípide (SAF) ⁽¹⁸⁾, antitopoisomerase I (Scl-70) na esclerose sistêmica (ES) ^(19,20), anti*histidil*-tRNA *synthetase* (Jo-1) na polimiosite ⁽²¹⁾, e antiproteinase 3 na Granulomatose com angiite ⁽²²⁾.

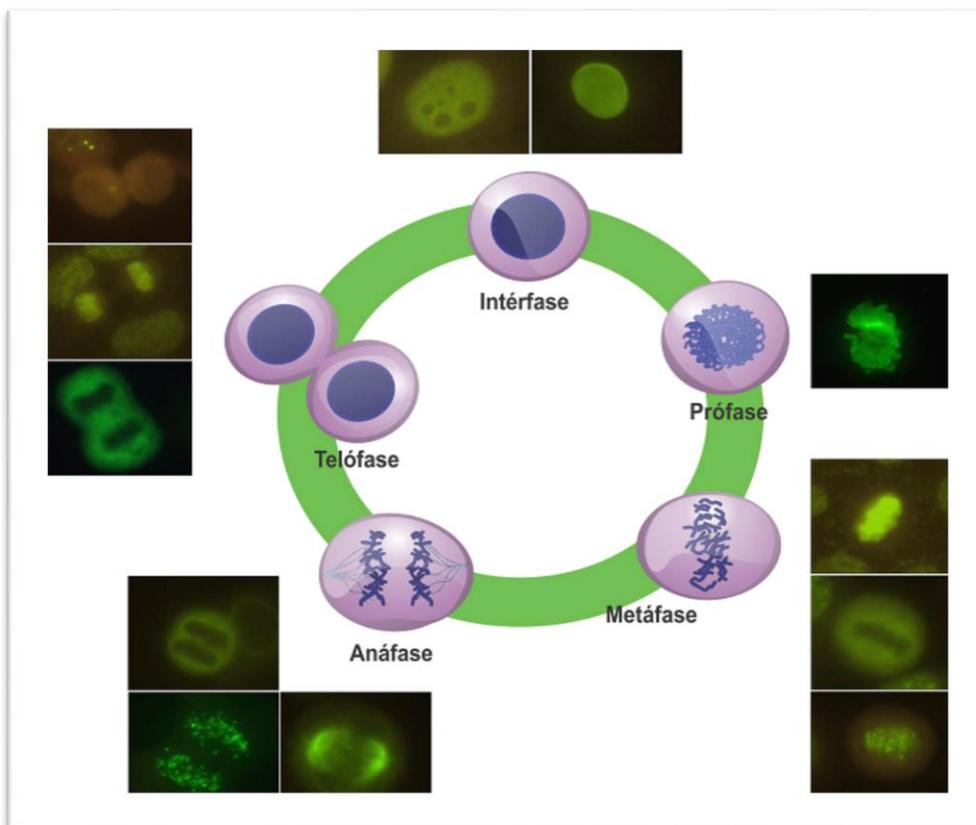
Historicamente, os autoanticorpos foram inicialmente demonstrados nas doenças reumáticas autoimunes (DRAI), com a descoberta do fator reumatoide e do fenômeno das células LE. De fato, demonstrou-se que substâncias presentes no soro de pacientes com LES opsonizavam componentes nucleares de células mortas, possibilitando que fossem fagocitados por neutrófilos. Este achado, descrito em 1948, ficou conhecido como “o fenômeno das células LE” e fez parte por vários anos dos critérios de classificação para o LES de acordo com o Colégio Americano de Reumatologia (CAR) ^(23,24,25,26,27). Mais tarde, demonstrou-se que o fenômeno das células LE era causado por anticorpos contra a cromatina. Posteriormente, o teste das células LE foi substituído por técnicas mais sensíveis para a pesquisa de anticorpos contra componentes da cromatina ^(26, 27, 28). Atualmente, o método mais utilizado para o rastreamento de autoanticorpos para o diagnóstico de doenças autoimunes é o teste de imunofluorescência indireta em células HEp-2 (IFI-HEp-2) ⁽²⁹⁾.

Este teste, historicamente conhecido com o nome de Fator antinúcleo (FAN), surgiu no final da década de 1950, com o emprego de cortes de tecidos de roedores e “imprint” de fígado de camundongo como substratos antigênicos ^(26,28,30). Esta nova forma de avaliação possibilitou a identificação de um espectro mais amplo de autoanticorpos que a pesquisa de células LE que evidenciava apenas anticorpos contra a cromatina. Na década de 1980, passou-se a utilizar a células HEp-2 como substrato antigênico na reação de FAN, em função da melhor visibilidade e disponibilidade de antígenos. Assim, o IFI-HEp-2 ampliou consideravelmente o espectro de autoanticorpos passíveis de detecção, estendendo o uso do teste para pacientes com suspeita de outras doenças autoimunes e não apenas o LES ^(26,26).

Hoje se reconhece que o teste de IFI-HEp-2 vai além da pesquisa de anticorpos contra antígenos nucleares, motivo pelo qual alguns o denominam como “pesquisa de autoanticorpos contra antígenos celulares”⁽³¹⁾.

As células HEp-2 (*American Type Culture Collection CCL-23*) são uma linhagem tumoral contínua e sua utilização substituiu cabalmente o emprego de tecido animal como substrato antigênico, devido a múltiplos fatores entre os quais a oferta de uma miríade de autoantígenos humanos em um arranjo espacial amplo e enriquecido pela representação das diversas fases do ciclo celular. Essas características permitem uma excelente visualização da distribuição espacial dos autoantígenos, resultando no reconhecimento de múltiplos padrões de imunofluorescência indireta (IFI). A representação de células em diferentes fases do ciclo celular favorece a detecção de autoanticorpos contra uma grande diversidade de autoantígenos expressos durante a mitose (**observadas na Figura 1**) e a interfase (fases G0, G1, G2 e S)^(25,26).

Figura 1 - Representação esquemática com imagens de diferentes fases do ciclo celular avaliadas em células HEp-2, com ênfase para a fases da mitose⁽³²⁾



Ciclo celular avaliado em HEp-2, com ênfase para a fases da mitose. Imagem gentilmente cedida por Dr. Wilson de Melo Cruvinel - Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC).

Ademais, as células HEp-2 apresentam vários nucléolos e um volumoso citoplasma rico em organelas e proteínas citoplasmáticas ^(25,26). Devido a essas características, a triagem de autoanticorpos contra antígenos celulares humanos por IFI-HEp-2 é atualmente o teste recomendado pelo CAR ⁽³³⁾. Os resultados reportados nesse teste indicam os níveis séricos relativos (título) e prováveis associações antigênicas (dadas pelo padrão de imunofluorescência) dos autoanticorpos presentes na amostra, o que pode fornecer uma indicação preliminar de possíveis associações clínicas ^(5,6,34).

Sobre essas duas informações a valorização e interpretação do teste são pautadas. O adequado reconhecimento do padrão observado é de extrema importância, uma vez que pode fornecer informações preliminares sobre a natureza do autoanticorpo em uma determinada amostra e, até mesmo, indicar quais testes adicionais e específicos deverão ser realizados.

Alguns exemplos são:

1. Padrão nuclear pontilhado grosso: sugere a presença de anticorpos anti-Sm e/ou anti-U1-RNP ⁽³⁵⁾. O anti-Sm é considerado um biomarcador específico do LES e faz parte dos critérios de classificação para a doença ⁽³⁶⁾. Já o anti-U1-RNP sinaliza a presença de doença autoimune sistêmica, sendo encontrado principalmente no LES, na doença mista do tecido conjuntivo (DMTC) e na ES ⁽³⁷⁾;
2. Padrão nucleolar aglomerado com placa pericromossômica: sugere anticorpos antifibrilarina (U3-RNP) ⁽³⁸⁾, que estão associados à ES com envolvimento cutâneo difuso e visceral grave ⁽³⁹⁾;
3. Padrão citoplasmático pontilhado fino denso: frequentemente associado à presença de autoanticorpos contra a proteína P ribossomal, especialmente se associado ao padrão nucleolar homogêneo em menor intensidade ⁽⁴⁰⁾. Dependendo do grupo étnico, estes autoanticorpos estão presentes em 6 a 20% dos pacientes com LES ⁽⁴¹⁾;
4. Padrão nuclear centromérico: resultante do reconhecimento das proteínas centroméricas (CENP-A, CENP-B e CENP-C) ⁽⁴²⁾. Autoanticorpos anticentrômero são marcadores de formas limitadas da esclerose sistêmica, em especial a forma CREST (calcinosis, Raynaud's phenomenon, esophageal dysmotility, sclerodactyly and telangiectasia). São encontrados também na síndrome de Sjögren (SSj) e na colangite biliar primária (CBP);
5. Padrão misto do tipo nuclear e nucleolar pontilhado fino com coloração citoplasmática característica e presença de pontos fluorescentes discretos na placa cromossômica: este conjunto de padrões está fortemente associado à presença de autoanticorpos contra a DNA topoisomerase I, presentes em pacientes com ES ⁽²⁰⁾;

6. Padrão nuclear homogêneo: sugere a presença de autoanticorpos contra DNA nativo, nucleossomos (cromatina) ou histonas; os dois primeiros são considerados marcadores de LES ⁽²⁰⁾;

7. Padrão nuclear pontilhado fino denso: indica a presença de autoanticorpos anti-DFS70 ou LEDGF/p75, que não têm relação específica com doença autoimune sistêmica e são frequentemente encontrados em indivíduos hígidos ⁽⁵⁾. Este padrão é um forte indício da presença de anticorpos anti-DFS70 e ausência de outros autoanticorpos relevantes, sendo considerado um forte elemento contra a possibilidade de doença autoimune sistêmica.

1.1. Implicações da utilização das células HEp-2 como substrato antigênico por diferentes marcas de lâminas

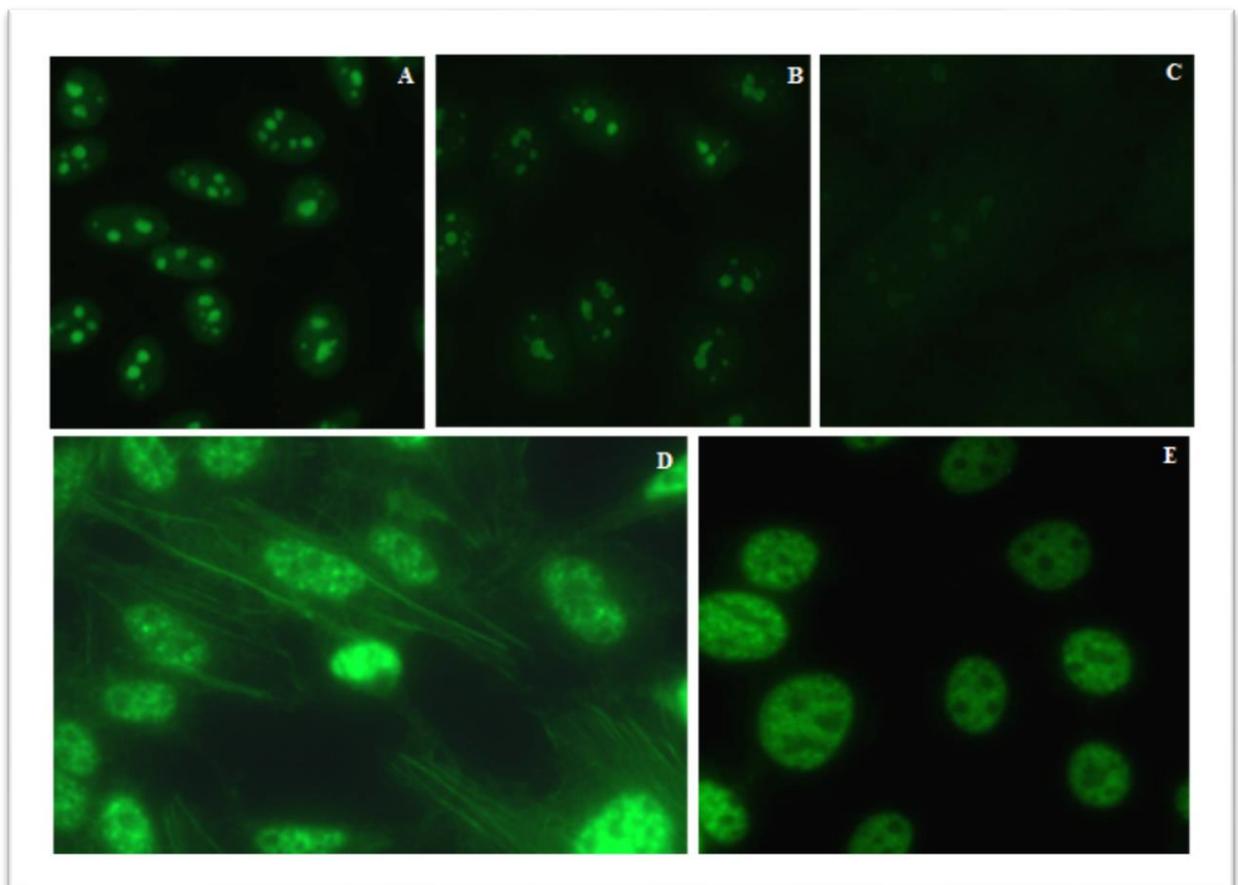
A difusão mundial do uso das células HEp-2 como substrato para triagem de autoanticorpos se deu por uma série de motivos, incluindo a simplicidade de execução metodológica, a disponibilidade universal dessa linhagem celular e a exuberância das estruturas celulares que permitem o pronto reconhecimento de diversos padrões ⁽⁴³⁾. Hoje, culturas de células HEp-2 estão presentes em todo o mundo e uma vasta gama de companhias produz kits utilizando células HEp-2 como substrato. Esta expansão expôs uma fragilidade do teste quanto à reprodutibilidade dos resultados obtidos quando são usadas lâminas de diferentes procedências. Este quadro se agrava quando consideramos a heterogeneidade na metodologia de execução do teste, na forma de leitura das lâminas, nas nomenclaturas para classificação dos padrões e na distinção morfológica entre os mesmos. Com o intuito de uniformizar a interpretação dos diferentes padrões morfológicos de IFI, têm sido organizados encontros entre especialistas para elaboração de Consensos Nacionais no Brasil com a finalidade de padronizar os procedimentos laboratoriais e a nomenclatura referente aos padrões de IFI-HEp-2 nos diversos laboratórios do país ^(26,28,44,45). Posteriormente essa iniciativa foi expandida de forma gradativa no âmbito internacional com a criação do *International Consensus on ANA Patterns* (ICAP) que passou a atribuir códigos alfanuméricos (AC-0 a AC-29) para cada padrão morfológico (<https://www.anapatterns.org/>) com o objetivo central de estabelecer a padronização da nomenclatura e diretrizes para a interpretação do teste em todo o mundo ^(46,47,48).

No entanto, os detalhes metodológicos das condições do cultivo celular e preparação das lâminas com o substrato celular HEp-2 são peculiares a cada fabricante e essas informações são restritas a protocolos adaptados com particularidades não compartilhadas

com os usuários. Este fato é relevante uma vez que a disponibilidade de epítomos e a distribuição espacial dos autoantígenos nos vários domínios celulares podem sofrer consideráveis modificações em função das condições de cultivo e fixação das células ^(49,50). Como consequência, um mesmo soro testado em lâminas de diferentes fornecedores pode resultar padrões de IFI distintos, devido a diferenças na expressão de autoantígenos nucleares, nucleolares, citoplasmáticos e de placa cromossômica.

Desta forma, o potencial impacto que a heterogeneidade das diversas marcas comerciais de lâminas de células HEp-2 tem sobre a adequada identificação do padrão de IFI no ensaio IFI-HEp-2 tem destacada implicação prática ^(51,52), o que procuramos ilustrar na **Figura 2**.

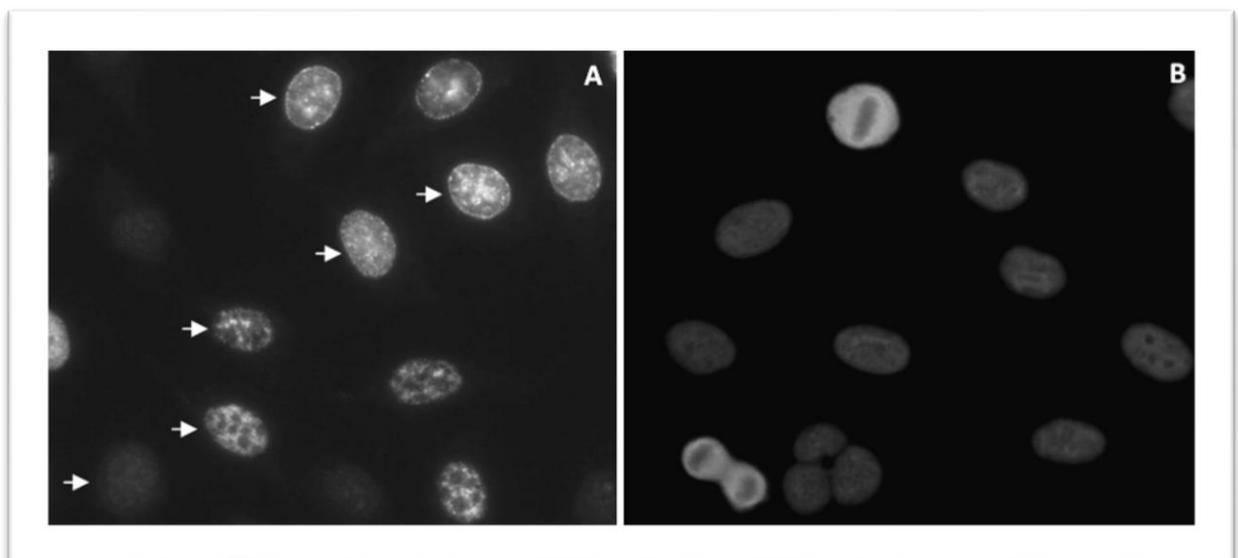
Figura 2 - Diferenças nos padrões de imunofluorescência em células HEp-2 de acordo com a marca de lâmina utilizada



Imunofluorescência indireta em células HEp-2 (sob magnificação de 400 vezes). A-C, amostra de soro de uma paciente com esclerose sistêmica, apresentando padrão nucleolar em título $\geq 1/640$ em dois de três substratos de diferentes marcas comerciais; D-E, amostra de soro de uma paciente com autoanticorpos anti-U1 RNP e antiactina processada em substratos de dois fornecedores distintos ⁽⁵³⁾.

Dellavance et al. (2013) fizeram um estudo preliminar do problema, avaliando o desempenho de diversas marcas de lâminas HEp-2 frente a um painel de amostras de soro representativas dos padrões de IFI-HEp-2 mais relevantes e reconhecidos pelo Consenso Brasileiro para pesquisa de autoanticorpos em células HEp-2^(28,53). Neste trabalho, o painel de amostras foi testado em sete marcas de lâminas de células HEp-2, tendo-se demonstrado que alguns padrões não são igualmente reconhecidos em todos os substratos. Por exemplo, o padrão citoplasmático pontilhado fino associado à autoanticorpos anti-Jo-1 foi observado em apenas duas das sete lâminas avaliadas (28,5%). A adequada indicação da possível presença deste autoanticorpo (anti-histidil tRNA sintetase) tem implicação clínica direta por ser um autoanticorpo marcador de síndrome anti-sintetase e polimiosite⁽²¹⁾ e direcionará o clínico assistente à realização de testes específicos que comprovarão a presença do anti-Jo-1. No mesmo estudo foi observado que o padrão nuclear pleomórfico sugestivo da presença de autoanticorpos contra o PCNA (*Proliferating cell nuclear antigen* – antígeno de célula em proliferação), cuja presença está associada ao LES, foi observado em duas das sete lâminas avaliadas (28,5%), evidenciando provável prejuízo na expressão do antígeno na maioria dos substratos⁽⁵³⁾. **(Figura 3).**

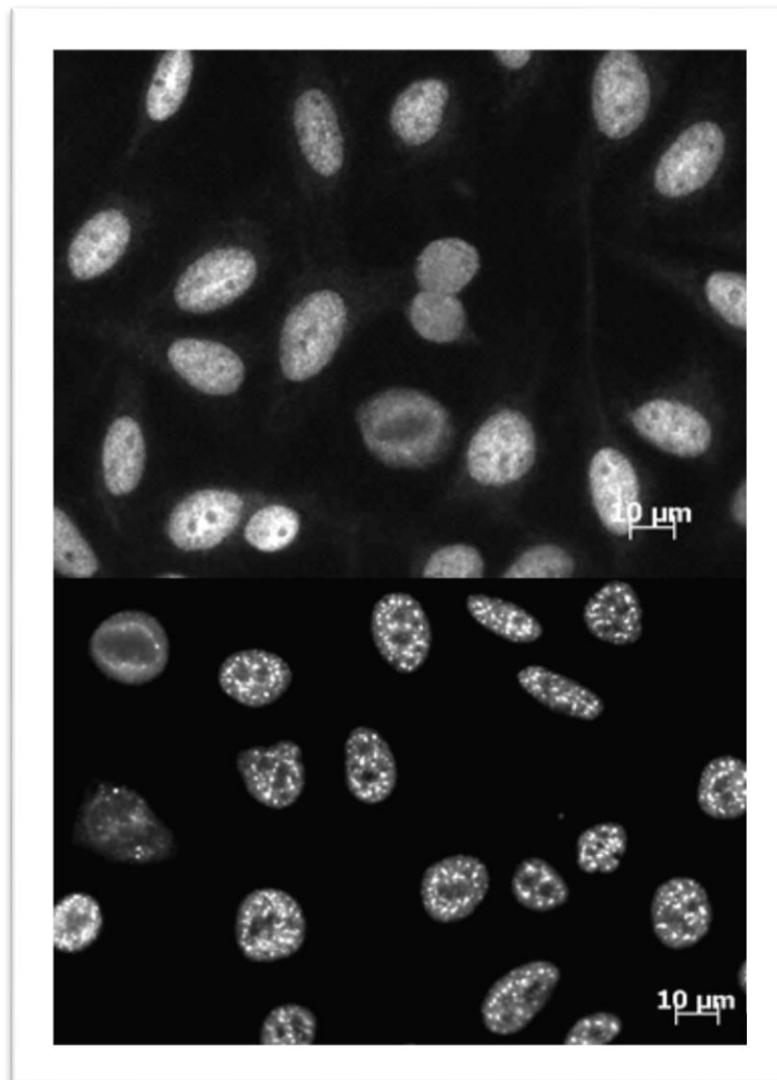
Figura 3 - Comportamento do padrão nuclear pleomórfico (AC-13) em diferentes substratos antigênicos.



Um soro padrão anti-PCNA foi testado em distintas lâminas de células HEp-2. (A) Padrão esperado e observado nas lâminas A e D. Setas indicam o pleomorfismo característico do padrão visualizado quando há a presença de autoanticorpos contra o antígeno de células em proliferação (PCNA); (B) padrão nuclear pontilhado fino incharacterístico, observado nas lâminas B, C, E, F e H. Adaptado de Dellavance et al⁽⁵³⁾.

Este mesmo estudo evidenciou que alguns padrões são mais robustos, sendo reconhecidos na maioria das lâminas. Por exemplo, o padrão nuclear Pontilhado Grosso (AC-5) foi observado em seis das sete lâminas (85,7%). No entanto, a falha em seu reconhecimento em uma das marcas de lâminas é extremamente prejudicial, pois este padrão nuclear está fortemente associado à presença de autoanticorpos anti-Sm e anti-U1-RNP, de grande relevância clínica ⁽⁵²⁾. **(Figura 4)**

Figura 4 - Comportamento do padrão nuclear Pontilhado Grosso, observado em amostra com autoanticorpos anti-U1 RNP, em diferentes substratos.



Painel inferior: Padrão esperado e observado nas lâminas A-F do estudo de Dellavance et al; Painel superior: Padrão Nuclear Pontilhado Fino discrepante observado na lâmina H. Adaptado de Dellavance et al ⁽⁵³⁾.

No mesmo sentido, Mello et al, também em 2012, avaliaram o comportamento de quatro marcas de lâminas contendo células HEp-2 como substrato antigênico, testando 74 amostras de soros padrões contendo autoanticorpos responsáveis pelos 10 padrões morfológicos IFI-HEp-2 mais constantes na rotina laboratorial^(28,54). Das 74 amostras de soro, 69 amostras (93%) foram concordantes para os padrões morfológicos em estudo, enquanto que em 7% dos casos foram observadas discrepâncias entre importantes padrões que apresentam relevância clínica⁽⁵⁴⁾.

No contexto de concordância de reatividade entre distintas marcas de lâminas HEp-2, o estudo de Pisetsky et al, (2018) utilizou 103 amostras de soro de pacientes diagnosticados com LES e histórico de positividade para autoanticorpos no teste IFI-HEp-2. Os soros foram diluídos a 1/40 e testados em três diferentes substratos, observando-se que a porcentagem de amostras não reagentes variou de 4,9% a 22,3% entre as diferentes marcas de lâminas⁽⁵⁵⁾.

Copple et al, (2012) investigaram o comportamento de 372 amostras de soro distribuídas em 160 casos de indivíduos com doenças autoimunes (50 casos de LES, 45 casos de AR, 35 casos de ES, 20 casos de SS, e 10 casos de polimiosite), 12 soros padrões de autoanticorpos do *Autoantibody Standardizing Committee da International Union of Immunology Societies (IUIS)*⁽⁵⁶⁾, 100 amostras de doadores de sangue saudáveis e 100 amostras aleatórias enviadas para teste de IFI-HEp-2⁽⁵⁷⁾. Foram testadas quatro diferentes marcas de lâminas de células HEp-2 e uma lâmina com células HEp-2000 (transgênica para hiper-expressão de SS-A/Ro 60 kDa) em diferentes diluições. Foi evidenciado que a porcentagem de concordância entre os cinco ensaios variou de 44% nas amostras de soro de pacientes com ES a 93% no grupo de doadores de sangue saudáveis entre os diferentes graus de diluições (ou títulos) e que as inconsistências observadas nos resultados entre as cinco marcas de lâminas variavam conforme a categoria clínica das amostras⁽⁵⁷⁾.

Em nossa rotina laboratorial, temos a oportunidade de testar as amostras em três substratos distintos de lâminas HEp-2. Com certa frequência nos surpreendemos com amostras que apresentam discrepâncias nos padrões observados nos diferentes substratos. Esta é uma situação que gera inquietação, pois não sabemos qual é o significado clínico e imunológico do achado nesses casos. A ocorrência de IFI-HEp-2 positivo consistente em vários substratos teria o mesmo significado da ocorrência de IFI-HEp-2 positivo em um substrato e negativo em outros? Qual seria a relevância clínica deste achado? Neste contexto, vale salientar o fato de que um teste de IFI-HEp-2 positivo não é específico de DRAI, mas também ocorre em indivíduos aparentemente saudáveis e em pacientes com uma vasta gama de

doenças não autoimunes. Como se situaria o fenômeno da não reprodutibilidade do IFI-HEp-2 em diferentes marcas de lâminas frente a este amplo espectro de contexto clínico?

Procurando contribuir para o esclarecimento dessa questão, o presente trabalho se propõe a estabelecer a frequência do fenômeno da não reprodutibilidade do teste IFI-HEp-2 em uma grande coorte de indivíduos, examinado o comportamento desse fenômeno em relação à natureza clínica das amostras, ao título e aos padrões morfológicos do teste IFI-HEp-2.

2. JUSTIFICATIVA

A pesquisa de autoanticorpos contra antígenos celulares por imunofluorescência indireta em células HEp-2 (IFI-HEp-2) é um teste de triagem de autoanticorpos que confere ao clínico direcionamento sobre quais testes específicos deverão ser realizados na vigência de um resultado positivo. Este exame de triagem conta com linhagem de células tumorais humanas como fonte antigênica. A preservação dos diferentes antígenos celulares é fortemente impactada pelos protocolos de preparação (permeabilização e fixação) das células utilizados pelos fornecedores. Desta forma, uma amostra positiva pode não apresentar os mesmos resultados quando processada em lâminas de diferentes fornecedores. Ademais, uma mesma amostra pode apresentar padrão de imunofluorescência distinto em diferentes lâminas HEp-2. Embora haja evidências do fenômeno de não reprodutibilidade de achados no teste IFI-HEp-2 em lâminas de diferentes procedências, até o presente momento não há estudos que façam uma caracterização sistemática desse fenômeno. Tampouco está documentado como este fenômeno se manifesta em amostras provenientes de distintos contextos clínicos, por exemplo, no contexto de doenças autoimunes, enfermidades não autoimunes e pessoas híginas. Os autoanticorpos presentes nessas distintas condições podem apresentar diferenças em avides, níveis séricos e reconhecimento antigênico e, assim, a sua detecção poderia ser diferentemente influenciada pelo tipo de lâmina HEp-2 utilizada na reação.

A partir dessas considerações, o presente trabalho propõe-se a realizar um estudo comparativo com amostras de pacientes com e sem doenças autoimunes em distintas lâminas HEp-2 aprovadas por agências regulatórias internacionais com o intuito de dimensionar o fenômeno de não reprodutibilidade dos resultados e verificar o impacto clínico derivado dessa provável diversidade de resultados.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Avaliar o fenômeno da não reprodutibilidade de resultados no teste de IFI-HEp-2 em diferentes substratos (lâminas) comerciais, comparando pacientes com doenças autoimunes, condições não autoimunes (doenças inflamatórias não autoimunes, infecciosas, neoplásicas e metabólicas) e indivíduos hígidos.

3.2. Específicos

1. Quantificar o fenômeno de não reprodutibilidade de resultados no teste de IFI-HEp-2 em diferentes contextos clínicos;
2. Investigar como o fenômeno de não reprodutibilidade afeta os diferentes padrões de IFI-HEp-2;
3. Determinar como o fenômeno da não reprodutibilidade se comporta em relação à concentração de autoanticorpos, dada pelo título da reação IFI-HEp-2.

4. CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1. Seleção dos participantes do estudo e material biológico

4.1.1. Casuística

Grupo I - Composto por amostras de soro de 300 pacientes com doenças autoimunes (DAI) assim divididas: Colangite Biliar Primária (n = 40), Esclerose Sistêmica (n = 30), Hepatite Autoimune (n = 50), Lúpus Eritematoso Sistêmico (n = 166), Síndrome de Sjögren primária (n = 14). Todas as amostras utilizadas eram de pacientes que se encaixavam nos critérios de classificação das respectivas doenças (Anexo I).

Grupo II - Composto por amostras de soro de 300 pacientes com doenças não autoimunes (DNAI), incluindo pacientes com Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS) (n =75), doenças psiquiátricas (n =76), neoplasias variadas (n =74) e indivíduos infectados pelo vírus da hepatite C (HCV) (n =75).

Grupo III - Composto por amostras de soro de 300 doadores de banco de sangue (DS) gentilmente cedidas pela COLSAN, São Paulo.

Todas as amostras foram codificadas e descaracterizadas com relação aos dados de identificação dos indivíduos. O presente projeto apresenta anuência do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) via plataforma Brasil, com o parecer de aprovação número 945.320 (Anexo II) e do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento do grupo Fleury, onde as amostras foram processadas.

4.2. Critérios de inclusão e exclusão para o estudo

4.2.1. Critérios de inclusão

As amostras utilizadas no estudo foram sequencialmente selecionadas a partir da coleção de amostras armazenadas a -70°C no laboratório de Imuno-Reumatologia da Disciplina de Reumatologia da Escola Paulista de Medicina (EPM/UNIFESP). Para participação no presente estudo, as amostras de pacientes obedeceram aos critérios de elegibilidade e classificação para cada doença. Todas as amostras de pacientes apresentam termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) obtido em projetos anteriores (Anexo IV), no qual os participantes da pesquisa autorizavam a utilização de seu material biológico em pesquisas futuras que envolvessem o estudo de autoanticorpos.

A fim de compor o tamanho amostral do grupo I desejável para o estudo, foram recrutados novos pacientes com Síndrome de Sjögren primária nos ambulatórios da Disciplina de Reumatologia UNIFESP e da Disciplina de Oftalmologia. Nesta situação os pacientes assinaram um novo TCLE, aprovando o uso do material para o ingresso na pesquisa (Anexo V).

As amostras de doadores de sangue obtidas na COLSAN são descaracterizadas de dados de identificação e têm autorização do Comitê de Ética em Pesquisa para utilização na pesquisa de biomarcadores.

4.2.2. Critérios de Exclusão

Foram excluídas do estudo:

1. Amostras de soro do grupo I cujos pacientes apresentassem diagnóstico concomitante de neoplasia ou doença infecciosa.
2. Amostras de soro dos grupos II e III cujos indivíduos apresentassem suspeita de doenças autoimune, mesmo que ainda não formalmente diagnosticada.

4.3. Obtenção das amostras

As amostras já existentes na coleção de soro da Disciplina de Reumatologia foram escolhidas de forma aleatória e cega quanto aos resultados dos estudos anteriores, buscando-se compor grupos com variada representação das enfermidades de interesse. Para as amostras de SSj, foram coletados 20mL de sangue em tubos secos. Após a retração do coágulo, o soro foi centrifugado a 5000 rotações por minutos (rpm) por 10 minutos na centrífuga JOUAN MR 1822. As amostras de soro foram aliquotadas e armazenadas à -70°C até que fossem utilizadas.

4.4. Pesquisa de autoanticorpos contra antígenos celulares por imunofluorescência indireta em células HEp-2 (IFI-HEp-2)

O teste IFI-HEp-2 foi realizado utilizando lâminas HEp-2 de diferentes fornecedores, aprovadas pela ANVISA (Agência Nacional da Vigilância Sanitária), que preenchem os critérios básicos de qualidade, no que se relacionava à morfologia das células, número de mitoses por campo, confluência celular e qualidade dos conjugados.

4.4.1. Critérios de inclusão e características dos substratos selecionados para o estudo

4.4.1.2. Morfologia celular e número de mitoses por campo

A morfologia celular é um critério importante, pois a adequada visibilidade dos diferentes compartimentos celulares (núcleo, nucléolo, citoplasma, aparelho mitótico e placa cromossômica) permite a observação de padrões morfológicos associados a antígenos nucleares, citoplasmáticos, nucleolares, bem como antígenos do aparelho mitótico dependentes do ciclo celular, além da placa metafásica. Portanto, foram selecionadas marcas de lâminas que apresentavam excelente visibilidade de todos os compartimentos celulares. Ademais, as lâminas selecionadas deveriam conter pelo menos 3 células em mitose por campo microscópico em aumento de 400 vezes.

4.4.1.3. Confluência Celular

A confluência celular refere-se à densidade de distribuição de células aderidas à lâmina (tapete celular). Entende-se que uma distribuição excessivamente esparsa prejudica a correta análise. Por outro lado, uma distribuição muito aglomerada também não é adequada. Consideramos aptas as lâminas que apresentassem entre 70% e 90% de confluência celular.

4.4.1.4. Escolha dos conjugados fluorescentes

Os autoanticorpos denominados patológicos associados às doenças autoimunes são predominantemente da classe IgG. Portanto, selecionamos kits de fornecedores que apresentassem conjugados de reatividade predominante contra imunoglobulina humana de classe IgG. Finalmente, foram priorizadas lâminas que, apresentando os critérios técnicos acima descritos, foram-nos acessíveis em termos de custo. De acordo com estes critérios, foram escolhidos os kits das marcas Hemagen (Hemagen Diagnostics, Inc. Columbia, EUA), Aesku Diagnostics (Oakland, CA 94607, EUA), Inova (Inova Diagnostics, Inc., San Diego, EUA) e Bion (MBL BION, Des Plaines, EUA).

4.4.1.5. Titulação do conjugado

Para cada marca de lâmina, utilizou-se o respectivo conjugado já incluso no kit, porém foi feita a titulação do conjugado previamente ao uso. De acordo com as recomendações dos Consensos Brasileiro de IFI-HEp-2, deve-se estabelecer a concentração ideal do conjugado (título do conjugado), para diferentes fornecedores e lotes por meio da técnica de titulação em bloco ⁽⁵⁸⁾. Para tal, utilizamos controles negativos e positivos limítrofes em que várias diluições do conjugado são cruzadas com diversas concentrações de um soro de referência, procurando-se a maior diluição do conjugado capaz de reproduzir o título nominal do soro de referência.

Utilizamos um painel de sete amostras de título previamente conhecido, sendo três amostras (A, B e C) com título nominal de 1/80, duas amostras (D e E) com título nominal de 1/160, e duas amostras (F e G) negativas. Foi também utilizado como controle (H) a solução tampão fosfato (Phosphate Buffer Solution-PBS) puro.

As amostras A, B e C foram diluídas a 1/80. As amostras D e E foram diluídas seriadamente em 1/80, 1/160 e 1/320. As amostras F e G foram diluídas a 1/80.

Para cada kit de células HEp-2, foram processadas três lâminas com as diluições citadas acima, utilizando três diferentes concentrações de conjugado para cada uma delas. Em função do processo de titulação do conjugado em cada lâmina, temos que na lâmina um foi aplicado o conjugado pronto para uso, na lâmina de número dois, aplicou-se o conjugado diluído em PBS na proporção 1/1, enquanto na lâmina três a proporção foi de 1/2. Foram escolhidas as diluições que mais bem refletiram o título nominal das amostras testadas.

4.4.1.6. Características dos substratos selecionados para o estudo

Os produtos selecionados são aprovados pela ANVISA, bem como pelas agências reguladoras dos Estados Unidos (FDA) e Comunidade Europeia (EMA). Os quatro fornecedores apresentavam lâminas com células HEp-2 fixadas na superfície de vidro em orifícios individuais rodeados de camada hidrofóbica.

Quadro 1 - Informações gerais sobre os Kits de lâmina HEp-2 utilizados no estudo

Marca de lâmina	Especificação por kit de lâmina HEp-2
Bion	O kit do fornecedor Bion MBL BION, Des Plaines, EUA, dos lotes ANK 5646, ANK 5649 E ANK 5672, válidos até Setembro de 2016 para os dois primeiros lotes e Outubro de 2016 para o último lote. Registro ANVISA 102255960003.
Hemagen	O kit do fornecedor Hemagen Diagnostics, Inc., Columbia, EUA lotes 5465 de referência 902345 válido até Dezembro de 2014 e lote 5711 de referência 902345 válido até Fevereiro de 2016. Registro ANVISA 10280220029.
INOVA	O kit do fornecedor INOVA Diagnostics, Inc., San Diego, EUA, de lote 017834 referência 708102 válido até Outubro de 2015. Registro ANVISA 80298490015.
Aesku	O kit do fornecedor Aesku Diagnostics Oakland, CA 94607, EUA utilizado foi o de referência 51100 lote 14013 válido até Abril de 2015 e referência 51101 lote 14083 válido até Abril de 2015. Registro ANVISA 10259610185.

A partir de agora e ao longo de todo o texto, as lâminas HEp-2 passam a ser codificadas como X, Y, Z, e W, que não necessariamente guardam correlação com a ordem do quadro acima.

4.5. Processamento das amostras

A execução do teste de IFI-HEp-2 seguiu as especificações protocolares de cada fornecedor.

1. As amostras foram diluídas à 1/80 (2,5µL de amostras em 200µL de tampão de amostra fornecidas pelo fabricante). Em seguida esta diluição foi vortexada por 5 segundos.
2. Os envelopes fechados contendo as lâminas foram trazidos à temperatura ambiente 15 minutos antes do uso.
3. As lâminas foram removidas da embalagem protetora e identificadas, evitando o contato direto com as células de revestimento, sendo imediatamente colocadas em câmara úmida.
4. O volume de amostras diluídas e dos controles pipetados em cada orifício foi entre 25 a 30 µL, certificando-se de que todos os orifícios estivessem completamente cobertos.
5. As lâminas foram incubadas em câmara úmida em temperatura ambiente por 30 minutos.

6. Subsequentemente, as lâminas foram retiradas da câmara úmida e gentilmente lavadas com um suave jato de tampão de lavagem fornecido em cada kit, de maneira cuidadosa para que o jato não incidisse diretamente nos orifícios. Para evitar contaminações e reações cruzadas, as lâminas foram inclinadas para o lado direito e para o lado esquerdo, fazendo com que o tampão escorresse do lado de fora da lâmina.
7. As lâminas foram colocadas em uma cuba de Coplin de vidro contendo tampão de lavagem durante 10 minutos. Em seguida desprezou-se o tampão de lavagem, repetindo-se a incubação em tampão de lavagem por mais duas vezes.
8. Após a lavagem, as lâminas foram imediatamente colocadas na câmara úmida e recobertas com 30 µL de conjugado fornecido em cada kit.
9. Com base nos resultados fornecidos na titulação dos conjugados, para todas as lâminas, foi aplicado o conjugado puro, excetuando a lâmina Y, no qual o conjugado foi diluído em PBS na proporção 1/1.
10. As lâminas foram incubadas por 30 minutos ao abrigo da luz em temperatura ambiente.
11. Os passos 6 e 7 foram repetidos para remoção completa do conjugado.
12. As lâminas foram retiradas uma a uma da cuba de lavagem e agitadas gentilmente para remover o excesso de tampão de lavagem;
13. Sem que as lâminas secassem, aplicou-se uma gota de Glicerina tamponada pH 9,5 em cada orifício, aplicada lamínula e retirado o excesso de glicerina com papel filtro;
14. As lâminas eram armazenadas em geladeira e ao abrigo da luz até o momento da leitura.

4.6. Leitura das lâminas

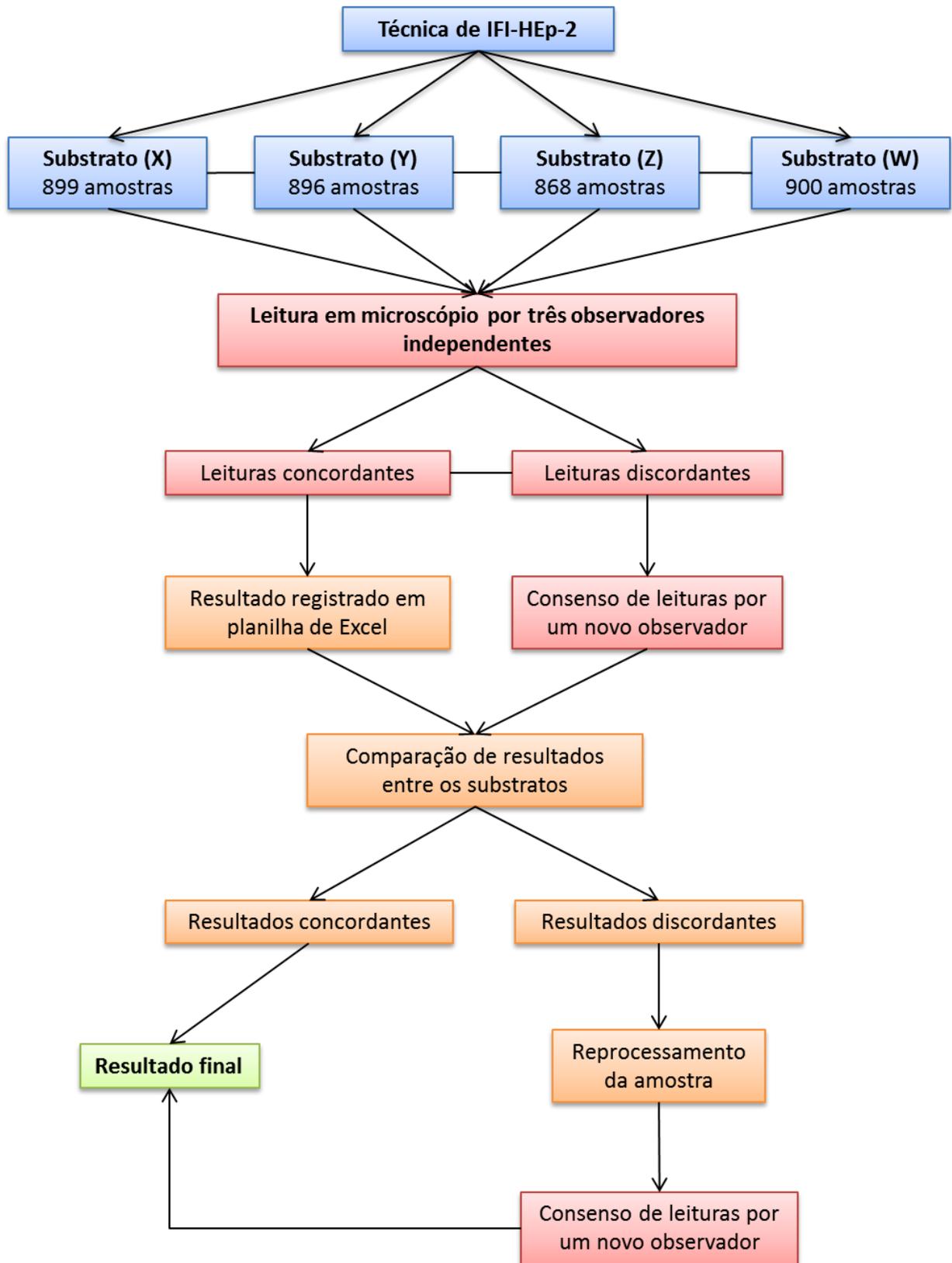
1. A leitura de cada lâmina foi realizada por três observadores independentes, experientes e que desconheciam as características clínicas das amostras, sem saberem dos resultados obtidos nas outras lâminas. A leitura ocorreu em microscópio de fluorescência de marca Olympus BX-50, com lâmpada de mercúrio 100 W Ushio, sob magnificação de 400 vezes e comprimento de onda de 400 nm.
2. As leituras foram realizadas pelo primeiro observador dentro do prazo de no máximo de 24 horas após a confecção das lâminas.
3. A seguir, as lâminas foram embrulhadas e estocadas a -20°C com o intuito de preservar o padrão morfológico e o título de fluorescência, até que os observadores seguintes lessem tais lâminas.

4. Os próximos leitores retiravam as lâminas do freezer -20°C e aguardavam até que estas atingissem a temperatura ambiente, procedendo-se então à leitura.
5. Quando não havia concordância de leitura entre os três observadores, um quarto observador foi acionado para harmonização da leitura junto aos demais. Os resultados das leituras eram inseridos em uma planilha de Excel. A **Figura 5** ilustra esquematicamente o fluxo operacional adotado.
6. Esta planilha tinha os dados registrados individualmente de acordo com os substratos HEP-2, compartimentos celulares, e título em cruces (+). Dentro da planilha foi acionado um comando que impossibilitava a digitação de padrões morfológicos e título de fluorescência que não fossem compatíveis com cada compartimento celular específico.
7. Os padrões de imunofluorescência foram divididos de acordo com os compartimentos celulares em padrões nucleares, padrões nucleolares, padrões citoplasmáticos e padrões de aparelho mitótico. Ademais foi anotado se a placa cromossômica metafásica estava corada.
8. Para minimizar as possibilidades de erro, as amostras que apresentaram alguma discrepância entre os substratos foram reprocessadas no ensaio IFI-HEP-2e lidas novamente sob a mesma estratégia, incluindo os 3 leitores regulamentares e, quando necessário, um quarto leitor. Este processo foi aplicado a 228 amostras que haviam apresentado algum grau de discrepância na primeira rodada. Destas, 221 mantiveram a discrepância e as outras 7 restantes se confirmaram concordantes.

4.7. Análise consolidada de consistência interna

A análise consolidada de consistência interna consistiu na avaliação de todas as amostras de soro, testadas nos quatro substratos HEP-2, com o intuito de verificar se todas as amostras foram processadas em todos os substratos, e se todos os seguimentos celulares apresentavam resultado registrado. Esta conferência de resultados foi realizada por duas duplas de analistas independentes em períodos diferentes. Entre as 900 amostras, 32 não foram processadas nos quatro substratos em virtude do baixo volume de amostra, sendo, portanto eliminadas do estudo. Deste modo, nossa amostragem final foi composta por 868 amostras para a comparação de resultados obtidos nas quatro marcas de lâminas HEP-2.

Figura 5 - Fluxograma de leitura de lâminas de IFI-HEp-2



4.8. Reatividade global das amostras usando distintas marcas de lâminas HEp-2.

Nesta primeira seção, definimos como reatividade global a reatividade com antígenos em qualquer compartimento celular. Portanto, as amostras foram classificadas como reagentes (REA), quando observada positividade em qualquer compartimento celular, ou não reagentes (NR), em casos negativos em toda extensão celular.

4.8.1. Distribuição de todas as amostras de acordo com a reatividade global em cada marca de lâmina HEp-2

O objetivo neste primeiro momento foi documentar a frequência de reatividade global nas quatro marcas de lâminas HEp-2.

4.8.2. Avaliação da concordância na reatividade global

Para a composição da concordância na reatividade global, estabelecemos normas de concordância de reatividade. As amostras foram consideradas totalmente concordantes quando todos os substratos apresentavam concordância na reatividade global ($X = Y = Z = W$). Caso contrário, foram consideradas discordantes. Entre as amostras concordantes, observamos duas possibilidades: a concordância positiva e a concordância negativa. As amostras de soro apresentando concordância global negativa, ou seja, que se mostraram não reagentes em todas as quatro lâminas ($n=402$) foram interpretadas como não tendo níveis relevantes de autoanticorpos acessíveis ao método IFI-HEp-2. Estas amostras contribuiriam artificialmente para maior concordância entre os substratos e por este motivo foram excluídas do estudo.

Entre as amostras discordantes, há duas configurações possíveis para a discordância na reatividade global nas quatro marcas de lâminas: 1) uma lâmina diverge das outras três, que concordam entre si (e.g., $A \ X \neq Y = Z = W$); ou 2) duas lâminas concordam entre si e diferem das outras duas, que também concordam entre si (e.g., $X = Y \neq Z = W$). Embora os membros dessas expressões matemáticas possam variar, só existem essas duas possibilidades: uma lâmina discordante das outras três ou dois pares de lâminas intrinsecamente concordantes, mas sendo os pares discordantes entre si.

As **466** amostras remanescentes, que apresentaram alguma reatividade em pelo menos uma marca de lâmina, foram denominadas **amostras reagentes** e utilizadas para o restante do estudo. Dentre os três grupos clínicos, foram consideradas amostras reagentes: **238 amostras DAI, 119 amostras DNAI e 109 amostras DS.**

4.9. Comparação da reatividade entre pares de marcas de lâminas HEp-2

Nesta segunda etapa, a investigação avançou no sentido de verificar se o fenômeno de não reprodutibilidade da reatividade IFI-HEp-2 ocorreria igualmente em todas as marcas de lâminas HEp-2 ou se alguma marca apresentaria maior discordância em relação às demais. Para tal, os resultados de reatividade foram analisados comparando as lâminas HEp-2 entre si, de acordo com as seguintes combinações: **X x Y; X x Z; X x W; Y x Z; Y x W e Z x W.** Para facilitar a compreensão, esta seção foi subdividida em três fases distintas.

4.9.1. Fase 1:Concordância de reatividade global

Considerando as combinações entre os pares de lâminas, as amostras foram inicialmente testadas de acordo com a reatividade global (sem distinção de compartimento celular). O tamanho amostral para cada dupla de lâmina variou de acordo com as amostras reagentes encontradas em cada combinação. Subsequentemente, a mesma análise de concordância de reatividade global entre os pares de lâminas HEp-2 foi realizada em separado para os grupos DAI, DNAI e DS.

4.9.2. Fase 2: Concordância de reatividade por compartimento celular em pares de lâminas HEp-2 considerando-se todas as amostras reagentes

Na segunda fase desta seção, a análise ocorreu sob o mesmo prisma da primeira fase, porém as concordâncias de reatividade em cada par de marcas de lâminas HEp-2 foram analisadas separadamente para cada compartimento celular. Em outras palavras, a concordância era assinalada somente quando a reatividade era observada no mesmo compartimento celular.

4.9.3. Fase 3: Distribuição das amostras reagentes em cada compartimento celular de acordo com a concordância de reatividade nas distintas lâminas HEp-2

Na terceira e última fase desta seção foi adotada metodologia semelhante àquela aplicada para análise da reatividade global, em que amostras negativas em um mesmo compartimento celular nas quatro lâminas HEp-2 foram excluídas das análises daquele compartimento celular, pois contribuiriam artificialmente para aumentar o grau de concordância. Por outro lado, aquelas que apresentaram reatividade para determinado compartimento celular em pelo menos uma marca de lâmina HEp-2 foram denominadas amostras reagentes para aquele compartimento, e assim consideradas para as próximas análises referentes a este compartimento. Portanto, para a análise das amostras reagentes em cada compartimento celular de acordo com a reatividade em cada marca de lâminas HEp-2, foram consideradas **403** amostras reagentes para o compartimento nuclear, **39** amostras reagentes para o compartimento nucleolar, **193** amostras reagentes para a placa metafásica, **119** amostras reagentes para o compartimento citoplasmático e **7** amostras reagentes para o aparelho mitótico.

4.10. Concordância intra-amostra da reatividade em diferentes marcas de lâminas HEp-2

Nas seções anteriores nós analisamos a distribuição das amostras de acordo com a concordância em diferentes marcas de lâminas, com foco no comportamento de cada marca de lâmina. Nesta seção, avaliamos a concordância de cada amostra em relação à reatividade nos quatro substratos, com foco na reatividade de cada amostra. Assim, o foco nesta seção é o comportamento de cada amostra. Para definir o grau de concordância intra-amostra, procedemos de duas maneiras distintas descritas nas fases a seguir:

4.10.1. Fase 1: Concordância total de reatividade

Desenvolvemos a análise de concordância total de reatividade entre os diferentes substratos, a partir das normas da concordância estabelecidas na seção 1, onde havia a possibilidade de resultado concordante total ($X = Y = Z = W$) e resultado discordante ($X \neq Y = Z = W$ ou $X = Y \neq Z = W$). E assim, foi estabelecida a frequência percentual de concordância intra-amostra de acordo com a concordância de reatividade global e por compartimento

celular, com e sem a diferenciação entre os grupos clínicos nas quatro marcas de lâminas HEp-2.

Essa forma de avaliação de concordância total é bastante rigorosa, pois somente amostras reagentes de forma igualitária nas quatro lâminas foram consideradas concordantes e a ocorrência de discordância em pelo menos uma lâmina seria taxativa de um resultado discordante. Por este motivo desenvolvemos um escore de concordância de reatividade, de forma a registrar graus intermediários de concordância, conforme disposto na seção abaixo.

4.10.2. Fase 2: Escore ponderado de concordância de reatividade

Notamos que havia três classes possíveis de concordância para cada amostra: **4x4**, onde todas as lâminas apresentam o resultado reagente; **3x1** que se bifurca em duas possibilidades distintas, podendo apresentar três resultados reagentes contra um não reagente ou vice-versa; ou ainda a possibilidade **2x2**, no qual havia resultados reagentes em uma dupla de lâminas, e resultado não reagente na outra dupla. Com a finalidade de mensurar este fenômeno, desenvolvemos um escore ponderado de concordância a partir das possibilidades de concordância de reatividade (reagente versus não reagente) nas quatro lâminas analisadas. **Para fins de composição de um índice matemático, essas três classes de concordância receberam pesos proporcionais: 100, 75 e 50, respectivamente (Quadro 2).**

Quadro 2 - Classes de concordância de reatividade de amostras em quatro lâminas de HEp-2

Possibilidades de reatividade em cada lâmina HEp-2				Combinações e classes de concordância	Escore de concordância
Lâmina X	Lâmina Y	Lâmina Z	Lâmina W		
Reagente	Reagente	Reagente	Reagente	4x4	100
Reagente	Reagente	Reagente	Não Reagente	3 x 1	75
Reagente	Reagente	Não Reagente	Não Reagente	2 x 2	50

Combinação 4x4: todas as lâminas apresentam o resultado reagente; Combinação 3x1: duas possibilidades distintas, podendo apresentar três resultados reagentes contra um não reagente ou vice-versa; Combinação 2x2: resultados reagentes em uma dupla de lâminas, e resultado não reagente na outra dupla. Escore de concordância: As combinações de concordância 4x4; 3x1 e 2x2 receberam pesos proporcionais: 100, 75 e 50, respectivamente.

Uma vez estabelecido o escore de concordância das amostras, é possível determinar o comportamento de grupos de amostras de interesse, por exemplo, amostras de pacientes com DAI, DNAI e DS. O escore de concordância observado em cada amostra representa o peso desta amostra no cálculo ponderado de reatividade de um determinado grupo de amostras, por exemplo, quando comparando amostras dos três grupos clínicos. Assim, para o cálculo do escore ponderado de concordância das amostras de um determinado grupo clínico, o número de amostras com concordância **4x4** é multiplicado por **100**, o número de amostras com concordância classe **3x1** é multiplicado por **75**, e o número de amostras com concordância **2x2** é multiplicado por **50**. A soma desses subtotais é dividida pelo número total de amostras do grupo clínico em questão, resultando o escore ponderado deste grupo. Em outras palavras, o escore ponderado é a média ponderada de todas as amostras de cada grupo e reflete o comportamento consolidado de cada grupo de amostras. **Por definição matemática, os escores ponderados variam em uma escala linear e contínua de cinquenta a cem (50-100)**. Um exemplo é apresentado no **quadro 3**.

Este processo foi igualmente aplicado para a análise de concordância na reatividade global e para análise de concordância na reatividade por compartimento celular.

Quadro 3 - Exemplo prático da elaboração e cálculo do escore ponderado de concordância de reatividade

155 amostras com concordância 4x4 (peso 100)	34 amostras com concordância 3x1 (peso75)	26 amostras com concordância 2x2 (peso 50)
$155 * 100 = 15.500$	$34 * 75 = 2.520$	$26 * 50 = 1.300$
Número total de amostras neste grupo clínico = 215		
Escore ponderado de reatividade = $19.320 / 215 = 89,86$		

O número de amostras com concordância 4x4 (155) foi multiplicado por 100, o número de amostras com concordância classe 3x1 (34) foi multiplicado por 75, e o número de amostras com concordância 2x2(26) foi multiplicado por 50. A soma desses subtotais (**19.320**) foi dividida pelo número total de amostras do grupo clínico (215) em questão, resultando o escore ponderado deste grupo (**89,86**). Obs: Exemplo extraído do grupo DAI (vide adiante).

Arbitrariamente, estabelecemos quatro categorias de concordância de reatividade de acordo com o escore ponderado: pobre (entre 50 a 62,5), regular (entre 62,6 e75), satisfatória (entre 75,1 e 87,5) e excelente (entre 87,6 e 100) (**Quadro 4**).

Quadro 4 - Classes de concordância de reatividade de acordo com o escore ponderado de concordância

Escore ponderado	Classificação
50-62,5	Pobre
62,6-75	Regular
75,1-87,5	Satisfatória
87,6-100	Excelente

Escore ponderado obtido a partir número de amostras com concordância 4x4 multiplicado por 100, o número de amostras com concordância classe 3x1 multiplicado por 75, e o número de amostras com concordância 2x2 multiplicado por 50. A soma desses subtotais foi dividida pelo número total de amostras em questão.

4.11. Análise da reatividade de acordo com a intensidade de fluorescência em diferentes marcas de lâminas HEp-2

A pesquisa de autoanticorpos em células HEp-2 é um teste de triagem que pode ser avaliado de forma semi-quantitativa por diluição seriada a partir de 1/80⁽⁵⁸⁾. Outra forma de se avaliar a intensidade da reatividade é atribuir graus em uma escala visual de intensidade à reação com amostra 1/80⁽⁵⁹⁾. No presente estudo, a intensidade da fluorescência de cada amostra reagente foi estimada em quatro graus pelo sistema de cruces, como discriminado no **Quadro 5**.

Quadro 5 - Classificação semi-quantitativa da intensidade de fluorescência

Intensidade de Fluorescência	Descrição
Fluorescência Duvidosa	Fluorescência questionavelmente verde, de observação dúbia (entre negativo a positiva 1+) foram consideradas negativas.
Reagente 1+ (+/4)	Fluorescência verde específica mínima capaz de permitir coloração definida dos compartimentos celulares claramente distintas da coloração de fundo.
Reagente 2+ (++/4)	Fluorescência verde e específica dos compartimentos celulares de forma nítida e de moderada intensidade.
Reagente 3+ (+++/4)	Fluorescência viva verde-maçã de intensidade média para alta
Reagente 4+ (++++/4)	Fluorescência verde-maçã brilhante de alta intensidade.

Em virtude da subjetividade na observação da intensidade de fluorescência, amostras de positividade 1+ em um determinado substrato, que apresentaram não-reatividade ou intensidade duvidosa nos outros três substratos, foram consideradas concordantes negativos nas análises de concordância não relacionadas especificamente à concordância na intensidade.

4.11.1. Caracterização da concordância em intensidade de fluorescência por compartimento celular entre os grupos clínicos.

Para determinar as concordâncias em distintos níveis de intensidade de fluorescência, observamos a reatividade a cada compartimento celular em amostras dos diferentes grupos clínicos, atribuindo a classificação **semi-quantitativa intensidade de fluorescência**. A análise de concordância de intensidade entre as quatro marcas de lâminas assumiu o valor de maior intensidade entre os quatro substratos (**Quadro 6**), isto é, a maior intensidade apresentada entre as marcas comerciais de lâminas HEp-2, foi tratada como valor nominal para cada amostra. As amostras com resultados iguais ao valor nominal foram consideradas concordantes (CONC) e as diferentes combinações foram classificadas como discordantes (DISC).

Quadro 6 - Exemplos de possibilidades de concordância na intensidade de fluorescência entre os substratos IFI-HEp-2

Marcas de lâminas				Classificação	
X	Y	Z	W	*Intensidade assumida	**Concordância
1+	4+	2+	3+	4+	DISC
4+	4+	4+	4+	4+	CONC

*A intensidade de fluorescência assumida entre as quatro marcas de lâminas foi determinada pelo valor de maior intensidade entre as marcas comerciais de lâminas HEp-2. **A concordância de intensidade de fluorescência foi estabelecida através da comparação do grau de intensidade entre os quatro substratos a partir da intensidade de fluorescência assumida.

Para descrever qual seria a contribuição da intensidade de fluorescência no possível fenômeno da não reprodutibilidade, exclusivamente para esta análise, as amostras com intensidade 1+ em apenas uma marca de lâmina e negativa nas demais, foram reintegradas ao estudo (**Quadro 7**).

Quadro 7 - Número de amostras consideradas reagentes por compartimento celular para a análise de concordância na intensidade de imunofluorescência

Grupo Clínico	Compartimento celular				
	Núcleo	Nucléolo	Placa	Citoplasma	Ap. mitótico
DAI (n= 256)	234	29	136	93	4
DNAI (n=201)	153	24	46	54	9
DS (n=212)	202	14	32	15	5

Número total de amostras reagentes em pelo menos uma das marcas de lâminas, sem a exclusão de amostras dúbias.

4.12. Análise da robustez dos padrões morfológicos IFI-HEp-2

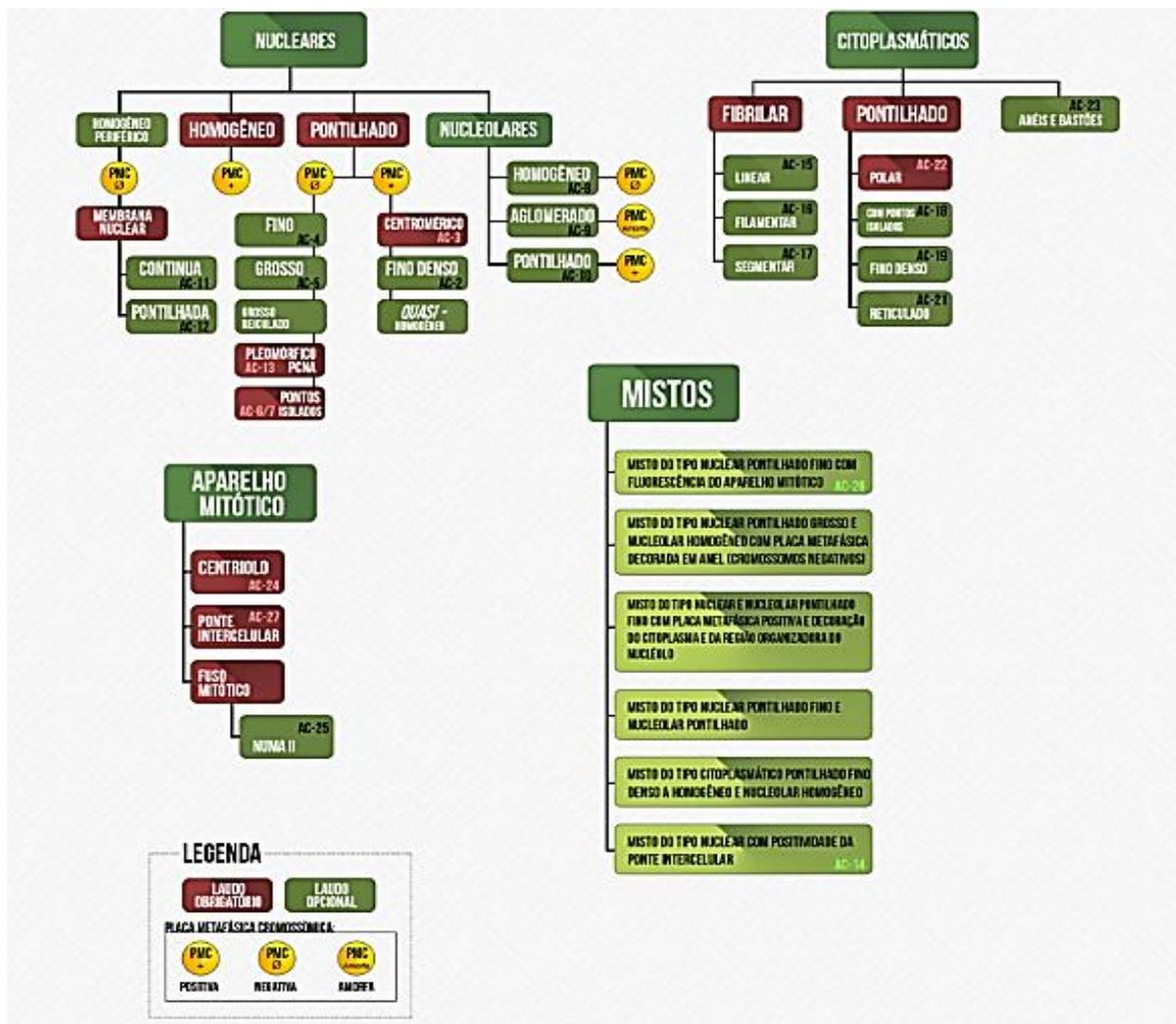
Os diferentes padrões morfológicos de IFI-HEp-2 são fruto do reconhecimento dos autoantígenos distribuídos topograficamente ao longo dos diversos compartimentos da célula HEp-2. Considerando-se possíveis variações na conservação antigênica das diversas moléculas nos diversos compartimentos celulares, é possível que alguns padrões sejam mais robustos e outros mais suscetíveis aos efeitos dos métodos de fabricação das lâminas HEp-2, o que afetaria diferentemente a reprodutibilidade dos padrões em diferentes marcas de lâminas HEp-2. Nesta seção avaliaremos a reprodutibilidade de cada padrão HEp-2 em diferentes marcas de lâminas HEp-2.

Os padrões morfológicos de IFI- HEp-2 identificados neste estudo seguiram os critérios do Consenso Brasileiro para pesquisa de autoanticorpos e do *International Consensus on ANA Patterns (ICAP)* (**Figura 6**), que atribuem códigos alfanuméricos (AC-0 a AC-29) para cada padrão. Durante a rotina de leitura de IFI-HEp-2 é comum o encontro de padrões que não se encaixam na árvore de classificação de ambos os consensos. Estes padrões foram devidamente nomeados e receberam o código AC-XX, de acordo com a recomendação do ICAP.

A avaliação de concordância entre os padrões morfológicos nucleares e citoplasmáticos obedeceu a critérios semelhantes aos adotados na análise da concordância de reatividade, porém com pesos diferentes em função do maior número de possibilidades de

combinações de resultados para os padrões. Assim, um determinado padrão poderia ser identificado em todas as lâminas ($X = Y = Z = W$), em três lâminas ($X \neq Y = Z = W$), em duas lâminas ($X \neq Y \neq Z = W$) ou apenas em uma única lâmina ($X \neq Y \neq Z \neq W$). Para expressar matematicamente essas possibilidades, nós atribuímos pesos proporcionais em uma escala de **1 a 100**. A total ausência de concordância entre as quatro lâminas ocorreu quando cada lâmina apresentou um padrão distinto das demais, recebendo **peso 1**; a concordância de um mesmo padrão em apenas duas marcas de lâmina recebeu **peso 33**; a concordância de um mesmo padrão em três marcas de lâmina recebeu **peso 67**; por fim, a concordância de um mesmo padrão nas quatro marcas de lâmina teve o **peso 100**. Esta distribuição de pesos contempla, de forma proporcional, as quatro classes sucessivas de concordância em uma escala de **1 a 100**, conforme explicitado nos **Quadros 8 e 9**.

Figura 6 - Árvore de Classificação do Consenso Brasileiro para pesquisa de autoanticorpos harmonizada para os padrões classificados pelo International Consensus on ANA Patterns – ICAP⁽⁶⁴⁾



4.12.1 Robustez dos padrões de imunofluorescência

Conceituamos robustez dos padrões de imunofluorescência como a característica de reprodutibilidade em diversos substratos de células HEP-2. Para mensurar essa dimensão, criamos o escore de robustez, que procura expressar matematicamente quão reprodutíveis são os padrões IFI-HEP-2 nas lâminas em estudo. O escore de robustez foi calculado pela média ponderada relativa à ocorrência de cada padrão nas diversas amostras.

Quadro 8 - Possibilidade de concordâncias de padrões morfológicos IFI-HEP-2

Ocorrência do padrão hipotético P1 nas diferentes marcas de lâminas HEP-2				Concordância em relação ao padrão P1*	
X	Y	Z	W	Grau de concordância	Peso
P1	P1	P1	P1	Concordância total (4x4)	100
P1	P1	P1	P2	Concordância parcial (3x4)	67
P1	P1	P2	P2	Discordância parcial (2x4)	33
P1	P1	P2	P3	Discordância parcial (2x4)	33
P1	P2	P3	P4	Discordância total (1x4)	1

P1: Padrão morfológico 1; P2: Padrão morfológico 2; P3: Padrão morfológico 3; P4: Padrão morfológico 4. * O mesmo método seria aplicável para os padrões P2, P3 e P4, resultando distintos graus de concordância e escores ponderados.

Arbitrariamente, classificamos a robustez dos padrões de imunofluorescência como **pobre (escore de 1 a 25)**, **regular (escore de 25,1 a 50)**, **satisfatória (escore de 50,1 a 75)** e **excelente (escore de 75,1 a 100)** como pode ser observado no **Quadro 9**.

Quadro 9 -Classes de robustez dos padrões morfológicos IFI-HEp-2

Escore de robustez	Classificação
1-25	Pobre
25,1-50,0	Regular
50,1-75,0	Satisfatória
75,1-100	Excelente

Escore ponderado obtido a partir número de padrões morfológicos com concordância total (4x4) multiplicado por 100, o número de padrões morfológicos com concordância parcial (3x4) multiplicado por 67, o número de padrões morfológicos com discordância parcial (2x4) multiplicado por 33 e o número de padrões morfológicos com discordância parcial (1x4) multiplicado por 1. A soma desses subtotais foi dividida pelo número total de amostras em questão.

4.13. Caracterização da reprodutibilidade de padrões morfológicos no teste IFI-HEp-2 em diferentes substratos em função de outras variáveis

Esta seção busca sistematizar o fenômeno da não reprodutibilidade de padrões morfológicos no teste IFI-HEp-2 em diferentes substratos sob diferentes pontos de vista, como a natureza clínica das amostras e o grau de intensidade da reatividade IFI-HEp-2.

4.12.1. Reprodutibilidade de padrões morfológicos no teste IFI-HEp-2 de acordo com a intensidade de imunofluorescência das amostras

Nesta análise procuramos verificar como o fenômeno de não reprodutibilidade do teste IFI-HEp-2 se comporta em amostras com distinta intensidade de imunofluorescência. Para atingirmos este objetivo, comparamos os diferentes índices de concordância entre amostras de baixa intensidade versus alta intensidade de imunofluorescência. Assim, procedemos à análise de robustez dos padrões morfológicos de IFI-HEp-2 frente à intensidade de imunofluorescência. Nesta seção e para fins operacionais, a intensidade de imunofluorescência foi classificada em duas categorias, de forma que as intensidades +/4 e ++/4 foram denominadas de baixa intensidade, enquanto as amostras com intensidade +++/4 e ++++/4 foram classificadas como de alta intensidade.

4.12.2. Reprodutibilidade de padrões morfológicos no teste IFI-HEp-2 em diferentes substratos de acordo com o grupo clínico das amostras

O principal intuito desta análise foi verificar se o fenômeno de não reprodutibilidade do teste IFI-HEp-2 ocorre de forma semelhante ou distinta na dependência da natureza clínica das amostras. Para atingirmos este objetivo, comparamos os diferentes índices de concordância entre amostras de pacientes autoimunes, de pacientes não-autoimunes e de doadores sadios.

4.12.3. Identificação de padrões com tendência a maior representatividade nas ocorrências de concordância subtotal

Para esta seção utilizamos as categorias de intensidade baixa e alta conforme explicado no tópico anterior. Ademais, fizemos uma análise específica dos casos de concordância subtotal (3x4) em que um mesmo padrão era observado em três das quatro lâminas. Em tais casos, buscamos averiguar quais os padrões divergentes mais frequentemente envolvidos, ou seja, qual o padrão que divergia do padrão dominante. Ademais, procuramos determinar o impacto da intensidade de imunofluorescência sobre o fenômeno da concordância subtotal.

4.14. Cálculo estatístico

4.13.1. Coeficiente Kappa - Nível de concordância

Para a descrição da concordância entre os substratos, utilizamos a medida Kappa baseada no número de respostas iguais entre os substratos. O índice de concordância de Kappa tem como valor máximo 1, que representa total concordância. Valores próximos a 0 indicam baixa concordância(**Quadro 10**).

O Coeficiente Kappa foi utilizado nas seguintes análises:

- Concordância da reatividade global;
- Concordância entre pares de marcas de lâminas em relação à reatividade em cada compartimento celular.

Quadro 10. Interpretação dos valores do Coeficiente Kappa ⁽⁶¹⁾

Valores de Kappa	Interpretação
0	Nenhuma concordância
0-0,19	Concordância pobre
0,20-0,39	Concordância sofrível
0,40-0,59	Concordância moderada
0,60-0,79	Concordância substancial
0,80-1,00	Concordância quase perfeita

4.13.2. Teste Q de Cochran

O teste não paramétrico Q de Cochran avaliou a homogeneidade de variâncias com delineamento aleatorizado em blocos, tendo sido aplicado nas seguintes análises:

- Distribuição das amostras reagentes de acordo com a concordância de reatividade em cada par de marcas de lâminas HEp-2 em cada compartimento celular em dois cenários distintos (com e sem a lâmina C).
- Distribuição das amostras reagentes em cada compartimento celular de acordo com a reatividade em cada marca de lâminas HEp-2.

4.13.3. Teste do *Qui-quadrado* e Teste Exato de Fisher

Os testes não paramétricos *Qui-quadrado* Exato de Fisher foram empregados em variáveis categóricas para comparar proporções e possíveis divergências entre as frequências observadas e esperadas em:

- Frequência de amostras reagentes apresentando concordância total com relação à reatividade global e por compartimento celular nos diferentes grupos clínicos;
- Frequência dos padrões morfológicos por grupo clínico nos quatro substratos de lâmina HEp-2;
- Frequência de padrões discordantes no universo de concordâncias subtotal (3/4).

4.13.4. Teste de Kruskal Wallis

Para comparar variáveis semi-quantitativas ou quantitativas em três ou mais amostras utilizamos este teste não paramétrico nas seguintes situações:

- Distribuição das amostras reagentes de acordo com o grau de concordância de reatividade global por grupo clínico;
- Análise do grau de concordância de reatividade global e por compartimento entre os grupos clínicos.

4.13.5. Análise da Binomial

Para as análises de repetições independentes com a mesma probabilidade de ocorrência, foi aplicado o teste binomial de probabilidades discretas nos seguintes experimentos:

- Reprodutibilidade de padrões IFI-HEp-2 em diferentes substratos em função do grau de intensidade;
- Distribuição da intensidade de fluorescência em amostras que apresentaram concordância subtotal.

Todos os dados foram analisados no software SPSS 20.0. O nível de inferência estatística foi estabelecido em 0,05, considerando-se significantes valores de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

Das 900 amostras originalmente selecionadas, 32 (3,5%) não foram processadas nas quatro marcas de lâminas em virtude de baixo volume ou mal estado de conservação. Destas 32 amostras, 25 pertenciam ao grupo DAI (10 amostras de CBP, 7 amostras de HAI-1, 5 amostras de LES, 2 amostras de ES e 1 amostra de SSj) e 7 amostras eram do grupo DNAI (4 amostras de Neoplasia, 1 amostra de Hepatite C, 1 amostra de paciente psiquiátrico e 1 amostra de paciente com HAS). Deste modo, nossa amostragem final foi composta por 868 para a comparação de resultados obtidos nas quatro marcas de lâminas HEp-2.

5.1. Reatividade global das amostras usando distintas marcas de lâminas HEp-2

Nesta primeira seção, será analisada a reatividade global em cada marca de lâmina HEp-2 nos três grupos de indivíduos em relação às outras três marcas. Lembramos que reatividade global foi definida como **a presença de reatividade contra qualquer domínio celular**.

Conforme definido em Material e Métodos, as amostras foram consideradas reagentes quando apresentaram reatividade em qualquer um dos compartimentos celulares em pelo menos uma marca de lâmina HEp-2. Como observado na **Tabela 1**, houve diferença estatisticamente significativa na frequência de reatividade global das amostras nas quatro marcas de lâminas avaliadas, sendo a marca Z a que mais apresentou resultados positivos e a marca Y a que apresentou menor frequência de reatividade.

Tabela 1 - Distribuição de todas as amostras de acordo com a reatividade global em cada marca de lâmina HEp-2

	Marca de lâmina HEp-2								p
	X		Y		Z		W		
	N	%	N	%	N	%	N	%	
Reatividade	868	100,00%	868	100,00%	868	100,00%	868	100,00%	
REA	358	41,20%	309	35,60%	411	47,40%	365	42,10%	<0,001
NR	510	58,80%	559	64,40%	457	52,60%	503	57,90%	

REA – reagente; NR – Não reagente; p - Nível descritivo do teste de Qui-Quadrado

As amostras de soro que se mostraram não reagentes nas quatro lâminas (n=402) foram interpretadas como não tendo níveis relevantes de autoanticorpos passíveis de detecção no teste IFI-HEp-2, sendo, portanto, excluídas das análises subsequentes. Assim, todas as análises a seguir contarão com as 466 amostras que apresentaram alguma reatividade em pelo menos uma marca de lâmina HEp-2, sendo 238 de DAI, 119 de DNAI e 109 de DS. Para maior clareza, ao longo do texto estas serão denominadas **amostras reagentes**, pois apresentaram reatividade em pelo menos uma das marcas de HEp-2.

Tabela 2 - Distribuição das amostras reagentes de cada grupo clínico de acordo com a reatividade global em cada lâmina HEp-2

Grupo Clínico	Reatividade global	Marcas de lâmina HEp-2				P
		X	Y	Z	W	
DAI	REA	221(92,9%)	214(89,9%)	225(94,5%)	216(90,8%)	0,108
	NR	17 (7,1%)	24 (10,1%)	13(5,5%)	22(9,2%)	
	Total	238	238	238	238	
DNAI	REA	63(52,9%)	56(47,1%)	93(78,2%)	76(63,9%)	<0,001
	NR	56(47,1%)	63(52,9%)	26(21,8%)	43 (36,1%)	
	Total	119	119	119	119	
DS	REA	74(67,9%)	39 (35,8%)	102 (93,6 %)	73 (67,0%)	<0,001
	NR	35(32,1%)	70 (64,2%)	7 (6,4%)	36 (33,0%)	
	Total	109	109	109	109	

REA – reagente; NR – Não reagente; DAI– doenças autoimunes; DNAI– doenças não autoimunes; DS– doadores de sangue; p-nível descritivo do teste Q de Cochran.

Conforme mostra a **Tabela 2**, houve maior frequência de resultados reagentes com as amostras do grupo DAI, que também apresentaram maior semelhança na proporção de amostras reagentes nas quatro marcas de lâminas (89,9% a 94,5%), não havendo diferença estatisticamente significativa na frequência de reatividade entre as lâminas HEp-2 estudadas. Por outro lado, a proporção de amostras reagentes nas quatro marcas de lâminas variou acentuadamente nos grupos DNAI (47,1% a 78,2%) e DS (35,8% a 93,6%). Este resultado indica maior consistência na reatividade observada em amostras do grupo DAI. A **Tabela 2** assinala também que a lâmina Y apresentou menores proporções de resultados positivos em

todos os grupos ao passo que a lâmina Z apresentou maiores proporções de resultados positivos em todos os grupos.

5.2. Análise da reatividade entre pares de marcas de lâminas HEp-2

5.2.1 Análise da reatividade global

Buscamos verificar se o fenômeno de não reprodutibilidade da reatividade global IFI-HEp-2 atinge igualmente todas as marcas de lâminas HEp-2 analisadas ou se alguma marca apresenta maior discordância em relação às demais. Para responder a esta questão, avaliamos as concordâncias entre os pares de lâminas, utilizando o índice Kappa que nos fornece uma ideia do quanto às taxas de concordância observadas entre cada par se afastam da concordância esperada ao acaso. Para melhor apreciação dos resultados, lembramos que o grau de concordância pode ser estratificado de acordo com o índice Kappa em excelente (0,8 a 1,0), bom (0,6 a 0,79), regular (0,4 a 0,59), sofrível (0,2 a 0,39) e pobre (0 a 0,19) (65).

A **Tabela 3** mostra os índices de concordância de reatividade global entre pares de lâminas para todas as amostras reagentes nos três grupos clínicos agregados, enquanto as **Tabelas de 4 a 6** mostram os índices de concordância relativos às amostras reagentes de cada grupo clínico separadamente. Em todas essas análises, observa-se que os valores de Kappa variaram consideravelmente conforme os pares de lâminas analisados. De forma geral, os menores valores de Kappa foram observados nos pares envolvendo a lâmina C. Ademais, observou-se que os valores de Kappa foram maiores com amostras do grupo DAI que aqueles obtidos com amostras dos grupos DNAI e DS. De fato, o valor do índice Kappa global, considerando as comparações de todos os pares de lâminas, foi de 0,30 para o grupo DAI, 0,13 para o grupo DNAI e 0,09 para o grupo DS. Esses dados novamente apontam para maior consistência de reatividade em amostras do grupo DAI em relação aos grupos DNAI e DS.

Em suma, a análise de concordância na reatividade global indica variação considerável entre pares de lâminas, variando de concordância boa a pobre, destacando-se a lâmina C como fonte predominante de discordância. Ademais, destacam-se as amostras dos grupos DNAI e DS que apresentam maior discordância que as amostras do grupo DAI.

Tabela 3 - Análise de concordância de reatividade global em pares de lâminas HEp-2 considerando-se todas as amostras reagentes

	Concordância observada	Concordância aleatória	Kappa	Erro Padrão	p
X x Y	78,7%	58,7%	0,48	0,44	<0,001
X x Z	73,3%	71,5%	0,06	0,04	<0,001
X x W	77,4%	65,2%	0,35	0,04	<0,001
Y X Z	67,6%	63,0%	0,12	0,03	<0,001
Y x W	75,9%	59,2%	0,68	0,41	<0,001
Z x W	74,9%	72,3%	0,07	0,04	<0,001

As amostras foram classificadas como reagentes quando observada reatividade em qualquer compartimento celular em qualquer um dos substratos. Avaliamos as concordâncias entre os pares de lâminas, utilizando o nível de concordância calculado pelo coeficiente Kappa.

Tabela 4 - Análise de concordância de reatividade global em pares de lâminas HEp-2 considerando-se as amostras reagentes do grupo de doenças autoimunes

	Concordância observada	Concordância aleatória	Kappa	Erro Padrão	p
X x Y	91,1%	84,2%	0,44	0,06	<0,001
X x Z	89,9%	88,1%	0,15	0,06	<0,001
X x W	87,8%	84,9%	0,19	0,06	<0,001
Y x Z	92,7%	85,5%	0,50	0,06	<0,001
Y x W	90,7%	82,5%	0,47	0,06	<0,001
Z x W	86,9%	86,3%	0,04	0,06	<0,001

As amostras foram classificadas como reagentes quando observada reatividade em qualquer compartimento celular em qualquer um dos substratos. Avaliamos as concordâncias entre os pares de lâminas, utilizando o nível de concordância calculado pelo coeficiente Kappa.

Tabela 5 - Análise de concordância de reatividade global em pares de lâminas HEp-2 considerando-se as amostras reagentes do grupo de doenças não autoimunes

	Concordância observada	Concordância aleatória	Kappa	Erro Padrão	p
X x Y	73,9%	49,8%	0,48	0,09	<0,001
X x Z	51,2%	51,6%	0,00	0,07	0,541
X x W	65,5%	50,8%	0,29	0,08	<0,001
Y x Z	43,7 %	48,3%	-0,09	0,07	0,890
Y x W	63,0%	49,1%	0,27	0,08	<0,001
Z x W	53,7%	57,8%	-0,09	0,08	0,806

As amostras foram classificadas como reagentes quando observada reatividade em qualquer compartimento celular em qualquer um dos substratos. Avaliamos as concordâncias entre os pares de lâminas, utilizando o nível de concordância calculado pelo coeficiente Kappa.

Tabela 6 - Análise de concordância de reatividade global em pares de lâminas HEp-2 considerando-se as amostras reagentes do grupo de doadores de sangue

	Concordância observada	Concordância aleatória	Kappa	Erro Padrão	p
X x Y	56,8%	44,9%	0,21	0,07	<0,001
X x Z	61,4%	65,5%	-0,11	0,06	0,970
X x W	67,8%	56,0%	0,26	0,09	<0,001
Y x Z	40,3%	37,6%	0,04	0,03	<0,001
Y x W	57,8%	45,1%	0,23	0,23	<0,001
Z x W	71,5%	64,7%	0,19	0,06	<0,001

As amostras foram classificadas como reagentes quando observada reatividade em qualquer compartimento celular em qualquer um dos substratos. Avaliamos as concordâncias entre os pares de lâminas, utilizando o nível de concordância calculado pelo coeficiente Kappa.

A seguir, aprofundamos a análise sobre a discordância da lâmina Z em relação às demais. Para tanto, realizamos uma análise pareada de concordância 2 a 2 comparando as marcas, agora com relação à reatividade em cada compartimento celular. Nesta avaliação, somente o compartimento aparelho mitótico não sofreu com o fenômeno de não reprodutibilidade. Corroborando as observações anteriores sobre a reatividade global (Tabelas 1 e 2), temos que a marca Z se distingue das demais por apresentar maior taxa de amostras reagentes nos vários compartimentos celulares. A análise da Tabela 7 evidencia que os pares contendo a marca Z apresentaram menor frequência de concordância. Portanto, decidimos fazer a análise estatística da concordância das lâminas em dois cenários, com e sem

a marca Z, respectivamente. Nesta análise diferenciada, verificamos que as marcas X, Y e W apresentam comportamento mais harmonioso, não apresentando discordância significativa em relação à reatividade nos compartimentos nuclear, nucleolar e aparelho mitótico. Isto contrasta com o cenário contando com a marca Z, no qual houve diferença estatisticamente significativa na frequência de reatividade contra cada um dos compartimentos celulares, exceto no aparelho mitótico cuja frequência de casos positivos era muito baixa. Esta tendência foi corroborada pela análise de concordância Kappa comparando as lâminas 2 x 2, em que as comparações envolvendo a lâmina Z tenderam a apresentar menores valores de Kappa (Tabela 8).

Tabela 7 - Distribuição das amostras reagentes de acordo com a concordância de reatividade em cada par de marcas de lâminas HEP-2 em cada compartimento celular

COMPARTIMENTO CELULAR	CONCORDÂNCIA ENTRE PARES DE LÂMINAS						Cenários com e sem marca Z	
	X x Y	X x Z	X x W	Y x Z	Y x W	Z x W	X x Y x Z x W	X x Y x W
	N (%)*	N (%)*	N (%)*	N (%)*	N (%)*	N (%)*	p	
Núcleo	365 (78,3%)	350 (75,1%)	373 (80,0%)	317 (68,0%)	364 (78,1%)	371 (79,6%)	<0,001	0,611
Nucléolo	454 (97,4%)	437 (93,8%)	456 (97,9%)	445 (95,5%)	456 (97,9%)	439 (94,2%)	<0,001	0,779
Placa metafásica	425 (91,2%)	368 (79,0%)	399 (85,6%)	387 (83,0%)	410 (88,0%)	389 (83,5%)	<0,001	0,002
Citoplasma	434 (93,1%)	417 (89,5%)	415 (89,1%)	421 (90,3%)	425 (91,2%)	410 (88,0%)	0,013	0,013
Aparelho mitótico	463 (99,4%)	465 (99,8%)	465 (99,8%)	462 (99,1%)	462 (99,1%)	464 (99,6%)	0,275	0,174

* N = número total de amostras reagentes em pelo menos uma das marcas do par de lâminas analisadas; (%) = porcentagem de amostras concordantes em cada par de lâminas; p: nível descritivo teste *Q* de Cochran

Tabela 8 - Índice Kappa de concordância de reatividade em cada par de marcas de lâminas HEp-2 em cada compartimento celular

Pares de lâminas	Núcleo		Nucléolo		Placa		Citoplasma		Aparelho	
	Kappa	p	Kappa	p	Kappa	p	Kappa	p	Kappa	p
X x Y	0,55	<0,001	0,48	<0,001	0,73	<0,001	0,74	<0,001	0,56	<0,001
X x Z	0,42	<0,001	0,33	<0,001	0,47	<0,001	0,61	<0,001	0,88	<0,001
X x W	0,55	<0,001	0,57	<0,001	0,61	<0,001	0,53	<0,001	0,88	<0,001
Y x Z	0,32	<0,001	0,53	<0,001	0,59	<0,001	0,65	<0,001	0,49	<0,001
Y x W	0,54	<0,001	0,60	<0,001	0,69	<0,001	0,63	<0,001	0,49	<0,001
Z x W	0,49	<0,001	0,40	<0,001	0,62	<0,001	0,51	<0,001	0,79	<0,001

As amostras foram classificadas como reagentes quando observada reatividade em qualquer compartimento celular em qualquer um dos substratos. Avaliamos as concordâncias entre os pares de lâminas, utilizando o nível de concordância calculado pelo coeficiente Kappa.

5.2.2 Análise da reatividade por compartimento celular

Para as próximas avaliações, à semelhança da estratégia adotada para a reatividade global, as amostras negativas para um mesmo compartimento celular nas quatro marcas de lâminas HEp-2 não foram incluídas na análise daquele compartimento celular. Esta decisão baseou-se na conjectura de que tais amostras não teriam autoanticorpos para aquele compartimento celular detectáveis por IFI-HEp-2. Por outro lado, aquelas que apresentaram reatividade para determinado domínio celular em pelo menos uma marca de lâmina HEp-2 foram denominadas amostras reagentes para aquele compartimento, e assim consideradas para as próximas análises. Portanto, nesta análise foram consideradas 403 amostras reagentes para o compartimento nuclear, 39 amostras reagentes para o compartimento nucleolar, 193 amostras reagentes para a placa metafásica, 118 amostras reagentes para o compartimento citoplasmático e 7 amostras reagentes para o aparelho mitótico (**Tabela 9**).

Os resultados de concordância de reatividade por compartimento celular foram semelhantes aos obtidos na análise da reatividade global. Todos os compartimentos celulares sofreram com a variabilidade de resultados de maneira igualitária, havendo uma tendência de maior frequência de resultados positivos com a lâmina Z e menor frequência com a lâmina Y.

Tabela 9 - Distribuição das amostras reagentes em cada compartimento celular de acordo com a reatividade em cada marca de lâminas HEP-2

Compartimento	Marcas de lâminas HEP-2								p
	X		Y		Z		W		
	N	%	N	%	N	%	N	%	
Núcleo	403	100	403	100	403	100	403	100	
REA	296	73,4	259	64,3	354	87,8	323	80,1	<0,001
NR	107	26,6	144	35,7	49	12,2	80	19,9	
Nucléolo	39	100	39	100	39	100	39	100	
REA	11	28,2	13	33,3	34	87,2	13	33,3	<0,001
NR	28	71,8	26	66,7	5	12,8	26	66,7	
Placa metafásica	193	100	193	100	193	100	193	100	
REA	88	45,4	109	56,2	160	82,5	137	70,6	0,001
NR	105	54,6	84	43,8	33	17,5	56	29,4	
Citoplasma	118	100	118	100	118	100	118	100	
REA	74	62,7	76	64,4	79	66,9	55	46,6	<0,001
NR	44	37,3	42	35,6	39	33,1	63	53,4	
Ap. mitótico	7	100	7	100	7	100	7	100	
REA	4	57,1	3	42,9	5	71,4	5	71,4	0,532
NR	3	42,9	4	57,1	2	28,6	2	28,6	

* N = número total de amostras reagentes no compartimento celular sob análise em pelo menos uma das marcas de lâminas analisadas; (%) = porcentagem de amostras concordantes em cada par de lâminas; p:nível descritivo teste Q de Cochran

Como se pode ver à **Tabela 10**, os níveis Kappa de concordância entre os pares de lâminas variaram entre concordância boa a pobre. Os níveis mais baixos de Kappa ocorreram nos pares envolvendo a marca Z.

Tabela 10. Índice Kappa de concordância entre pares de marcas de lâminas em relação à reatividade em cada compartimento celular

Pares de lâminas	Núcleo		Nucléolo		Placa		Citoplasma		Ap. mitótico	
	Kappa	P	Kappa	p	Kappa	p	Kappa	p	Kappa	p
X x Y	0,42	<0,001	0,28	0,078	0,58	<0,001	0,41	<0,001	0,16	0,659
X x Z	0,10	0,016	-0,12	0,091	0,04	0,358	0,09	0,320	0,69	0,053
X x W	0,35	<0,001	0,40	0,012	0,33	<0,001	0,15	0,085	0,69	0,053
Y x Z	0,05	0,153	0,13	0,090	0,11	0,052	0,15	0,092	-0,07	0,809
Y x W	0,38	<0,001	0,42	0,008	0,39	<0,001	0,31	<0,001	-0,07	0,809
Z x W	0,13	0,005	-0,11	0,176	-0,08	<0,215	0,07	<0,393	0,30	0,427

As amostras foram classificadas como reagentes quando observada reatividade no compartimento celular específico em pelo menos um dos substratos. Avaliamos as concordâncias entre os pares de lâminas, utilizando o nível de concordância calculado pelo coeficiente Kappa.

Assim como observado para a reatividade global, esta análise pareada indica concordância razoável na reatividade por compartimento celular entre as marcas X, Y e W, enquanto a marca Z apresentou maior frequência de reatividade que as demais, especialmente nos grupos DS e DNAI. Isto foi observado para todos os compartimentos celulares, menos para o aparelho mitótico, provavelmente em função do exíguo tamanho amostral.

5.3. Concordância intra-amostra da reatividade em diferentes marcas de lâminas HEp-2

Nas seções anteriores, nós focalizamos o comportamento das marcas de lâminas em relação à concordância de reatividade nos grupos de amostras. Nesta seção, passamos a analisar o comportamento de cada amostra individual nas quatro marcas de lâmina HEp-2. Ou seja, voltamos o foco da análise para possíveis discordâncias em cada amostra.

A **tabela 11** discrimina a frequência de amostras com **concordância total, ou seja, presença de reatividade em todas as quatro marcas de lâminas**. Este é um parâmetro rigoroso, pelo qual, apenas amostras que apresentarem reatividade nas quatro marcas de lâminas são consideradas concordantes. Ou seja, se a amostra fosse discordante em apenas uma marca de lâmina, já seria classificada como discordante. Esta análise foi feita para a reatividade global e também para cada compartimento celular em separado. A **Tabela 11**

evidencia que o núcleo apresentou a maior e o nucléolo a menor frequência de amostras concordantes.

Tabela 11 - Distribuição das amostras reagentes de acordo com a concordância total de reatividade global e por compartimento celular nas quatro marcas de lâminas HEp-2

	Global	Núcleo	Nucléolo	Placa	Citoplasma	Aparelho Mitótico
Concordância total	135	207	6	67	34	2
Discordância	331	196	33	126	84	5
Total	466	403	39	193	118	7
Concordância (%)	29,0%*	51,4%**	15,4%**	34,7%**	28,8%**	28,6%**

*A porcentagem de concordância de reatividade entre os substratos, foram calculadas mediante ao número total de amostras consideradas reagentes para a reatividade global. **Para a análise de concordância de reatividade por compartimento celular, as porcentagens foram calculadas considerando apenas as amostras reagentes no compartimento celular específico.

Ao analisar este aspecto separadamente em cada grupo clínico, verificamos que o grupo DAI apresentou a maior frequência de amostras concordantes, significativamente maior que os grupos DNAI e DS (**Tabela 12**) que não diferiram entre si. Isto se aplica à concordância global e à concordância por compartimento celular, exceto o nucléolo em que a frequência de amostras concordantes foi a mais baixa em relação aos demais compartimentos, não se observando diferença entre os três grupos clínicos.

Tabela 12. Frequência de amostras reagentes apresentando concordância total com relação à reatividade global e por compartimento celular nos diferentes grupos clínicos

AMOSTRAS REAGENTES	Grupo Clínico				P
	DAI	DNAI	DS	Todos	
Reatividade Global*	238	119	109	466	<0,001
Concordantes	98 (41,1%)	18 (16,0%)	19 (17,5%)	135(29,0%)	
Reatividade no núcleo	215	86	102	403	<0,001
Concordantes	155 (72,1%)	23 (26,7%)	29 (28,4%)	207 (51,3%)	
Reatividade no nucléolo	22	10	7	39	0,846
Concordantes	1 (4,5%)	2 (20,0%)	1 (14,0%)	6 (15,4%)	
Reatividade na placa	133	32	28	193	<0,03
Concordantes	53 (39,8%)	5 (15,6%)	9 (32,1%)	67 (34,7%)	
Reatividade no citoplasma	77	33	8	118	<0,001
Concordantes	32 (41,6%)	2 (6,1%)	0 (0,0%)	34 (28,9%)	
Reatividade no Aparelho mitótico	3	4	0 (0,0%)	7	0,143
Concordantes	2 (66,7%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	2 (28,6%)	

Nível de inferência estatística calculado pelo teste de Qui-Quadrado ou exato de Fisher. *Reatividade global refere-se à reatividade em qualquer compartimento celular; ** Número de amostras reagentes no contexto de cada coluna e linha da tabela; Concordância total significa que o houve reatividade nas quatro marcas de lâminas.

5.4. Análise do grau de concordância

Estas análises preliminares de concordância basearam-se em concordância total, ou seja, foram classificadas como concordantes apenas as amostras em que as quatro lâminas apresentaram resultados semelhantes em termos de reatividade. A ocorrência de resultado

discordante em pelo menos uma lâmina já seria suficiente para classificar a amostra como discordante. Este é um critério bastante severo e tende a destacar o fenômeno de discordância mesmo quando a maior parte das lâminas apresentava resultados compatíveis. Com a finalidade de promover uma avaliação mais judiciosa do grau de concordância, desenvolvemos um escore ponderado de concordância a partir das possibilidades de concordância de reatividade (reagente versus não reagente) nas quatro lâminas analisadas. Como pode ser visto em materiais e métodos (**Quadro 2**) há três possibilidades de concordância de reatividade entre lâminas para cada amostra: **4x4**, **3x1** e **2x2**. Para fins de composição de um índice matemático, essas três possibilidades de concordância receberam pesos proporcionais, **100**, **75** e **50**, respectivamente.

A média ponderada de cada grupo de amostras permite a obtenção de um escore ponderado de concordância que reflete o comportamento consolidado do grupo. Portanto, para cada grupo de amostras analisado obtivemos escores ponderados variando em uma escala linear e contínua de cinquenta (50) a cem (100). Arbitrariamente, estabelecemos quatro categorias de concordância de reatividade de acordo com este escore ponderado: **pobre (concordância entre 50-62,5)**, **regular (62,6-75)**, **satisfatória (75,1-87,5)** e **excelente (87,6-100)**.

A **concordância global** de reatividade de todas as amostras nas quatro marcas de lâminas obteve um **escore ponderado de 74,5**, ou seja, um escore de concordância regular.

A análise de concordância de reatividade em cada compartimento celular seguiu os passos da análise de concordância de reatividade global. Portanto, a exemplo da análise global, há três possibilidades de concordância de reatividade (4x4, 3x1 e 2x2). Ao aplicar a métrica de escore ponderado de concordância de reatividade por compartimento celular, sem distinção de grupos clínicos, notamos que as amostras reagentes com o núcleo apresentaram a maior pontuação de concordância (**83,6**), seguidas daquelas reagentes com o compartimento placa metafásica (**78,9**), compartimento citoplasmático (**77,4**), e nucléolo (**72,4**) (**Tabela 13**). Sendo assim, amostras reagentes com cada compartimento apresentaram escore ponderado satisfatório, com exceção daquelas reagentes com o compartimento nucleolar que apresentaram uma concordância de reatividade regular.

Em referência ao compartimento do aparelho mitótico, foram encontradas apenas 7 amostras de soro reativas, das quais 2 (28,6%) eram concordantes nos quatro substratos utilizados (4/4) para o padrão AC-25. Três amostras apresentaram o grau de concordância (3/4), sendo não reagente em três substratos e reagente em um substrato. Este fato ocorreu em duas amostras com o padrão AC-27 com Fuso Mit/AC-XX e em uma amostra com o padrão

AC-24. Finalmente, em duas amostras observamos o padrão AC-24 em três substratos e resultado não reagente no quarto substrato. Devido ao baixo número de amostras apresentando reatividade no aparelho mitótico, este compartimento não foi contemplado nesta e em análises estatísticas subsequentes.

Tabela 13 - Distribuição das amostras reagentes de acordo com o grau de concordância de reatividade por compartimento celular nas quatro marcas de lâminas HEp-2

Compartimento celular	Grau de Concordância de Reatividade						*Escore ponderado de concordância
	4/4 (peso 100)		3/4 (peso 75)		2/4 (peso 50)		
	N	%	N	%	N	%	
NÚCLEO (n=403)	207	51,3	128	31,8	68	16,9	83,6
NUCLÉOLO (n = 39)	06	15,5	23	58,8	10	25,7	72,4
PLACA (n = 193)	67	34,8	89	46,1	37	19,1	78,9
CITOPLASMA (n = 118)	34	28,8	62	52,6	22	18,6	77,4

4/4: amostra reagente em todas as 4 lâminas; 3/4: amostra reagente em 3 lâminas e não reagente em uma; ou amostra não reagente em três lâminas e reagente em uma; 2/4: amostra reagente em 2 lâminas e não reagente em duas.* Interpretação do escore ponderado de concordância: pobre (50-62,5), regular (62,6-75), satisfatória (75,1-87,5) e excelente (87,6-100).

5.4.1 Comportamento de cada grupo clínico em relação ao grau de concordância de reatividade das amostras entre distintas marcas de lâminas HEp-2

Nesta seção, inicialmente procedemos à avaliação da concordância de reatividade global de cada amostra em cada grupo clínico em separado. Para tal, aplicamos o mesmo algoritmo para determinação do escore de concordância de reatividade utilizado no tópico anterior. Observamos que o grupo DAI apresentou escore de concordância global superior aos grupos DNAI e DS (**Tabela 14**). Ao realizar uma análise pareada entre os grupos observa-se que o grupo DAI difere significativamente dos grupos DNAI e DS, que se comportam de forma semelhante entre si (**Tabela 14**).

Tabela 14 - Distribuição das amostras reagentes de acordo com o grau de concordância de reatividade global em cada grupo clínico

Grupo Clínico	Grau de concordância			Total	Escore ponderado*/**	
	4X4 (peso 100)	3X1 (peso 75)	2X2 (peso 50)			
DAI	98	71	69	238	78,0	
DNAI	18	62	39	119	70,6	p<0,001
DS	19	55	35	109	71,3	
Total	135	188	143	466		

4/4: amostra reagente em todas as 4 lâminas; 3x1: amostra reagente em 3 lâminas e não reagente em uma; ou amostra não reagente em três lâminas e reagente em uma; 2x2: amostra reagente em 2 lâminas e não reagente em duas. *Escore ponderado de concordância de reatividade global nos três grupos clínicos. ** Interpretação do escore ponderado de concordância: pobre (50-62,5), regular (62,6-75), satisfatória (75,1-87,5) e excelente (87,6-100). Nível de inferência estatística calculado pelo teste de Kruskal Wallis.

Aplicamos a mesma sistemática para avaliação da concordância de reatividade por compartimento celular aos três grupos clínicos. A **tabela 15** discrimina o grau de concordância e o escore ponderado de concordância em cada compartimento celular, derivando a respectiva análise estatística na **tabela 16**.

Tabela 15 - Distribuição das amostras reagentes de acordo com o grau de concordância de reatividade em cada compartimento celular nos três grupos clínicos

Grupo Clínico	Compartimento celular	Grau de concordância por compartimento celular			Escore ponderado*
		4x4	3x1	2x2	
DAI	Núcleo	155	34	26	90
	Nucléolo	3	14	5	72,3
	Placa	53	51	29	79,5
	Citoplasma	32	34	11	81,8
DNAI	Núcleo	23	46	17	76,7
	Nucléolo	2	6	2	75
	Placa	5	23	4	75,8
	Citoplasma	2	21	10	68,9
DS	Núcleo	29	48	25	76
	Nucléolo	1	3	3	68
	Placa	9	15	4	79,5
	Citoplasma	0	7	1	71,9

4/4: amostra reagente em todas as 4 lâminas; 3x1: amostra reagente em 3 lâminas e não reagente em uma; 2x2: amostra reagente em 2 lâminas e não reagente em duas. * Interpretação do escore ponderado de concordância: pobre (50-62,5), regular (62,6-75), satisfatória(75,1-87,5) e excelente (87,6-100).

Conforme observado na **Tabela 16**, o grupo DAI diferiu de forma estatisticamente significativa frente aos outros grupos, principalmente no que se refere ao compartimento nuclear, que apresentou escore ponderado de concordância de **90** (classificado como excelente), enquanto os demais grupos apresentaram grau de concordância satisfatória (escores **de 76,7 e 76,0**, respectivamente). O grupo DAI se distinguiu também com relação ao compartimento citoplasmático que apresentou grau de concordância satisfatória (escore **de 81,8**) enquanto os demais grupos apresentaram grau de concordância regular (escore de **68,9 e 71,9** respectivamente). Para as demais comparações não houve diferença estatisticamente significativa. Mais uma vez, chama atenção o fato de que os grupos DNAI e DS apresentaram comportamento semelhante.

Tabela 16 - Análise do grau de concordância de reatividade global e por compartimento celular entre os grupos clínico

Compartimento Celular	Escore ponderado			Comparação entre grupos clínicos		
				Valor de p		
	DAI	DNAI	DS	DAI x DNAI	DAI x DS	DNAI x DS
Global	78,0	70,3	71,6	<0,005	<0,009	1,000
Núcleo	90,0	76,7	76,0	<0,001	<0,001	1,000
Nucléolo	72,3	75,0	68,0	1,000	1,000	1,000
Placa	79,5	75,8	79,5	0,598	1,000	1,000
Citoplasma	81,8	68,9	71,9	0,001	0,288	1,000

Interpretação do escore ponderado de concordância: pobre (50-62,5), regular (62,6-75), satisfatória (75,1-87,5) e excelente (87,6-100). Nível de inferência estatística calculado pelo teste Kruskal Wallis.

5.5. Análise da concordância total de acordo com a intensidade de fluorescência em diferentes marcas de lâminas HEp-2.

É sabido que a reatividade IFI-HEp-2 tende a ocorrer em títulos mais altos em pacientes autoimunes do que nos indivíduos não autoimunes que tenham um exame IFI-HEp-2 positivo (5,6). Portanto, nos perguntamos se as maiores taxas de concordâncias observadas em amostras do grupo DAI seriam condicionadas pelos altos títulos de IFI-HEp-2 observados neste grupo. Assim, procedemos a uma análise da concordância total de reatividade de acordo com a intensidade da reatividade IFI-HEp-2 em cada grupo clínico e em cada compartimento celular. Como se vê à **tabela 17**, as diferenças entre os grupos clínicos e entre os compartimentos celulares, observadas nas tabelas anteriores, desaparecem quando esses grupos são comparados no mesmo nível de intensidade de reatividade. Ainda na **Tabela 17**, podemos observar que o grupo DAI tem poucas amostras com reatividade de intensidade fraca e muitas com reatividade de intensidade alta. O oposto é observado nos grupos DS e DNAI.

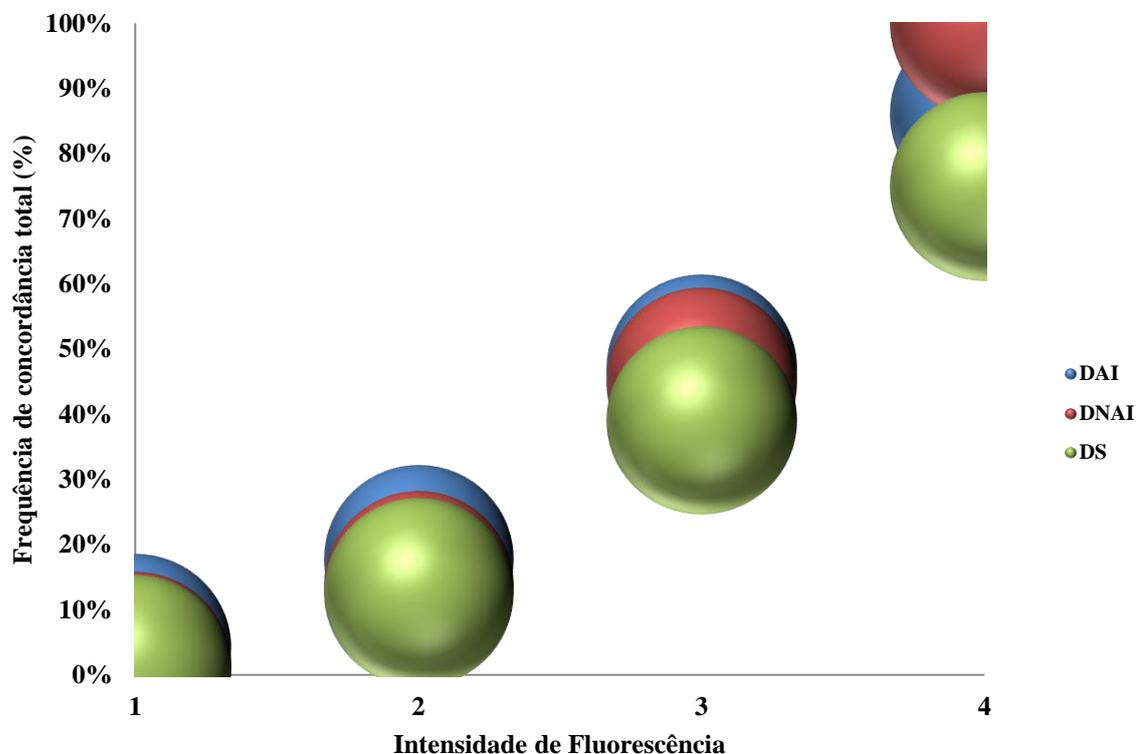
Tabela 17 - Distribuição das amostras reagentes de acordo com a intensidade de reatividade e concordância total de reatividade por compartimento celular nos três grupos clínicos

Compartimento celular	Grupo Clínico					
	DAI		DNAI		DS	
	Concordantes	Total	Concordantes	Total	Concordantes	Total
NUCLEO						
Intensidade 1+	1 (4,3%)*	23**	1 (1,5%)	68	1 (1,0%)	104
Intensidade 2+	5 (17,9%)	28	8 (13,8%)	58	8 (12,7%)	63
Intensidade 3+	16 (47,1%)	34	9 (45,0%)	20	9 (39,1%)	23
Intensidade 4+	129 (86,6%)	149	7 (100,0%)	7	9 (75,0%)	12
Total	151 (64,5%)	234	25 (16,3%)	153	27 (13,4%)	202
NUCLÉOLO						
Intensidade 1+	0	7	0	15	0	9
Intensidade 2+	0	8	1(16,7%)	6	1 (33,3%)	3
Intensidade 3+	1 (10,0%)	10	2 (66,7%)	3	0	2
Intensidade 4+	1 (25,0%)	4	0	0	0	0
Total	2 (6,9%)	29	3 (12,5%)	24	1 (7,1%)	14
PLACA						
Intensidade 1+	0	5	0	15	0	7
Intensidade 2+	0	13	1 (7,7%)	13	0	8
Intensidade 3+	1 (3,7%)	27	2 (15,4%)	13	4 (40,0)	10
Intensidade 4+	50 (54,9%)	91	3 (60,0%)	5	4 (57,1)	7
Total	51 (37,5%)	136	6 (13,0%)	46	8 (25,0)	32
CITOPLASMA						
Intensidade 1+	0	15	0	21	0	5
Intensidade 2+	1 (5,6%)	18	0	18	0	8
Intensidade 3+	7 (21,2%)	33	1 (8,3%)	12	0	2
Intensidade 4+	23 (62,2%)	37	1 (33,3%)	3	0	0
Total	31 (33,3%)	93	2 (3,7%)	54	0	15
APARELHO MITÓTICO						
Intensidade 1+	0	1	0	2	0	4
Intensidade 2+	0	0	0	6	0	1
Intensidade 3+	0	0	0	1	0	0
Intensidade 4	2 (66,7%)	3	0	0	0	0
Total	2 (50,0%)	4	0	9	0	5

* Número de amostras apresentando concordância total; ** Número total de amostras em cada categoria de grau de intensidade.

As **Figuras 7 a 10** fornecem uma demonstração gráfica do que está analiticamente exposto na **Tabela 17**, evidenciando a influência da intensidade de fluorescência sobre o grau de concordância total de reatividade em diferentes substratos.

Figura 7 - Figura representativa da influência da intensidade de fluorescência no compartimento nuclear sobre o grau de concordância total de reatividade das amostras nos quatro substratos de células HEP-2.



Taxa de concordância de intensidade de fluorescência entre os substratos no compartimento nuclear, entre os grupos clínicos. A Intensidade de fluorescência demonstrada em escala numérica de (1 a 4) é equivalente ao sistema expresso em cruzes (+/4 , ++/4 , +++/4 e ++++/4). A intensidade de fluorescência foi classificada como Baixa intensidade +/4 e ++/4; Alta intensidade +++/4 e ++++/4.

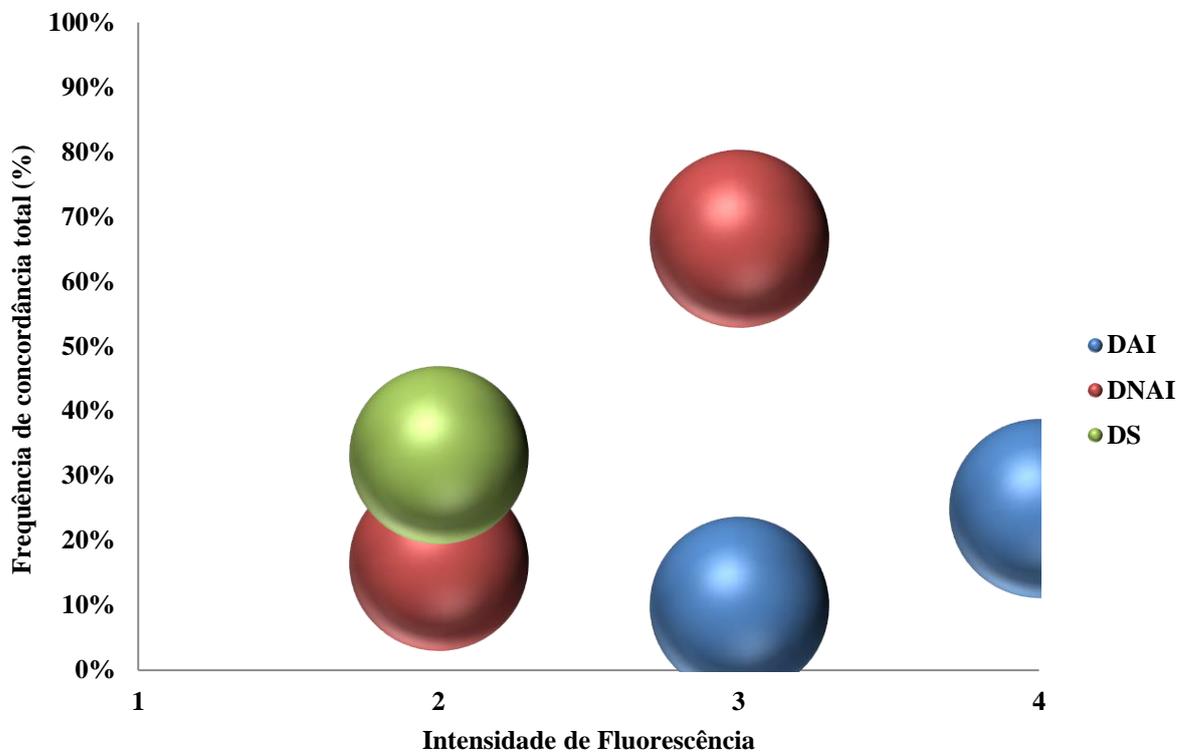
Amostras com menor intensidade (+/4) apresentaram menores taxas de concordância total que amostras com alta intensidade (++++/4). No grupo DAI a taxa de concordância total no compartimento nuclear foi de 86,6% para amostras ++++/4 e abaixo de 4,5% para amostras +/4. Fenômeno semelhante foi observado nos grupos DNAI e DS.

Para o compartimento nucleolar não houve amostras de baixa intensidade (+/4) concordantes em nenhum dos grupos em estudo. No grupo DAI a taxa de concordância total

no compartimento nucleolar foi de 25% para amostras ++++/4 e no grupo DNAI houve concordância de 66.6% para amostras +++/4 (**Figura 8**).

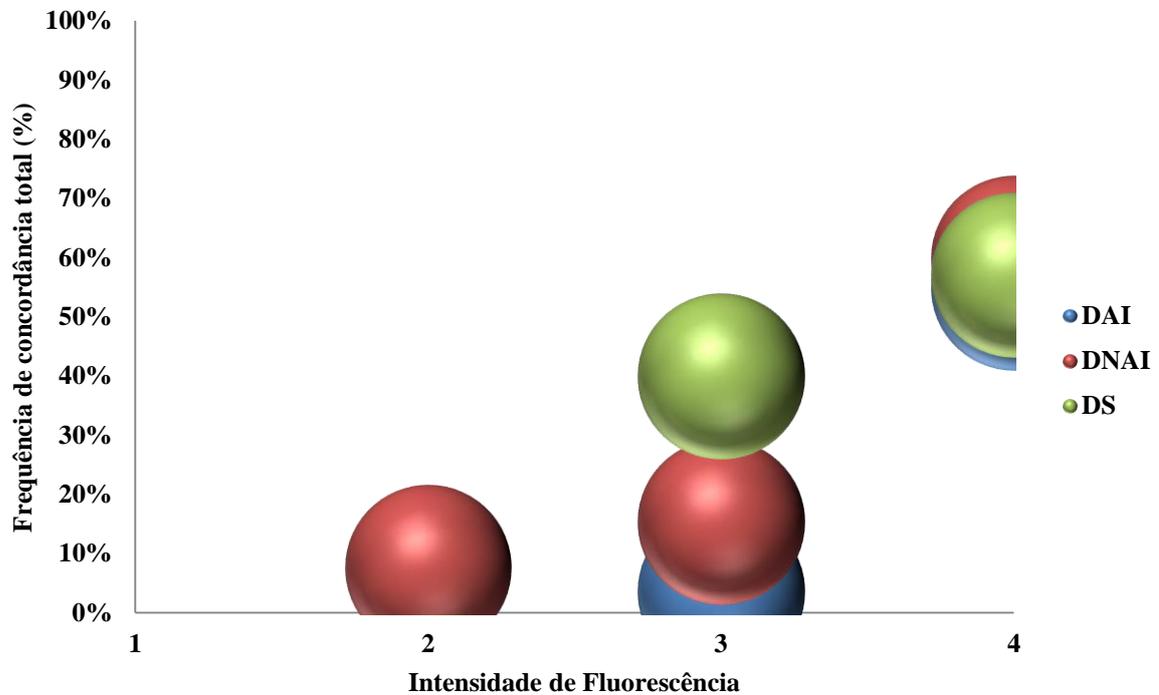
Em relação à placa metafásica, os grupos se comportaram de forma semelhante. Não houve amostras de baixa intensidade (+/4) concordantes em nenhum dos grupos em estudo. Por outro lado, nos três grupos clínicos as amostras ++++/4 apresentaram taxa de concordância total superior a 50% (**Figura 9**).

Figura 8 - Figura representativa da influência da intensidade de fluorescência no compartimento nucleolar sobre o grau de concordância total de reatividade das amostras nos quatro substratos de células HEp-2.



Taxa de concordância de intensidade de fluorescência entre os substratos no compartimento nucleolar, entre os grupos clínicos. A intensidade de fluorescência demonstrada em escala numérica de (1 a 4) é equivalente ao sistema expresso em cruces (+/4, ++/4, +++/4 e ++++/4). A intensidade de fluorescência foi classificada como Baixa intensidade +/4 e ++/4; Alta intensidade +++/4 e ++++/4.

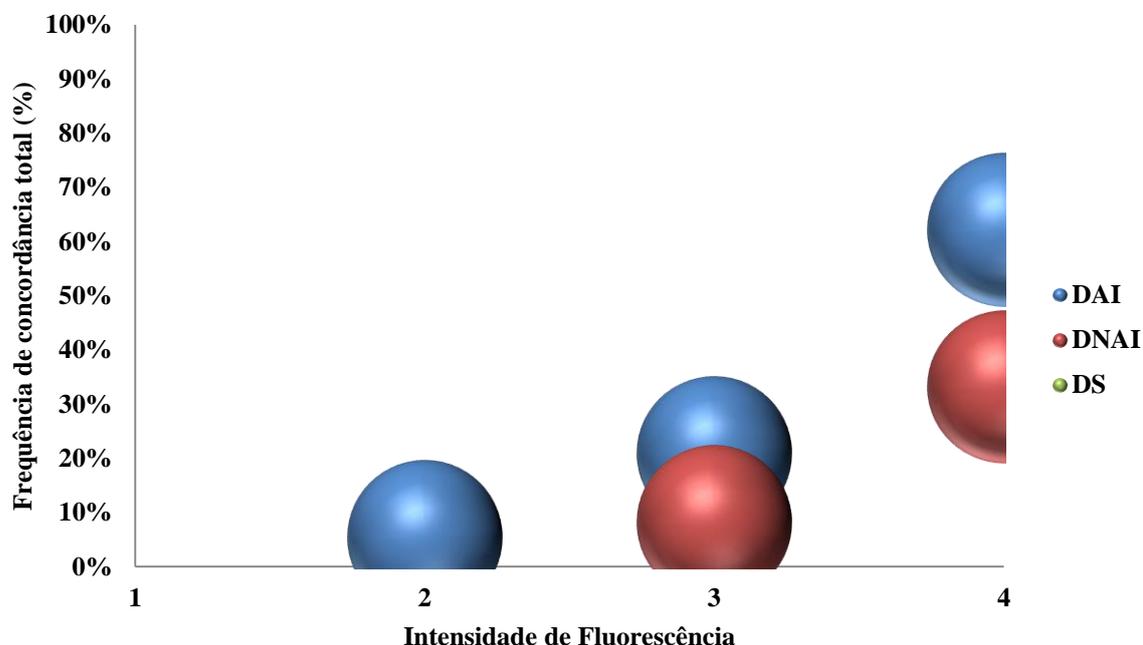
Figura 9 - Figura representativa da influência da intensidade de fluorescência no compartimento placa metafásica sobre o grau de concordância total de reatividade das amostras nos quatro substratos de células HEp-2.



Taxa de concordância de intensidade de fluorescência entre os substratos no compartimento placa metafásica, entre os grupos clínicos. A Intensidade de fluorescência demonstrada em escala numérica de (1 a 4) é equivalente ao sistema expresso em cruzes (+/4, ++/4, +++/4 e ++++/4). A intensidade de fluorescência foi classificada como Baixa intensidade +/4 e ++/4; Alta intensidade +++/4 e ++++/4.

Também no compartimento citoplasmático as amostras com reatividade de baixa intensidade (+/4) apresentaram baixa concordância nos três grupos clínicos. Em contrapartida, no grupo DAI a taxa de concordância total no compartimento citoplasmático foi de 62% para amostras com forte reatividade (++++/4) e de 33% no grupo DNAI. Não houve amostras com forte reatividade citoplasmática no grupo DS (**Figura 10**).

Figura 10 - Figura representativa da influência da intensidade de fluorescência no compartimento citoplasmático sobre o grau de concordância total de reatividade das amostras nos quatro substratos de células HEp-2.



Taxa de concordância de intensidade de fluorescência entre os substratos no compartimento citoplasmático, entre os grupos clínicos. A Intensidade de fluorescência demonstrada em escala numérica de (1 a 4) é equivalente ao sistema expresso em cruces (+/4, ++/4, +++/4 e ++++/4). A intensidade de fluorescência foi classificada como Baixa intensidade +/4 e ++/4; Alta intensidade +++/4 e ++++/4.

Em seu conjunto, os dados desta seção indicam que alta intensidade de imunofluorescência é o principal fator determinante de alta reprodutibilidade de achados, independentemente da natureza clínica da amostra e do compartimento reconhecido pelos autoanticorpos.

5.6. Análise do grau de concordância e robustez dos padrões morfológicos FAN-HEp-2

Nesta seção o foco é o padrão de imunofluorescência no teste IFI-HEp-2, ou seja, o intuito é verificar especificamente a reprodutibilidade de cada padrão de IFI-HEp-2 em distintas marcas de lâminas. Para esta análise, utilizamos uma vez mais o conceito de escore ponderado de concordância, como descrito em Materiais e Métodos. O **Quadro 11** representa a lista de padrões morfológicos encontrados no estudo. Os **Quadros 12 e 13** por sua vez, apresentam a frequência dos diversos padrões observados com as amostras reagentes estudadas de acordo com as quatro marcas de lâmina. De forma geral, as frequências dos diversos padrões foram semelhantes nas quatro marcas de lâminas, com algumas

discrepâncias pontuais. Por exemplo, na lâmina Z foi menos frequentemente reconhecido o padrão AC-2 e mais frequentemente reconhecido o padrão QH/AC-XX. Com relação aos padrões citoplasmáticos, o padrão AC-23 foi exclusivamente identificado nas lâminas Z e W; a lâmina Z teve menor frequência dos padrões citoplasmáticos AC-15/16/17.

Quadro 11 - Lista dos padrões morfológicos IFI-HEp-2 encontrados no estudo

Código AC	Padrão nuclear
AC-1	Homogêneo
AC-2	Pontilhado Fino Denso
AC-3	Centromérico
AC-4	Pontilhado Fino
AC-5	Pontilhado Grosso
AC-6	Múltiplos Pontos Isolados
AC-7	Raros Pontos Nucleares Isolados
AC-11/12	Envelope Nuclear
AC-13/14	Pleomórfico
ENV-IV/ AC-XX	Envelope Nuclear De Intensidade Variável
PFCOA/ AC-XX	Pontilhado Fino Associado A Pontos Que Coalescem
PF-IV/ AC-XX	Pontilhado Fino De Intensidade Variável
PF-PL/ AC-XX	Pontilhado Fino Com Placa Metafásica
QH/ AC-XX	<i>Quasi</i> -Homogêneo
Código AC	Padrão nucleolar
AC-8	Nucleolar Homogêneo
AC-9	Nucleolar Aglomerado
AC-10	Nucleolar Pontilhado
Código AC	Padrão citoplasmático
AC-15/16/17	Citoplasmático Fibrilar
AC- 18	Citoplasmático Pontilhado
AC-19	Citoplasmático Pontilhado Fino Denso
AC-20	Citoplasmático Pontilhado Fino
AC-21	Citoplasmático Reticulado
AC-22	Aparelho De Golgi
AC-23	Rods And Rings
PCD/ AC-XX	Pontos Citoplasmáticos Isolados
PAMA/AC-XX	Pseudo -AMA
Código AC	Padrão aparelho mitótico
AC-24	Centríolo
AC-25	Numa-2
AC-26	Numa-1
AC-27	Ponte Intercelular
Fuso Mit/ AC-XX	Fuso Mitótico
Polo Mit/ AC-XX	Polo Mitótico
Código AC	Ausência de reatividade
AC-0	Não Reagente
	Outros
NA	Múltiplos Padrões

Código AC: código alfanumérico ICAP; AC-XX: código que precede padrões morfológicos não inclusos no ICAP; NA: Não se aplica.

Quadro 12 - Distribuição das amostras reagentes de acordo com o padrão de imunofluorescência nuclear e a marca de lâmina HEp-2

PADRÃO	Marca de lâmina HEp-2							
	X		Y		Z		W	
	(306) *		(269) *		(361)*		(330)*	
Código AC	N	%	N	%	N	%	N	%
AC-1	40	13,1	46	17,1	58	16,1	51	15,5
AC-2	12	3,9	14	5,2	7	1,9	10	3
AC-3	12	3,9	17	6,3	14	3,9	14	4,2
AC-4	171	55,9	113	42	165	45,7	149	45,2
AC-5	41	13,4	38	14,1	37	10,2	41	12,4
AC-6	5	1,6	5	1,9	5	1,3	1	0,3
AC-7	3	1	13	4,8	1	0,3	8	2,4
AC-11/12	4	1,3	4	1,5	3	0,8	4	1,2
AC-13/14	0	0	0	0	1	0,3	1	0,3
ENV-IV/AC-XX	0	0	1	0,4	0	0	0	0
MISTO/AC-XX	2	0,6	0	0	1	0,3	0	0
PF-PL/AC-XX	12	3,9	10	3,7	48	13,3	31	9,4
PFCOA/AC-XX	1	0,3	0	0	0	0	0	0
PF-IV/AC-XX	1	0,3	1	0,4	1	0,3	1	0,3
QH/AC-XX	4	1,3	7	2,6	21	5,8	15	4,5

As frequências percentuais dos padrões morfológicos foram calculadas em relação ao total de amostras reagentes em cada substrato. * Número total de amostras reagentes em cada substrato. O significado de todas as siglas está discriminado no encarte de abreviações.

Quadro 13 - Distribuição das amostras reagentes de acordo com o padrão de imunofluorescência citoplasmático e a marca de lâmina HEp-2

PADRÃO	Marca de lâmina HEp-2							
	X		Y		Z		W	
	(70)*		(73)*		(82)*		(53)*	
Código AC	N	%	N	%	N	%	N	%
AC-15/16/17	4	5,7	7	9,6	1	1,2	5	9,4
AC-18	0	0	6	8,2	0	0	3	5,7
AC-19	4	5,7	4	5,5	8	9,8	0	0
AC-20	5	7,1	4	5,5	1	1,2	0	0
AC-21	46	65,7	44	60,3	52	63,4	39	73,6
AC-22	0	0	1	1,4	0	0	1	1,9
AC-23	0	0	0	0	5	6,1	3	5,7
PAMA/AC-XX	1	1,4	3	4,1	7	8,5	1	1,9
PCD/AC-XX	10	14,3	4	5,5	8	9,8	1	1,9

Código AC: código alfanumérico ICAP. As frequências percentuais dos padrões morfológicos foram calculadas em relação ao total de amostras reagentes em cada substrato. * Número total de amostras reagentes em cada substrato. O significado de todas as siglas está discriminado no encarte de abreviações.

5.5.1. Análise do grau de concordância dos diversos padrões IFI-HEp-2 em quatro marcas de lâminas HEp-2

Em uma primeira rodada de análises, foram encontrados 276 eventos de ausência de concordância total entre as lâminas com relação aos padrões IFI-HEp-2. Dentre esses eventos de ausência de concordância total, 228(82,6%) amostras provenientes dos 3 grupos foram reprocessadas e em 221 (97%) dos casos confirmou-se a ausência de concordância total. Desta forma, confirmamos que o fenômeno de ausência de concordância total foi reprodutível na quase totalidade dos casos, enquanto que os sete casos restantes se confirmaram concordantes e foram assim computados. Sendo assim, passamos a contar com 197 eventos de concordância total e 269 eventos de ausência de concordância total na análise das 466 amostras reagentes. Novamente salientamos que esta é uma abordagem que enfatiza o fenômeno de não concordância, pois basta que uma marca de lâmina apresente resultado discordante em relação às demais para que a amostra seja considerada não concordante.

Portanto, à semelhança do que foi feito para a análise de reatividade versus não reatividade, elaboramos um escore ponderado de concordância de padrões IFI-HEp-2 (vide Material e Métodos). Esta análise objetivou verificar o quão robusto é cada padrão IFI-HEp-2 de acordo com o seu grau de reprodutibilidade em diferentes marcas de lâminas. Assim, em

cada amostra em que o padrão em questão era detectado, conferia-se um escore baseado no número de lâminas em que este padrão era observado.

Como visto em Material e Métodos, as possibilidades de concordância para este cenário são quatro: 4x4, 3x4, 2x4 e 1x4, que receberam, respectivamente, os pesos 100, 67, 33 e 1. O padrão observado em cada amostra recebeu um escore individual de acordo com o número de lâminas em que o mesmo foi reproduzido. O escore ponderado de concordância de cada padrão foi obtido pela média dos escores individuais em todas as amostras que apresentaram este padrão. Este escore ponderado representa o grau de robustez de cada padrão frente à diversidade de lâminas HEp-2. As **Tabelas 18 e 19** discriminam o escore ponderado de concordância dos diversos padrões nucleares e citoplasmáticos, respectivamente.

Tabela 18 - Distribuição das amostras reagentes de acordo com a ocorrência de cada padrão nuclear nas quatro lâminas HEp-2, com derivação do escore ponderado de concordância de cada padrão

PADRÃO CÓDIGO AC	POSSIBILIDADES DE CONCORDÂNCIA								Escore ponderado
	Peso 100 (4x4)		Peso 67 (3x4)		Peso 33 (2x4)		Peso 1(1x4)		
	N	CP	N	CP	N	CP	N	CP	
AC-1	37	3700	6	402	9	297	13	13	67,9
AC-2	4	400	5	335	4	132	3	3	54,4
AC-3	11	1100	1	67	5	165	0	0	78,4
AC-4	40	4000	67	4489	79	2607	78	78	42,3
AC-5	25	2500	8	536	5	165	7	7	71,3
AC-6	1	100	4	268	0	0	0	0	73,6
AC-7	0	0	7	469	3	99	11	11	27,6
AC-11/12	0	0	1	67	5	165	4	4	23,6
PF-PL/AC-XX	2	200	2	134	11	363	32	32	15,5
QH/AC-XX	0	0	1	67	7	231	28	28	9,1

Código AC: código alfanumérico ICAP; AC-XX: código que precede padrões morfológicos não inclusos no ICAP. CP: contribuição ponderada, calculada pela multiplicação de amostras pelo peso ponderado de acordo com a ocorrência em 1 a 4 lâminas. A soma das contribuições ponderadas de cada padrão é dividida pelo número de amostras apresentando o respectivo padrão para obtenção do seu escore ponderado de concordância.

* Interpretação do escore ponderado de robustez: pobre (escore ponderado de 1 a 25), regular (escore ponderado de 25,1 a 50) satisfatória (escore ponderado de 50,1 até 75) e excelente (escore ponderado de 75,1 a 100). O significado de todas as siglas está discriminado no encarte de abreviações

Tabela 19 - Distribuição das amostras reagentes de acordo com a ocorrência de cada padrão citoplasmático nas quatro lâminas HEp-2, com derivação do escore ponderado de concordância de cada padrão

PADRÃO CÓDIGO AC	POSSIBILIDADES DE CONCORDÂNCIA								Escore Ponderado
	Peso 100 (4x4)		Peso 67 (3x4)		Peso 33 (2x4)		Peso 1 (1x4)		
	N	CP	N	CP	N	CP	N	CP	
AC-15/16/17	0	0	1	67	5	165	2	2	29,3
AC-18	0	0	0	0	1	33	5	5	6,3
AC-19	2	200	3	201	3	99	6	6	36,1
AC-20	0	0	0	0	4	132	3	3	19,3
AC-21	31	3100	12	804	4	132	12	12	68,6
AC-23	0	0	0	0	1	33	6	6	5,6
PAMA/AC-XX	0	0	0	0	2	66	6	6	9
PCD/AC-XX	0	0	2	134	3	99	6	6	21,7

Código AC: código alfanumérico ICAP; AC-XX: código que precede padrões morfológicos não inclusos no ICAP. CP: contribuição ponderada, calculada pela multiplicação de amostras pelo peso ponderado de acordo com a ocorrência em 1 a 4 lâminas. A soma das contribuições ponderadas de cada padrão é dividida pelo número de amostras apresentando o respectivo padrão para obtenção do seu escore ponderado de concordância.

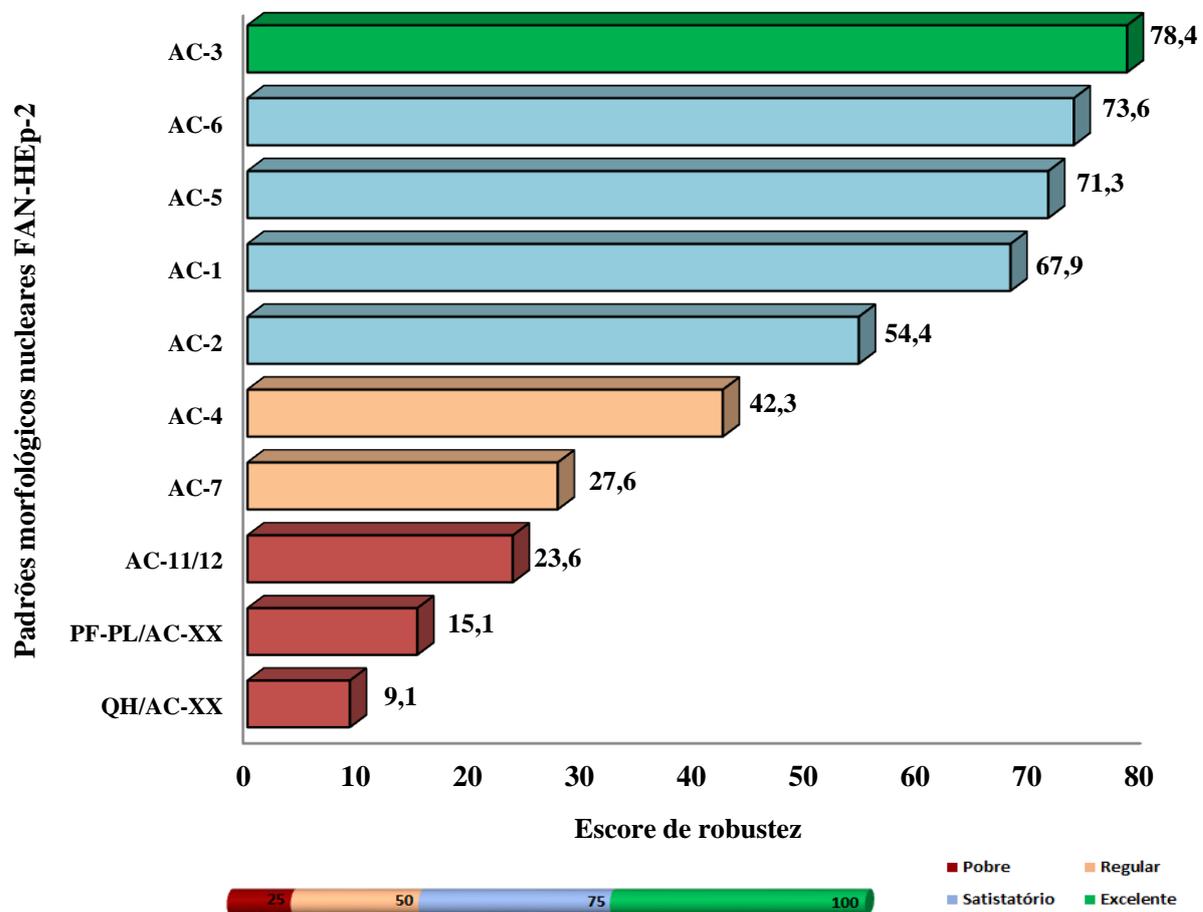
* Interpretação do escore ponderado de robustez: pobre (escore ponderado de 1 a 25), regular (escore ponderado de 25,1 a 50) satisfatória (escore ponderado de 50,1 até 75) e excelente (escore ponderado de 75,1 a 100). O significado de todas as siglas está discriminado no encarte de abreviações.

5.5.2 Análise de robustez dos diversos padrões IFI-HEp-2 em quatro marcas de lâminas HEp-2

Conforme mencionado acima, o escore ponderado de concordância expressa o grau de robustez de cada padrão referente à sua reprodutibilidade em várias preparações comerciais de células HEp-2. Para análise da robustez dos padrões, nós agrupamos arbitrariamente o escore ponderado de concordância em quatro classes de robustez: **pobre (escore ponderado de 1 a 25)**, **regular (escore ponderado de 25,1 a 50)** **satisfatória (escore ponderado de 50,1 até 75)** e **excelente (escore ponderado de 75,1 a 100)**.

Foram encontrados 15 padrões nucleares distintos, dos quais 7 (46,6%) demonstraram robustez pobre, 2 (13,4%) padrões apresentaram robustez regular, 4 (26,6 %) foram classificados com robustez satisfatória e apenas 2 (13,4%) foram considerados padrões de alta robustez (robustez excelente). Os padrões morfológicos de maior robustez foram AC-3 (escore 78,4), AC-6 (escore 71,6), AC-5 (escore 71,3) e AC-1 (escore 67,9) (**Figura 11**).

Figura 11 - Figura representativa do grau de robustez dos padrões nucleares



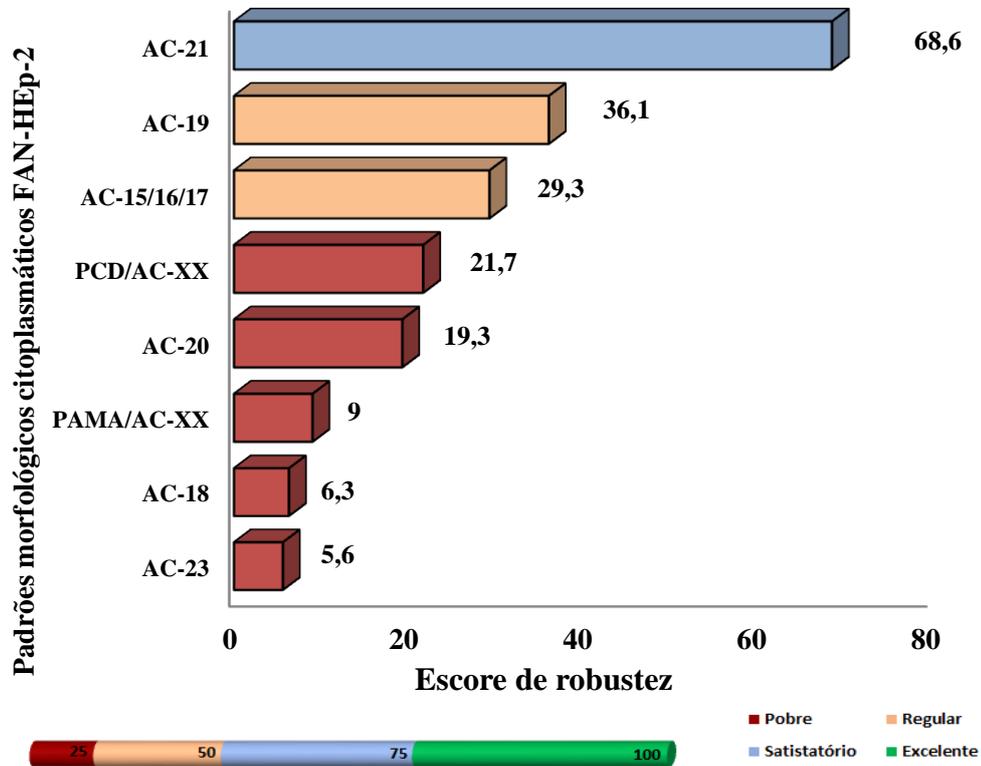
O grau de robustez dos padrões nucleares foi obtido através da contribuição ponderada, calculada pela multiplicação de amostras pelo peso ponderado de acordo com a ocorrência em 1 a 4 lâminas. A soma das contribuições ponderadas de cada padrão foi dividida pelo número de amostras apresentando o respectivo padrão para obtenção do seu escore ponderado de concordância. Interpretação do escore ponderado de robustez: pobre (escore ponderado de 1 a 25), regular (escore ponderado de 25,1 a 50) satisfatória (escore ponderado de 50,1 até 75) e excelente (escore ponderado de 75,1 a 100). Código AC: código alfanumérico ICAP; AC-XX: código que precede padrões morfológicos não inclusos no ICAP.

O padrão PF-IV/AC-XX, expresso de forma igualitária nas quatro marcas de lâminas (**Quadro 12**), atingiu o escore máximo de robustez (escore 100), no entanto é necessário ponderar que este resultado é derivado de uma única amostra de soro, o que lança reserva sobre o significado deste achado. O mesmo julgamento foi aplicado a outros padrões que ocorreram em menos que cinco amostras, como os padrões ENV-IV/AC-XX, AC-13/14, MISTO, PFCOA/AC-XX e AC-22.

Foram encontrados 9 padrões citoplasmáticos em todo o estudo, seis (66,6%) dos quais apresentaram robustez pobre, dois (22,2%) apresentaram padrão de robustez regular e um (11%) apresentou robustez satisfatória. O padrão citoplasmático com maior robustez foi o

AC-21, que se destacou com um escore de 68,6. Não houve nenhum caso de padrões citoplasmáticos com alto grau de robustez (**Figura 12**).

Figura 12 - Figura representativa do grau de robustez dos padrões citoplasmáticos.



O grau de robustez dos padrões citoplasmáticos foi obtido através da contribuição ponderada, calculada pela multiplicação de amostras pelo peso ponderado de acordo com a ocorrência em 1 a 4 lâminas. A soma das contribuições ponderadas de cada padrão foi dividida pelo número de amostras apresentando o respectivo padrão para obtenção do seu escore ponderado de concordância. Interpretação do escore ponderado de robustez: pobre (escore ponderado de 1 a 25), regular (escore ponderado de 25,1 a 50) satisfatória (escore ponderado de 50,1 até 75) e excelente (escore ponderado de 75,1 a 100). Código AC: código alfanumérico ICAP; AC-XX: código que precede padrões morfológicos não inclusos no ICAP.

5.5.3. Reprodutibilidade de padrões morfológicos de IFI-HEp-2 em diferentes substratos em função do grau de intensidade da imunofluorescência

Uma vez observada a marcante influência da intensidade de reatividade sobre as análises de reprodutibilidade referentes aos compartimentos celulares reconhecidos pelas amostras, julgamos procedente investigar se haveria interferência da intensidade de reatividade também na robustez dos padrões morfológicos de IFI-HEp-2. Como descrito em materiais e métodos, segregamos as categorias de intensidade de fluorescência em alta (+++/4 e ++++/4) e baixa (+/4 e ++/4) e atribuímos esta classificação a cada amostra com seus respectivos padrões (**tabelas 20 e 21**).

Observamos um comportamento heterogêneo dos vários padrões com relação a este quesito. De fato, para vários padrões observamos uma associação estatisticamente significativa entre intensidade de imunofluorescência e a robustez do padrão, ou seja, para determinados padrões houve maior robustez em amostras de maior intensidade de imunofluorescência. Assim, entre os padrões nucleares, observamos que aqueles com maiores escores de robustez AC-3, AC-5 e AC-1 foram os que apresentaram maior frequência de amostras com alta intensidade de imunofluorescência. Coerentemente, o padrão AC-4, com baixa frequência de amostras com alta intensidade de imunofluorescência, apresentou baixo escore de robustez. Por outro lado, os padrões AC-2 e QH/AC-XX, ambos com alta frequência de amostras com alta intensidade de imunofluorescência, apresentaram escore de robustez satisfatório e pobre respectivamente.

Também entre os padrões citoplasmáticos, o comportamento foi heterogêneo. Assim, entre os dois padrões citoplasmáticos com maior frequência de amostras de alta intensidade de imunofluorescência (AC-19 e AC-21), observamos que o AC-19 apresentou baixa robustez enquanto o AC-21 apresentou boa robustez. Para os demais padrões citoplasmáticos, não houve diferenças significantes no escore de robustez relacionada à intensidade de imunofluorescência.

Este comportamento dual dos padrões nucleares e citoplasmáticos indica claramente que alguns padrões possuem características de robustez intrínsecas independentes da intensidade de imunofluorescência, enquanto outros tiveram sua robustez dependente da intensidade de imunofluorescência.

Tabela 20 - Frequência de amostras de baixa e alta intensidade de imunofluorescência de acordo com o grau de robustez do padrão nuclear na IFI-HEp-2

Padrão	Intensidade de imunofluorescência				Total	*Robustez	P
	Baixa		Alta				
Código AC	N	%	N	%			
AC-1	23	29,5%	55	70,5 %	78	67,9	<0,001
AC-2	2	12,5%	14	87,5 %	16	54,4	0,004
AC-3	2	11,8%	15	88,2 %	17	78,4	0,002
AC-4	164	62,1%	100	37,9 %	264	42,3	<0,001
AC-5	8	17,8%	37	82,2 %	45	71,3	<0,001
AC-6	1	20,0%	4	80,0 %	5	73,6	0,372
AC-7	7	33,3%	14	66,7 %	21	27,6	0,189
AC-11/12	3	30,0%	7	70,0%	10	23,6	0,344
PF-PL /AC-XX	32	68,1%	15	31,9%	47	15,1	0,019
QH/AC-XX	4	11,1%	32	88,9%	36	9,1	<0,001

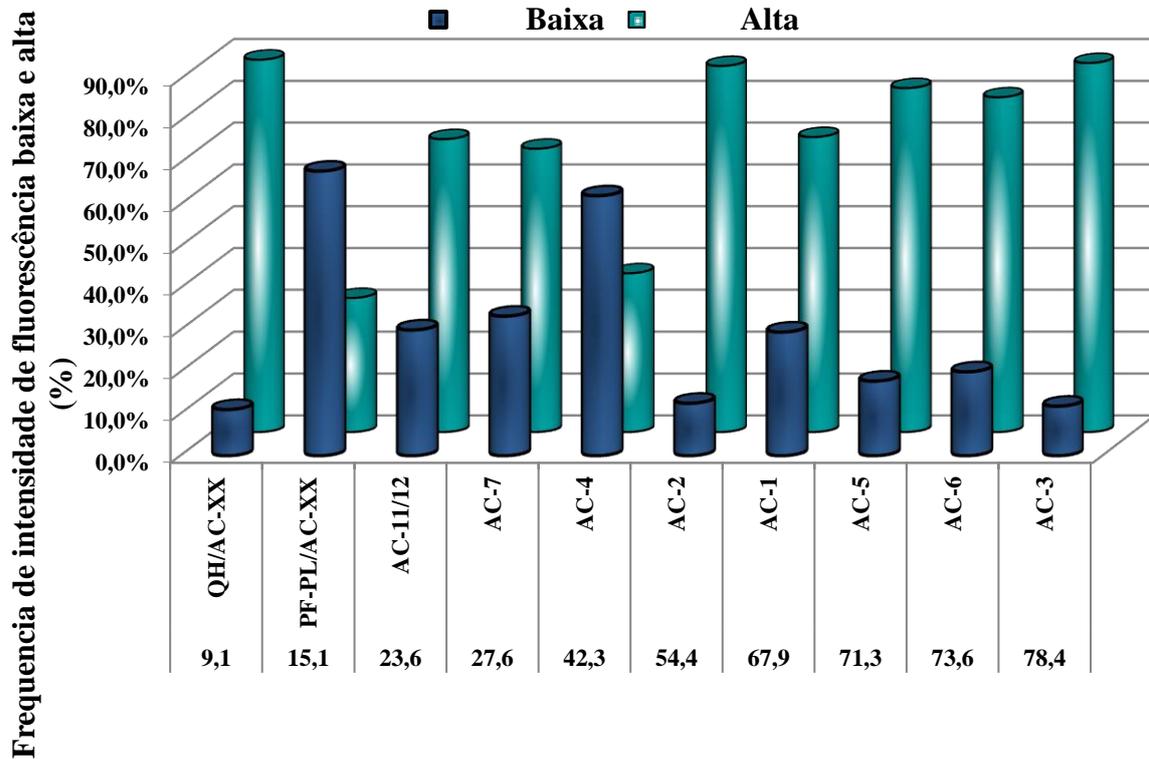
Nível descritivo do teste da binomial(comparação entre proporção de intensidade alta e baixa para cada padrão morfológico de IFI-HEp-2. As porcentagens foram calculadas á partir do número total de amostras com cada padrão morfológico e seus respectivos graus de intensidade.Intensidade de fluorescência: alta (+++/4 e ++++/4); baixa (+/4 e ++/4). * Interpretação do escore ponderado de robustez: pobre(escore ponderado de 1a 25), regular (escore ponderado de 25,1 a 50) satisfatória (escore ponderado de 50,1 até 75) e excelente (escore ponderado de 75,1 a 100).

Tabela 21 - Frequência de amostras de baixa e alta intensidade de imunofluorescência de acordo com o grau de robustez do padrão citoplasmático na IFI-HEp-2

Padrão	Intensidade de imunofluorescência				Total	*Robustez	P
	Baixa		Alta				
Código AC	N	%	N	%			
AC-15/16/17	4	50,0%	4	50,0%	8	29,3	1
AC-18	2	33,3%	4	66,7%	6	6,3	0,688
AC-19	2	14,3%	12	85,7%	14	36,1	0,013
AC-20	4	57,1%	3	42,9%	7	19,3	1
AC-21	19	32,2%	40	67,8%	59	68,6	0,009
AC-23	3	42,9%	4	57,1%	7	5,6	1
PAMA/AC-XX	5	62,5%	3	37,5%	8	9	0,727
PCD/AC-XX	7	63,6%	4	36,4%	11	21,7	0,549

Nível descritivo do teste da binomial, comparação entre proporção de intensidade alta e baixa para cada padrão morfológico de IFI-HEp-2. As porcentagens foram calculadas a partir do número total de amostras com cada padrão morfológico e seus respectivos graus de intensidade. Intensidade de fluorescência: alta (+++/4 e ++++/4); baixa (+/4 e ++/4). * Interpretação do escore ponderado de robustez: pobre (escore ponderado de 1 a 25), regular (escore ponderado de 25,1 a 50) satisfatória (escore ponderado de 50,1 até 75) e excelente (escore ponderado de 75,1 a 100).

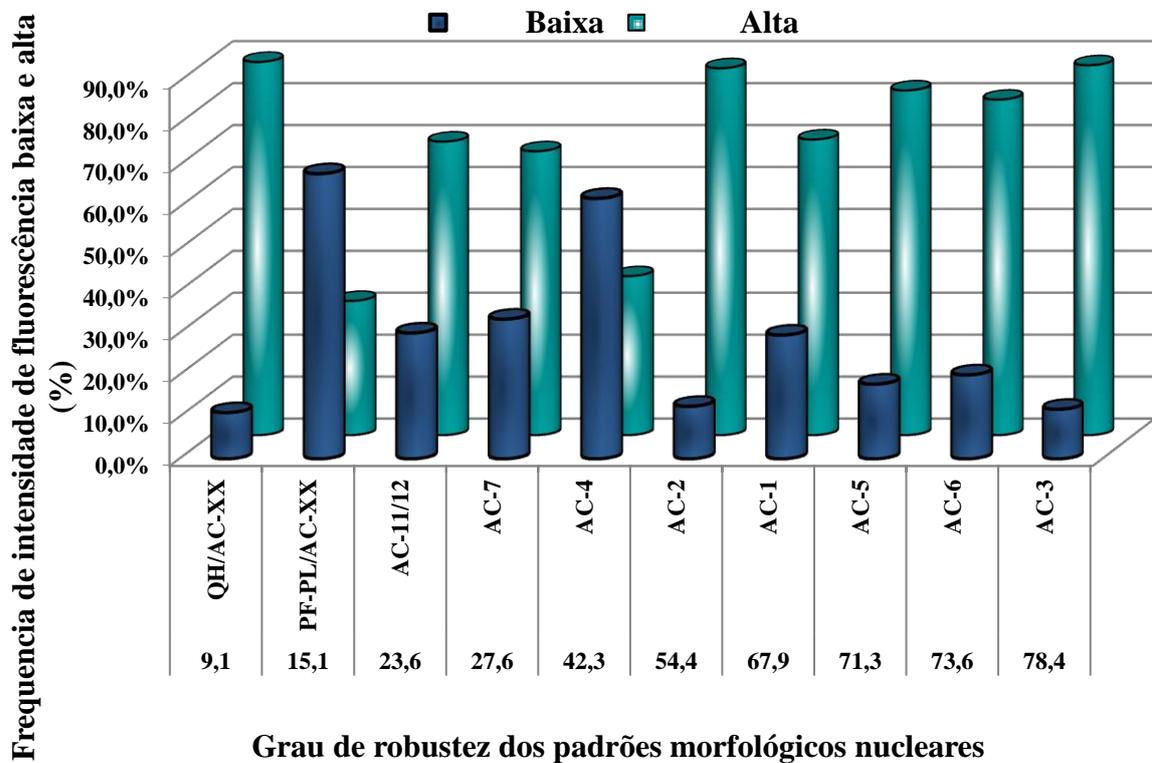
Figura 13 - Variação da frequência de alta e baixa intensidade de imunofluorescência de acordo com a robustez dos padrões nucleares IFI-HEp-2.



Grau de robustez dos padrão morfológicos nucleares

O escore de robustez de cada padrão morfológico IFI-HEp-2 (eixo x), classificado em pobre (escore ponderado de 1 a 25), regular (escore ponderado de 25,1 a 50) satisfatória (escore ponderado de 50,1 até 75) e excelente (escore ponderado de 75,1 a 100) foram exibidos de forma crescente da esquerda para a direita. A intensidade de fluorescência foi classificada como Baixa intensidade +/4 e ++/4 (barras anteriores); Alta intensidade +++/4 e ++++/4 (barras posteriores).

Figura 14 - Variação da frequência de alta e baixa intensidade de imunofluorescência de acordo com a robustez dos padrões citoplasmáticos IFI-HEp-2.



O escore de robustez de cada padrão morfológico IFI-HEp-2 (eixo x), classificado em pobre (escore ponderado de 1 a 25), regular (escore ponderado de 25,1 a 50) satisfatória (escore ponderado de 50,1 até 75) e excelente (escore ponderado de 75,1 a 100) foram exibidos de forma crescente da esquerda para a direita. A intensidade de fluorescência foi classificada como Baixa intensidade +/4 e ++/4 (barras anteriores); Alta intensidade +++/4 e ++++/4 (barras posteriores).

5.7. Comportamento de padrões morfológicos no teste IFI-HEp-2 em diferentes substratos em função da natureza clínica das amostras

Como pode ser apreciado na **tabela 22**, alguns padrões apresentaram forte associação clínica com DAI, independentemente da marca de lâmina HEp-2, enquanto outros padrões apareceram indistintamente nos três grupos clínicos. Assim, foram proeminentes no grupo DAI os padrões nucleares AC-3, AC-5, AC-11/12 e AC-1, porém somente os padrões AC-11/12, AC-3 e AC-5 foram expressos de forma consistente nas quatro marcas de lâminas, enquanto o padrão AC-1 se mostrou consistente em três substratos, mas foi pobremente reconhecido no substrato W. Interessantemente, este substrato apresentou maior frequência de amostras DAI com os padrões QH/AC-XX e PF-PL/AC-XX em comparação com os demais substratos. É possível, portanto, que o substrato W tenha limitação na expressão plena do

padrão AC-1, que poderia em algumas amostras se apresentar como QH/AC-XX ou PF-PL/AC-XX.

Tabela 22 - Frequência dos padrões nucleares por grupo clínico nos quatro substratos de lâmina HEp-2

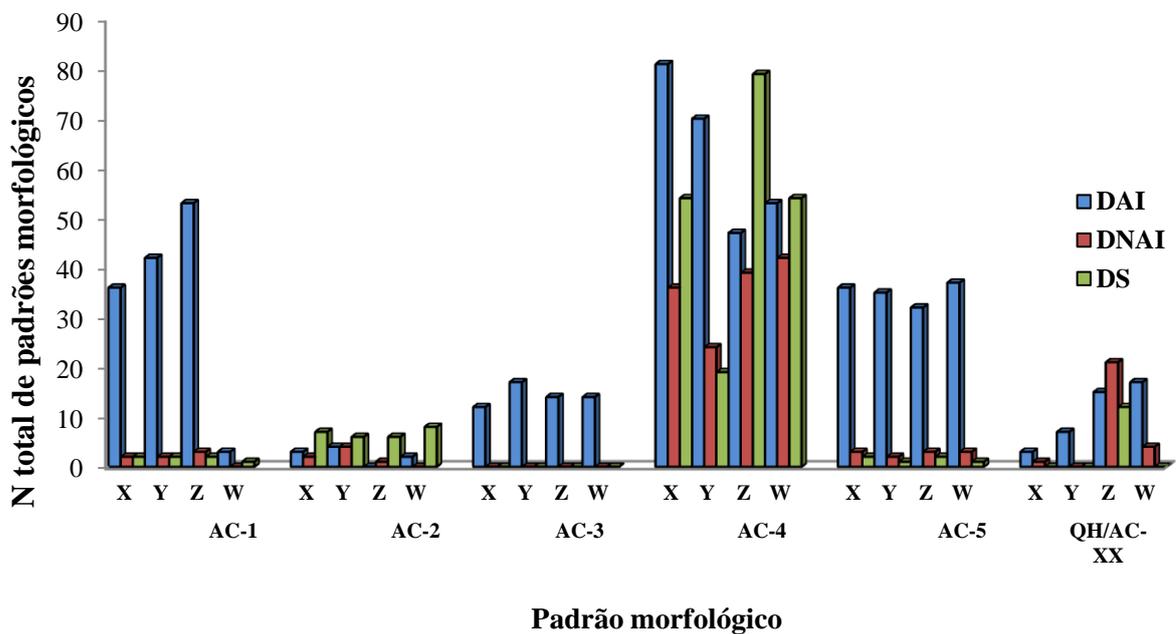
Padrão	Substrato	Grupo Clínico			p
		DAI (n=215)	DNAI (n=86)	DS (n=102)	
AC-1	X	36	2	2	<0,001
	Y	42	2	2	<0,001
	Z	53	3	2	<0,001
	W	3	0	1	0,811
	% Padrão	1,4 a 19,5%	0 a 3,5%	0,98 a 2,0%	
AC-2	X	3	2	7	0,03
	Y	4	4	6	0,128
	Z	0	1	6	0,001
	W	2	0	8	0,002
	% Padrão	0 a 1,8%	0 a 4,6%	5,9 a 7,8%	
AC-3	X	12	0	0	0,003
	Y	17	0	0	<0,001
	Z	14	0	0	0,001
	W	14	0	0	0,001
	% Padrão	5,6 a 7,9%	0	0	
AC-4	X	81	36	54	0,038
	Y	70	24	19	0,033
	Z	47	39	79	<0,001
	W	53	42	54	<0,001
	% Padrão	24,6 a 37,7 %	27,9 a 48,8%	18,6 a 77,4%	
AC-5	X	36	3	2	<0,001
	Y	35	2	1	<0,001
	Z	32	3	2	<0,001
	W	37	3	1	<0,001
	% Padrão	14,9 a 17,2%	2,3 a 3,4%	0,98 a 1,7%	
AC-7	X	3	0	1	0,811
	Y	11	0	2	0,041
	Z	1	0	0	1
	W	5	5	2	0,228
	% Padrão	1,4 a 5,1%	0a5,8%	0 a 1,7%	
AC-11/12	X	3	0	1	0,811
	Y	3	0	1	0,811
	Z	3	0	0	0,435
	W	3	0	1	0,811
	% Padrão	1,40%	0	0 a 0,98%	
PF-PL/AC-XX	X	3	6	3	0,034
	Y	1	5	4	0,008
	Z	15	21	12	<0,001
	W	16	10	5	0,239
	% Padrão	1,4 a 7,4%	5,8 a 24,4%	2,9 a 11,7%	
QH/AC-XX	X	3	1	0	0,657
	Y	7	0	0	0,072
	Z	15	21	12	<0,001
	W	17	4	0	0,004
	% Padrão	1,4 a 7,9%	0 a 4,6%	0 a 11,7%	

O número de indivíduos em cada grupo clínico é função do número de amostras reagentes no compartimento nuclear. As frequências percentuais dos padrões morfológicos foram calculadas em relação ao total de padrões encontrados em cada substrato em cada grupo clínico. O significado de todas as siglas está discriminado no

encarte de abreviações. Nível de inferência estatística calculado pelo teste exato de Fisher comparando a frequência de cada padrão entre os três grupos clínicos.

O padrão nuclear AC-4 demonstrou um comportamento heterogêneo a depender do substrato de análise. Nas marcas X e Y, este padrão mostrou sua predominância no grupo DAI, mas também teve expressiva participação nos Grupos DNAI e DAI nas marcas de lâminas Z e W. Interessantemente, no Grupo DS a frequência do padrão AC-4 foi 4 vezes mais alta com a lâmina Z em relação à lâmina Y. Já o padrão nuclear AC-2 ocorreu predominantemente no Grupo DS, mas com menor frequência nas lâminas Y e Z. O padrão nuclear QH/AC-XX foi mais frequente com as lâminas Z e W. Intrigantemente, este padrão mostrou frequência semelhante entre os grupos clínicos com a lâmina Z, enquanto nas outras três lâminas (X, Y e W), ocorreu com maior frequência no grupo DAI. (Tabela 22).

Figura 15 - Distribuição dos mais prevalentes padrões nucleares por grupo clínico entre os quatro substratos de lâmina HEp-2



O número de indivíduos em cada grupo clínico é em função do número de amostras reagentes no compartimento nuclear. As frequências percentuais dos padrões morfológicos foram calculadas em relação ao total de padrões encontrados em cada substrato em cada grupo clínico. Código AC: código alfanumérico ICAP; AC-XX: código que precede padrões morfológicos não inclusos no ICAP. O significado de todas as siglas está discriminado no encarte de abreviações.

Dentre os padrões citoplasmáticos, o AC-21 foi o padrão mais frequentemente encontrado no Grupo DAI, ocorrendo em menor frequência no Grupo DNAI e praticamente

não ocorrendo no Grupo DS. Os demais padrões apresentam baixa frequência, o que prejudicou a avaliação de sua distribuição nos três grupos clínicos (**Tabela 23**).

Tabela 23. Frequência dos padrões citoplasmáticos por grupo clínico nos quatro substratos de lâmina HEp-2

Padrão	Substrato	Grupo clínico			p
		DAI (n=77)	DNAI (n=33)	DS (n=8)	
AC-19	X	3	1	1	0,402
	Y	2	1	1	0,305
	Z	0	0	1	0,072
	W	0	0	0	-
	% Padrão	0 a 3,9%	0 a 3,0%	0 a 12,5%	
AC-20	X	3	1	1	0,402
	Y	2	1	1	0,305
	Z	0	0	1	0,072
	W	0	0	0	-
	% Padrão	0 a 3,9%	0 a 3,0%	0 a 12,5%	
AC-21	X	42	4	0	<0,001
	Y	35	6	0	0,002
	Z	39	11	1	0,051
	W	29	1	1	<0,001
	% Padrão	37,6 a 54,5%	3,0 a 33,3%	0 a 12,5%	
PAMA/AC-XX	X	1	0	0	1
	Y	2	1	0	1
	Z	2	4	1	0,062
	W	0	0	1	0,072
	% Padrão	0 a 5,6%	0 a 15,1%	0 a 25,0%	
PCD/AC-XX	X	5	2	3	0,032
	Y	2	1	1	0,305
	Z	1	2	1	0,077
	W	0	0	1	0,072
	% Padrão	0 a 3,9%	0 a 6,0%	12,5 a 37,5%	

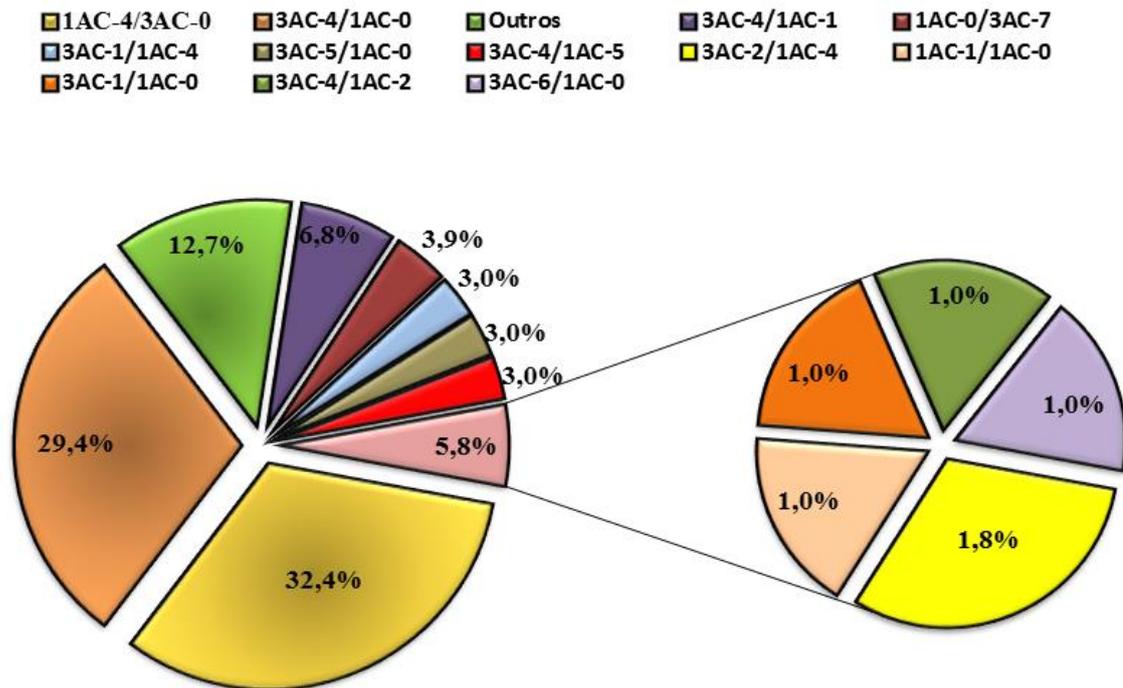
O número de indivíduos em cada grupo clínico é função do número de amostras reagentes no compartimento citoplasmáticos. As frequências percentuais dos padrões morfológicos foram calculadas em relação ao total de padrões encontrados em cada substrato em cada grupo clínico. O significado de todas as siglas está discriminado no encarte de abreviações. Nível de inferência estatística calculado pelo teste exato de Fisher comparando a frequência de cada padrão entre os três grupos clínicos.

5.8. Identificação de padrões com tendência a maior representatividade nas ocorrências de concordância subtotal

Definimos como concordância subtotal os casos em que apenas uma das lâminas apresentou resultado diferente das demais, ao expressar o mesmo padrão morfológico em três lâminas e, com apenas uma discordante (Concordância 3x4). Notamos que 102 amostras

apresentavam concordância subtotal (vide acima **Tabela 18**), sendo que alguns padrões nucleares foram mais frequentemente representados neste contexto. Buscamos averiguar quais foram os padrões divergentes mais frequentemente envolvidos, ou seja, qual o padrão divergia do padrão dominante observado nas outras três lâminas (**Figura 16**).

Figura 16 - Distribuição das ocorrências de concordância subtotal (3X4)

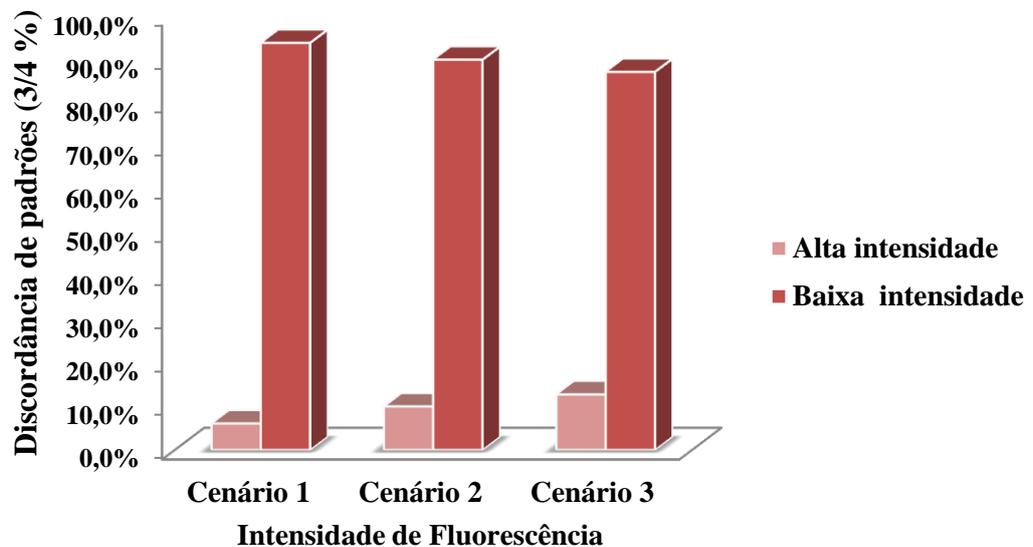


A classificação de concordância subtotal (3x4) é caracterizada pela reatividade de um padrão morfológico observado em três das quatro lâminas. A intensidade de fluorescência foi classificada como Baixa intensidade (+/4 e ++/4) e Alta intensidade (+++/4 e ++++/4).

Esta análise identificou dois cenários predominantes: **A) Cenário 1**, observado em 32,4% dos casos de concordância subtotal, em que uma lâmina mostrava padrão AC-4 e as três outras não apresentavam qualquer reatividade relevante (AC-0); e **B) Cenário 2**, observado em 29,4% dos casos de concordância subtotal, em que três lâminas apresentavam o padrão AC-4 e uma lâmina apresentava ausência de reatividade. Em 6,8% das amostras de concordância subtotal, observou-se o padrão AC-4 em três lâminas e o padrão AC-1 em uma lâmina. Em 12,7% das amostras de concordância subtotal houve uma diversidade de combinações, porém em sua maioria (83,5%) havia os padrões AC-0 ou AC-4 envolvidos na discordância. Esta análise enfatiza a participação do padrão AC-4 como participante de uma proporção significativa de discordância de padrões entre distintas lâminas.

Os cenários 1 e 2 apresentam reciprocidade envolvendo o padrão nuclear AC-4 e o AC-0, correspondendo a 61,8% dos casos de concordância subtotal. Portanto, analisamos em mais profundidade para verificar se a intensidade de fluorescência do padrão AC-4 exercia algum tipo de impacto neste fenômeno. Podemos observar que dentro do cenário 1, 93,1% dos casos envolvia títulos baixos (entre +/4 e ++/4). O mesmo fato ocorreu no cenário 2, em que 90,0% das amostras apresentaram baixa intensidade de fluorescência (+/4 ou ++/4). Ao aplicarmos esta análise aos demais casos de concordância subtotal, unificados como cenário 3 (Figura 17), novamente observamos que as amostras de baixa intensidade de imunofluorescência predominaram (87,2%), assim como havíamos observado nos cenários 1 e 2 (Tabela 24).

Figura 17 - Distribuição da frequência de amostras apresentando concordância subtotal (3x4) envolvendo o padrão nuclear pontilhado fino (AC-4) de acordo com a intensidade de fluorescência



Intensidade de fluorescência: Baixa intensidade +/4 e ++/4; Alta intensidade +++/4 e ++++/4. Cenário 1: padrão AC-4 em 3 lâminas e ausência de reatividade (AC-0) em 1 lâmina. Cenário 2: padrão AC-4 em 1 lâmina e AC-0 em 3 lâminas. Cenário 3: diferentes situações de concordâncias subtotais unificados.

Tabela 24 - Distribuição da intensidade de fluorescência em amostras que apresentaram concordância subtotal

	Classificação						p ¹
	Cenário 1		Cenário 2		Cenário 3		
	N	%	N	%	N	%	
Intensidade de fluorescência	33	100,0%	30	100,0%	39	100,0%	
Alta	2	6,1%	3	10,0%	5	12,8%	0,648
Baixa	31	93,9%	27	90,0%	34	87,2%	
p ²	<0,001		<0,001		<0,001		

¹Nível descritivo do teste exato de Fisher. ²Nível descritivo do teste da binomial (comparação entre proporção de intensidade alta e baixa para cada cenário e total). Intensidade de fluorescência: Baixa intensidade +/4 e ++/4; Alta intensidade +++/4 e ++++/4. Cenário 1: padrão AC-4 em 3 lâminas e ausência de reatividade (AC-0) em 1 lâmina. Cenário 2: padrão AC-4 em 1 lâminas e AC-0 em 3 lâminas. Cenário 3: diferentes situações de concordâncias subtotais unificados.

6. DISCUSSÃO

Embora existam diferentes plataformas de testes para a pesquisa de autoanticorpos, a técnica de imunofluorescência indireta utilizando células HEp-2 (IFI- HEp-2) foi considerada padrão ouro por uma força tarefa do CAR para a triagem desses autoanticorpos ^(1,2,3,4,5,6) e tem sido o teste padrão para esta finalidade em todo o mundo. Por outro lado, este método apresenta limitações e desvantagens, principalmente devido ao fato de que uma considerável parcela de indivíduos não autoimunes apresenta reatividade. Outro problema, menos divulgado e conhecido, refere-se à reprodutibilidade dos resultados do teste de IFI-HEp-2 realizados em lâminas de diferentes marcas. Como já documentado na literatura, este é um fenômeno relevante ^(7,8,9). Entre os fatores envolvidos, chama atenção a grande quantidade de companhias que produzem kits utilizando células HEp-2 como substrato antigênico, com diferentes especificações protocolares em relação às condições de cultivo, formas de fixação e permeabilização das células, bem como conjugados fluorescentes e tampões utilizados nas diversas etapas do ensaio ^(10,11,12). Apesar de alguns estudos prévios a respeito, vários aspectos do fenômeno de não reprodutibilidade do teste IFI-HEp-2 não foram ainda explorados. O presente estudo investiga este fenômeno de forma sistemática, analisando o comportamento de quatro diferentes marcas de lâminas HEp-2 aprovadas por agências reguladoras internacionais frente a amostras de soro de pacientes com doenças autoimunes, doenças não autoimunes (doenças inflamatórias não-autoimunes, infecciosas, neoplásicas e metabólicas) e indivíduos hígidos.

Inicialmente buscamos registrar a frequência de reatividade global obtida com as quatro marcas de lâminas quando testadas com o painel de soros. Nesta comparação, em linhas gerais, observamos considerável diferença entre as quatro marcas, nos três grupos clínicos, sendo que uma das marcas (lâmina Z) apresentou sistematicamente mais resultados positivos, enquanto outra marca (lâmina Y) apresentou sempre menor frequência de reatividade. Saliente-se que as diferenças de frequências entre as lâminas Y e Z foram menos notáveis no grupo de pacientes DAI (89,9% vs 94,5%, respectivamente) do que nos grupos DNAI (47,1% vs 78,2%) e DS (35,8% vs 93,6%). Esta observação sugere que a reatividade obtida com a marca Y apresenta maior correlação clínica que a marca Z. A partir deste achado, aprofundamos a análise comparativa entre pares de lâminas e observamos que a maioria das comparações envolvendo a marca Z apresentava baixos graus de concordância enquanto os pares comparando as outras marcas de lâminas apresentavam graus maiores de concordância. Esse fenômeno ocorreu de forma semelhante nos três grupos clínicos. A seguir

demonstramos que o comportamento atípico da lâmina Z aplica-se a todos os compartimentos celulares, excetuando-se o aparelho mitótico. Deve ser considerado, no entanto, que houve apenas sete amostras com reatividade para o aparelho mitótico, o que limita a significância dos achados em relação este compartimento celular.

Uma vez flagrado o comportamento discrepante da lâmina Z, refizemos a análise de concordância na reatividade global, considerando-se dois cenários, ou seja, com e sem a presença da lâmina Z. Nesta análise, observamos ausência de discordância significativa entre as lâminas X, Y e W em relação à reatividade contra o núcleo e nucléolo, enquanto a inclusão da lâmina Z na comparação resultava em discordância significativa.

Frente a este cenário, nos perguntamos se deveríamos excluir a lâmina Z das análises subsequentes. No entanto, esta é uma das marcas mais utilizadas por laboratórios clínicos e estudos científicos, tanto no Brasil como em nível internacional. De fato, a marca Z está entre as três marcas mais utilizadas por laboratórios participantes dos programas de controle de qualidade do Colégio Americano de Patologia (CAP).

Ademais, os resultados observados em nosso estudo são derivados do desempenho do lote de lâminas a que tivemos acesso para cada marca de kit de IFI-HEp-2. Portanto, o comportamento de cada marca de lâmina poderia apresentar performances diferentes em outros lotes. Este raciocínio também nos orientou na manutenção da lâmina Z nas análises, refletindo a realidade dos laboratórios clínicos que lidam constantemente com variabilidade nos lotes dos insumos.

Portanto, considerando que o estudo pretende analisar o que realmente ocorre na prática clínica e científica em relação ao teste IFI-HEp-2, optamos por manter a marca Z nas análises subsequentes.

Estas ressalvas também se aplicam as lâminas X, Y e W, corroborando a necessidade de seguir as recomendações dos Consensos Brasileiro de IFI-HEp-2 que ressaltam a importância da validação a cada novo kit de lote diferente ⁽⁵⁸⁾.

Uma vez documentado o fenômeno da discordância de resultados IFI-HEp-2 sob a perspectiva de diferentes marcas de lâminas, voltamos o foco para o comportamento das amostras biológicas, propriamente ditas, em relação ao fenômeno de discordância de resultados IFI-HEp-2. A análise da concordância total evidenciou algumas diferenças entre as amostras conforme a sua natureza clínica. Em geral, as amostras de pacientes DAI apresentaram maiores taxas de concordância total, seja para a reatividade global, seja para a reatividade por compartimentos, especialmente nos compartimentos nuclear, citoplasmático e placa metafásica. Intrigantemente, a reatividade com o nucléolo apresentou a menor taxa de

concordância de reatividade que os demais compartimentos celulares, não havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos clínicos para o compartimento nucleolar. De forma geral, esses dados preliminares sugerem que a reatividade das amostras de pacientes DAI se comportam de forma mais consistente que as amostras de DS e pacientes DNAI, independentemente da marca de lâmina utilizada.

A análise da concordância total de reatividade é um critério bastante rigoroso, que tende a realçar a discordância, pois basta haver discordância em um único substrato para que a amostra seja classificada como não concordante. Este critério é válido para salientar que realmente existe um nível de discordância relevante na prática de laboratórios clínicos, que diferem entre si com relação às marcas de kits HEp-2 utilizadas. No entanto, é importante também apreciar o fenômeno da discordância de uma forma mais judiciosa e equilibrada, motivo pelo qual elaboramos o escore ponderado de concordância, pelo qual conseguimos apreciar graus intermediários e crescentes de concordância.

Sob essa perspectiva, podemos apreciar que há, sim, um considerável grau de concordância na reatividade global entre os diversos kits, sendo considerada satisfatória em vários cenários. Não mais observamos os graus de concordância pobre, com havíamos observado no caso da concordância total. Como observado anteriormente, os maiores graus de concordância foram observados para o compartimento nuclear e para as amostras do grupo de pacientes DAI. De fato, a concordância no compartimento nuclear atingiu grau excelente para o grupo de pacientes DAI e grau satisfatório para os grupos de DS e de pacientes DNAI. Novamente, verificamos um comportamento diferenciado dos pacientes DAI cujas amostras de soro apresentam reatividade mais consistente que as dos grupos de DS e pacientes DNAI. Por outro lado, vale ressaltar que as amostras de DS e de pacientes DNAI não diferiram estatisticamente entre si na maior parte das análises.

Ao nos perguntarmos o porquê desse comportamento diferenciado das amostras de pacientes DAI, cogitamos sobre a possibilidade de a intensidade de reatividade das amostras influenciar o fenômeno de discordância nos resultados do teste IFI-HEp-2. Quando comparamos a intensidade de reatividade entre os três grupos clínicos, observamos que as amostras dos pacientes DAI apresentavam intensidade de reatividade superior àquela dos DS e pacientes DNAI. Ao confrontarmos a concordância total de reatividade com a intensidade de reatividade, ficou evidente que o fenômeno de não concordância concentra-se em amostras de baixa intensidade de reatividade, sendo raramente observado nas amostras com intensa reatividade. Esta observação foi confirmada para os três grupos clínicos e para todos os compartimentos celulares. De especial importância, o comportamento diferenciado do grupo

DAI e do compartimento nuclear, anteriormente observados, desapareceu ao igualarmos a intensidade de reatividade nas análises comparativas. Em outras palavras, o grupo DAI e o compartimento nuclear apresentam maiores graus de concordância justamente por que apresentam maior frequência de amostras com alta intensidade de reatividade.

A seguir, voltamos o foco para os padrões IFI-HEp-2, buscando analisar como os diversos padrões se comportam em relação ao fenômeno da discordância em diferentes kits. Seguindo a estratégia de estabelecimento do escore ponderado de concordância, observamos franca variação no grau de robustez dos diversos padrões. Por exemplo, os padrões nucleares AC-3, AC-1, AC-2, AC-5 e AC-6 apresentaram robustez satisfatória a alta, enquanto os padrões nucleares AC-4, AC-7e AC-11/12 apresentaram robustez regular. Entre os padrões citoplasmáticos, somente o AC-21 apresentou grau satisfatório de robustez.

Como havíamos identificado que a intensidade de imunofluorescência interfere significativamente nas associações inicialmente observadas entre concordância nos resultados de distintas lâminas HEp-2 e grupos clínicos ou compartimentos celulares, procedemos à análise semelhante para a robustez dos padrões de imunofluorescência. De fato, observamos que a intensidade de imunofluorescência também tem alguma influência sobre a robustez dos diversos padrões. Assim, os padrões de alta robustez AC-3, AC-5 e AC-1, ocorreram majoritariamente em altos títulos. Porém esta influência é limitada a alguns padrões, não sendo observada em outros. Por exemplo, os padrões nucleares AC-2 e QH/AC-XX apresentaram moderada e baixa robustez, respectivamente, apesar de ocorrerem predominantemente em amostras com alta intensidade de imunofluorescência, indicando uma fragilidade intrínseca desses padrões. De fato, a definição do padrão AC-2 contém nuances que podem não ser bem evidenciados em alguns substratos, o que provavelmente contribui para a modesta robustez apresentada. O padrão QH/AC-XX, observado em alguns substratos, pode se apresentar como homogêneo em outros, justificando sua baixa robustez.

Finalmente, investigamos quais padrões se apresentavam mais frequentemente como discordantes em casos em que apenas uma marca de lâmina discordava das demais (concordância subtotal). Ficou claro que o padrão nuclear AC-4 foi responsável por cerca de 70% dessas ocorrências, evidenciando a proeminência deste padrão como fonte de discordância. Ademais, demonstramos que cerca de 90% das amostras com concordância subtotal apresentava baixa intensidade de reatividade, corroborando a forte influência da intensidade de fluorescência sobre a reprodutibilidade de achados entre diferentes lâminas HEp-2.

Uma vez documentado amplamente o fenômeno de discordância em resultados obtidos com distintos kits de IFI-HEp-2, vale elaborar sobre os possíveis fatores envolvidos e determinantes desse fenômeno. Nessa análise, há que se considerar as diferenças intrínsecas nos componentes dos kits investigados bem como os lotes avaliados. Ao cotejarmos nossos achados à primeira etapa da execução do teste de IFI-HEp-2, que se inicia com a diluição da amostra em reagentes fornecidos pelos fabricantes, observamos que algumas marcas utilizam tampões de diluição proprietários (cujas formulações não são reveladas), diferentes daqueles empregados durante a lavagem da reação. Frequentemente estes diluentes de amostra são desenvolvidos especificamente para a eliminação de possíveis interferentes das reações e diminuição do ruído de fundo (*background*), podendo ser parcialmente responsáveis pelas diferenças nas frequências de reatividade obtidas com essas lâminas. Embora os conjugados dos diferentes kits comerciais em estudo sejam igualmente compostos por anticorpos anti-IgG humana (cadeias leve e pesada), estas são preparações policlonais e certamente com diversas diferenças intrínsecas na composição de imunoglobulinas, relação proteína/fluoresceína e diluição de uso. Cabe reiterar que utilizamos cada kit conforme as instruções do fabricante, portanto, utilizamos o conjugado conforme disponível no kit, apenas adequando a diluição para as condições dos nossos microscópios ⁽⁵⁸⁾.

Outro aspecto de grande importância refere-se ao próprio substrato antigênico representado pelas células HEP-2. As condições de cultivo e fixação das células influenciam sobre maneira a disponibilidade das diversas macromoléculas e respectivos epítomos. Este é um ponto crucial, pois os epítomos reconhecidos por autoanticorpos são restritos em termos de domínio celular e também em termos de conformação espacial. Cada sistema de autoanticorpos tem epítomos preferenciais e frequentemente são epítomos tridimensionais existentes apenas na conformação terciária das moléculas. Em alguns casos são epítomos quaternários supramoleculares formados pela junção de duas ou mais macromoléculas em estado de interação ^(67,68,69,70). Como esperado, esses epítomos especiais podem não estar satisfatoriamente presentes em alguns substratos celulares em função das condições de cultivo e fixação. A própria distribuição e abundância relativa de algumas macromoléculas pode ser francamente influenciada pelas condições de cultivo e fixação celular. Portanto, é razoável atribuir às condições de cultivo e fixação celular parte da discordância na reatividade e nos padrões IFI-HEp-2 em distintos kits registrada neste estudo.

De fato, alguns estudos documentam alguns desses pontos. Paiwon et al, (2010) procuraram identificar as melhores condições de cultura e fixação de células HEP-2 para o ensaio de IFI, utilizando metanol-acetona e paraformaldeído como fixadores sob diferentes

protocolos de tempos de incubação. Células fixadas sob esses diversos protocolos e um kit comercial de IFI-HEp-2 foram testadas com amostras de soro que continham autoanticorpos contra diferentes regiões celulares ⁽⁶⁷⁾. Neste experimento, observou-se que os diferentes tipos de protocolos impactavam de forma distinta o reconhecimento de autoantígenos nos diversos compartimentos celulares. A dependência da forma de fixação promoveu favorecimento na visualização de antígenos de um determinado compartimento celular em detrimento de outro, inclusive quando estes protocolos eram comparados ao kit comercial ⁽⁶⁷⁾.

Alguns outros estudos prévios nos fornecem base técnica experimental para explicar a inconsistência de resultados entre lâminas HEp-2 distintas, apontando que estas variações resultam, ao menos parcialmente, dos diferentes protocolos de fixação e permeabilização das células HEp-2, capazes de modificar a estrutura e composição dos compartimentos celulares, tamanho dos núcleos e nucléolos, e a disponibilidade de epítomos para reconhecimento pelos autoanticorpos ^(50,67,72).

Recentemente, demonstrou-se a participação do nucléolo no estresse celular, respondendo com alterações em sua estrutura, composição molecular e função ^(73,74). *In vitro*, as condições da cultura celular, a concentração iônica do meio, a formulação química utilizada nos tampões e os tempos de fixação e permeabilização das células podem induzir graus variados de estresse celular, com consequentes variações na morfologia e composição molecular de diversos compartimentos das células HEp-2, incluindo o nucléolo, alterando desta maneira, a disponibilidade de epítomos para reconhecimento pelos anticorpos e, por consequência, afetando o perfil da reatividade da amostra.

A monocamada de células HEp-2 em lâminas de vidro permite a detecção de dezenas de autoanticorpos contra diferentes autoantígenos, sendo que os padrões de IFI refletem a distribuição topográfica desses autoantígenos bem como seu comportamento ao longo das fases do ciclo celular. Portanto, os padrões IFI-HEp-2 fornecem uma indicação preliminar dos possíveis autoanticorpos presentes na amostra em teste ^(37,38,47,75,76). O reconhecimento deste importante aspecto dos padrões IFI-HEp-2 tem estimulado um progressivo engajamento nacional e internacional para a harmonização da nomenclatura dos padrões de IFI-HEp-2 ^(28, 32, 45,48). No entanto, a falta de informação a respeito dos efeitos das formas de fixação e permeabilização das células HEp-2 em lâminas comerciais sobre os padrões de IFI-HEp-2 e a incerteza da capacidade de resistência dos epítomos representam possíveis ameaças à real harmonização de resultados entre diferentes laboratórios.

Por este motivo, decidimos incorporar ao estudo todos os padrões morfológicos catalogados pelo ICAP, acrescidos dos padrões reconhecidos somente pelo consenso

Brasileiro ^(47,60) e de alguns padrões ainda não catalogados, objetivando verificar especificamente como cada padrão IFI-HEp-2 se comporta em relação à reprodutibilidade em distintas marcas de lâminas. Como relatado previamente por Dellavance et al, (2013) e confirmado no presente estudo, vários padrões IFI-HEp-2 não foram igualmente reconhecidos em distintos substratos ⁽⁵³⁾, o que refletiu diretamente na heterogeneidade do escore de robustez dos diferentes padrões IFI-HEp-2.

A importância em se determinar o escore de robustez dos padrões de IFI-HEp-2 não se resume em demonstrar somente a capacidade antigênica de um epítipo em resistir as diferenças de protocolos de fixação, mas expõe as possíveis fragilidades das informações por trás da identificação do padrão observado. Assim, o reconhecimento adequado do padrão IFI-HEp-2 permite orientar os imunoenaios subsequentes para determinação da especificidade antigênica, contribuindo assim para a elaboração das hipóteses diagnósticas mais plausíveis. Logo, o grau de robustez de cada padrão IFI-HEp-2 resvala de forma proporcional na consistência do seu significado imunológico e clínico ⁽⁴⁷⁾.

Por exemplo, o padrão AC-3 é sugestivo de anticorpo anticentrômero contra as proteínas A, B e C (CENP-A de 17 kDa, CENP-B de 80 kDa e CENP-C de 140 kDa) ^(7, 48, 49, 77,78). Esses autoanticorpos têm associação clínica estabelecida com ES e CBP. Este padrão encontra-se descrito em ambos os consensos e seu escore de robustez foi classificado como excelente no presente estudo. Sob as análises de Paiwon et al, (2010) o padrão AC-3 foi detectado em todos os substratos testados, sendo que em apenas um dos distintos protocolos de fixação foram notadas reações inespecíficas que não interferiram na visualização correta deste padrão ⁽⁶⁷⁾. Tal informação se harmoniza com nossos achados, e nos permite sugerir que os alvos moleculares do anticorpo anticentrômero são altamente robustos, sofrem baixo impacto das diferentes formas de fixação, sendo este padrão consistente em distintas marcas de lâminas IFI-HEp-2. Além disso, constatamos que este padrão ocorre essencialmente em altos títulos.

Outro padrão IFI-HEp-2 que merece destaque é o AC-5, que sugere fortemente anticorpos anti-U1-RNP e/ou anti-Sm. O anticorpo anti-Sm é um marcador específico de LES, enquanto o anti-U1-RNP é critério obrigatório no diagnóstico da DMTC, mas pode estar associado em casos de LES e com menor frequência na ES ^(7,48,49). Sua morfologia é caracterizada por um pontilhado nuclear grosseiro, marcado por pontos heterogêneos em tamanho e brilho, não corando a cromatina nas células mitóticas. Os alvos moleculares deste padrão são as proteínas do complexo do “spliceosome”, reconhecidas pelos anticorpos anti-RNP e anti-Sm ^(35,37,75). Este padrão está presente nos consensos nacional e internacional, e

em nosso estudo obteve escore de robustez satisfatório sendo expresso igualmente nas quatro lâminas essencialmente dentro do contexto patológico das doenças autoimunes e em altos títulos ^(48,60). Dellavance et al, (2013) já haviam relatado alta reprodutibilidade deste padrão em uma comparação utilizando oito marcas de lâminas HEp-2 ⁽⁵³⁾. Ainda assim, Guillot, et al, (2004) demonstraram que diferentes protocolos de fixação interferem diretamente na distribuição de determinados alvos antigênicos, ocasionando a perda parcial ou total de proteínas como o antígeno Sm, afetando diretamente a expressão do padrão morfológico no teste de IFI-HEp-2 ⁽⁷⁹⁾.

Outro exemplar desta coleção de padrões morfológicos em nosso estudo é marcado pelo reconhecimento da proteína p95 pelo anticorpo anti-Sp100, que resulta no padrão AC-6. O anticorpo anti-Sp100 é sugestivo de CBP ^(7,48,49,60). Embora este padrão tenha se mostrado satisfatoriamente robusto e ocorrido com maior frequência em altos títulos, o número de amostras que apresentavam este padrão não foi suficiente para estabelecer significância estatística em relação ao grau de intensidade de fluorescência.

Um outro padrão IFI-HEp-2 que merece destaque é o padrão nuclear AC-1, pela sua importância clínica como marcador de autoanticorpos associados ao LES, lúpus induzido por drogas e Artrite idiopática juvenil em associação com uveíte na forma oligoarticular e na Síndrome de Felty. Este padrão é frequentemente ocasionado por anticorpos contra o DNA nativo, nucleossomos ou histona, quando no contexto do LES ^(7,28,31,48,49,60). O padrão AC-1 se mostrou mais frequente em três dos quatro substratos avaliados no estudo e, em quase toda sua totalidade, foi encontrado dentro do grupo clínico DAI e em altos títulos. Neste estudo, obtivemos escore de robustez satisfatório para este padrão, ao passo que Paiwon et al, (2010) encontraram que todas as lâminas testadas em suas observações foram capazes demonstrar o padrão AC-1. É possível que o número restrito de amostras clínicas utilizadas naquele estudo tenha limitado a oportunidade de observação de algum grau de discordância entre kits, como observada no presente estudo ⁽⁶⁷⁾.

A análise do padrão AC-1 nos remete a outro ponto a ser discutido, o padrão nuclear QH/AC-XX, que alcançou um escore de robustez pobre (9,1), porém notoriamente expresso de forma significativa em altos títulos. Este padrão consta na classificação do Consenso Brasileiro de IFI-HEp-2 ⁽⁶⁰⁾ e se encaixa em diferentes condições clínicas de autoimunidade fisiológica e patológica, apresentando significado imunológico e clínico distinto daquele do padrão AC-1. Sua morfologia caracteriza-se por um pontilhado fino extremamente delicado, que se aproxima da textura homogênea, com placa metafásica corada de maneira semelhante. Certamente, o padrão QH/AC-XX é classificado como padrão AC-1 pela maior parte dos

investigadores fora do Brasil, pois o mesmo ainda não foi apresentado ao ICAP e não consta de sua classificação. De fato, a diferenciação entre os padrões AC-1 e QH/AC-XX é subjetiva e sutil, o que pode ser responsável, ao menos parcialmente, pela baixa reprodutibilidade deste padrão nas distintas lâminas HEp-2, bem como pela aparente discrepância dos nossos achados sobre o padrão AC-1 em relação aos achados do grupo de Paiwon (vide acima).

O padrão AC-2 tem grande interesse, por ser responsável por considerável proporção de resultados positivos em títulos moderados a altos em indivíduos sem evidência de autoimunidade sistêmica. Em nosso estudo, estes achados foram confirmados ao demonstrarmos sua maior ocorrência em altos títulos e também sua maior frequência nos grupos DS e DNAI. Este padrão, fortemente associado ao anticorpo anti-DFS70, exibe um pontilhado peculiar, de distribuição heterogênea com áreas de pontilhado intenso e grosseiro intercaladas com áreas de pontos mais esparsos e delicados ^(5,28,60,80). Este padrão foge completamente às características dos padrões AC-1e QH/AC-XX, porém, impactado pelas características do substrato, pode apresentar variações em sua granulação. Estas divergências entre as marcas de lâminas analisadas refletiram diretamente no seu escore de robustez, classificado como regular em nossas análises. Este é um padrão que sugere fortemente a presença de anticorpos anti-DFS70, que devem ser testados em imunoensaio antígeno-específico para confirmação. A presença de anti-DFS70 na ausência de outros autoanticorpos é fortemente sugestiva de ausência de doença autoimune sistêmica.

Ademais, durante a prática laboratorial, observamos ainda a existência do padrão PF-PL/AC-XX que reúne características do padrão AC-4, porém diverge deste padrão, pois apresenta placa metafásica reagente. Neste sentido, este padrão pode gerar controvérsia em relação ao padrão AC-2 já que ambos têm textura pontilhada e coram o núcleo de células em interfase e a cromatina de células mitóticas. Este padrão não se encontra descrito em nenhum dos consensos, mas alguns autores têm proposto que seja classificado como padrão pseudo-pontilhado fino denso ^(76,77,78). Em nossa análise, o padrão PF-PL/AC-XX apresentou escore de robustez pobre, frequentemente expresso em baixos títulos, o que talvez nos demonstre a necessidade de estudos futuros esclarecendo sua possível associação clínica.

O padrão PF-IV/AC-XX também não está catalogado nos consensos nacional e internacional. Trata-se de um padrão extremamente raro e a única amostra disponível apresentou excelente robustez, o que sugere que seus possíveis alvos antigênicos não sofreram variações perante os distintos substratos. Este padrão não está caracterizado do ponto de vista imunológico e clínico.

O padrão morfológico AC-4 é tradicionalmente associado aos anticorpos anti-SS-A/Ro e anti-SS-B/La^(48,60,84), embora frequentemente seja observado na ausência desses autoanticorpos. Anti-SS-A/Ro e anti-SS-B/La, por sua vez, podem ser indicativos de Síndrome de Sjögren primária, LES, Lúpus neonatal e Lúpus cutâneo subagudo. Em nosso estudo, o AC-4 foi o padrão morfológico com a maior frequência, não diferindo em frequência entre os três grupos clínicos, o que indica a não especificidade deste padrão como marcador de autoimunidade. Monce et al, (1994) analisaram o comportamento de amostras de soros sabidamente reagentes para anticorpo anti-SS-A/Ro na reatividade contra células HEp-2 processadas com acetona pura ou a combinação etanol-acetona. Observaram que a solução pura de acetona resultou em uma sensibilidade de 97,5% enquanto que a combinação etanol-acetona demonstrou sensibilidade de 81,3% (89). Este dado contribui ao salientar que diferentes protocolos de fixação modificam a expressão do antígeno SS-A/Ro, impactando na distribuição espacial dos autoantígenos e preservação de epítomos relevantes, corroborando nossos achados ao apontar um escore de robustez regular para o padrão AC-4, com maior ênfase para a frequência de resultados em baixos títulos.

Ainda acerca do comportamento do padrão AC-4, realizamos uma análise sistematizada evidenciando que a falta de concordância do mesmo entre os distintos substratos é observada majoritariamente em baixos títulos. Esta informação reforça as demais análises que evidenciaram maior frequência do fenômeno de discordância nos resultados de IFI-HEp-2 em amostras de baixo título, chamando a atenção para cautela na valorização de resultados em baixos títulos.

Embora haja informações variadas sobre o título ideal para diluição inicial do teste de IFI-HEp-2, o consenso Brasileiro e o ICAP recomendam um valor de 1/80 para diluições sorológicas iniciais^(28,45,60). No entanto, está bem documentado que títulos maiores do resultado IFI-HEp-2 têm maior especificidade e menor sensibilidade para o diagnóstico de doenças autoimunes sistêmicas^(6,86,87). Segundo Brito e colaboradores (2014), em relação ao diagnóstico de LES, a sensibilidade do teste de IFI-HEp-2 nas diluições de 1/80, 1/160, 1/320 e 1/1280 é de 88%, 82 %, 74,8% e 46,8%, respectivamente⁽⁸⁷⁾. Os achados do presente estudo, demonstrando maior inconsistência de resultados entre lâminas em amostras de baixos títulos, reforçam o conceito de que amostras reativas em baixos títulos devam ser consideradas judiciosamente, tendo potencialmente menor significado clínico que aquelas de altos títulos.

Dentre os padrões citoplasmáticos, o AC-21um importante marcador de anticorpos anti-mitocôndria M2 (anti-subunidade E2 da piruvato desidrogenase) e, portanto deve trazer à consideração a possibilidade de CBP^(28,48,60,88). O padrão AC-21,foi o principal padrão

citoplasmático encontrado no Grupo DAI, ocorrendo predominantemente em altos títulos. Os demais padrões apresentaram distribuição semelhante nos três grupos clínicos. Esta diferença talvez justifique o achado de que o AC-21 foi o único padrão citoplasmático com robustez satisfatória. A baixa robustez encontrada nos demais padrões citoplasmáticos indica que os autoantígenos deste compartimento sofrem maior influência dos diferentes protocolos de preparação e execução dos kits IFI-HEp-2. Esta observação faz sentido, se pensarmos que os antígenos nucleares estão mais protegidos pela barreira adicional do envelope nuclear dos efeitos dos processos de fabricação das lâminas HEp-2. Ademais, a maior parte das amostras com padrões citoplasmáticos, exceto pelo padrão AC-21, apresentou reatividade de baixa intensidade, característica que favoreceu a discordância de resultados entre distintas lâminas HEp-2.

Como mencionado, a motivação para a elaboração deste estudo foi promover uma análise sistemática do fenômeno de heterogeneidade de resultados IFI-HEp-2 em diferentes marcas de lâminas de células HEp-2 frente a amostras de soro de diferentes contextos clínicos. Os resultados observados neste estudo documentam objetivamente o fenômeno da discordância de resultados obtidos com distintas marcas de lâminas IFI-HEp-2 e como este fenômeno afeta os vários padrões dos diferentes compartimentos celulares e se relaciona com a intensidade de fluorescência e grupos clínicos. Assim, evidenciamos que amostras de indivíduos hígidos e de pacientes sem doenças autoimunes apresentam maiores chances de produzir resultados conflitantes em diferentes marcas de lâminas em relação a amostras de indivíduos que apresentem doenças autoimunes, e que este achado é fortemente influenciado pela baixa intensidade de fluorescência e baixos títulos de anticorpos circulantes nos dois primeiros grupos.

Entretanto, é importante salientar que a existência da variabilidade de resultados em imunoenaios é relatada em diferentes plataformas metodológicas e não se restringe apenas à técnica de imunofluorescência indireta, tampouco aos padrões de IFI-HEp-2 ^(22,55,89,90). Ao realizarmos uma varredura na literatura a respeito, observamos uma vasta coleção de estudos explicitando discrepâncias de resultados de amostra de soro submetidas à comparação em distintos ensaios comerciais utilizando a mesma plataforma metodológica ^(55,86,87,88,89,90). Dentre essas plataformas, podemos exemplificar o ELISA (do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), amplamente aplicado na investigação de autoanticorpos. Há múltiplas marcas de testes de ELISA para a pesquisa de um mesmo autoanticorpo e essa metodologia oferece relevantes limitações quanto à capacidade de reprodução de resultados ^(89,91,92,93). Pereira e seus colaboradores, (2014) analisaram o comportamento de seis marcas de kits de

ELISA aplicados à pesquisa de autoanticorpos contra antígenos extraíveis do núcleo (anti-ENA): Anti-U1-RNP, Anti-SS-A/RoAnti-SS-B/La, Anti-Sm, Anti-Jo-1e Anti-Scl-70. Foram testados 265 amostras de soro de indivíduos distribuídos em 144 pacientes com diagnóstico clínico prévio de doenças reumáticas autoimunes e 121 indivíduos com doenças não autoimunes. Nesta condição, observou-se uma alta taxa de discordância entre os distintos kits com relação aos resultados positivos para todos os autoanticorpos testados ⁽⁸⁹⁾. Resultados semelhantes também foram relatados por Jaskowski (1995) e Hans e colaboradores (1999) também comparando kits de ELISA anti-ENAs ^(94,99). Ao que tudo indica, a falta de concordância desses resultados se deve à ausência de harmonização entre os kits, que podem variar entre si em relação à concentração, acessibilidade e estrutura dos epítomos disponíveis dos antígenos adsorvidos na fase sólida ^(94,96,97).

Até o presente momento, não existem recomendações oficiais que determinem diretrizes técnicas para cultura, fixação e permeabilização de células HEp-2 empregadas nas lâminas de IFI-HEp-2. As informações protocolares são restritas aos fabricantes, dificultando a harmonização do teste e contribuindo substancialmente para a heterogeneidade no desempenho das várias lâminas IFI-HEp-2 disponíveis. Conforme documentado no presente estudo, o fenômeno da discrepância do padrão IFI-HEp-2 é bastante frequente e pode ter impacto clínico, gerando dúvidas na interpretação de resultados provenientes de laboratórios distintos. Considerando-se que parte deste fenômeno decorre da heterogeneidade intrínseca dos kits IFI-HEp-2, sugerimos que seja criado um comitê multidisciplinar internacional com o objetivo de elaborar diretrizes oficiais para harmonização na fabricação de lâminas de IFI-HEp-2. Outro corolário prático deste estudo é a observação de que amostras de fraca intensidade apresentam grande probabilidade de inconsistência de reatividade em lâminas HEp-2 distintas, reforçando o conceito de que resultados em baixos títulos devem ser considerados com parcimônia à luz do quadro clínico.

7. CONCLUSÕES

- O fenômeno de não reprodutibilidade de resultados do teste IFI-HEp-2 em distintas lâminas HEp-2 ocorre em frequência relevante, independentemente da natureza clínica da amostra ou do compartimento celular contemplado, sendo especialmente relevante em amostras de baixa intensidade de reatividade.

- Algumas marcas ou lotes de lâminas IFI-HEp-2 discordam em maior proporção em relação aos demais, indicando possíveis peculiaridades intrínsecas no processamento das células ou na constituição de seus componentes.

- A robustez de reprodutibilidade de vários padrões nucleares associou-se a maior intensidade de reatividade dos mesmos, porém alguns padrões nucleares e a maior parte dos padrões citoplasmáticos apresentaram baixa robustez intrínseca, ou seja, independente da intensidade de reatividade das amostras.

- A observação de que amostras com menor intensidade de fluorescência apresentaram maior inconsistência de resultados em lâminas IFI-HEp-2 reforça o conceito de que amostras com títulos baixos devam ser consideradas com parcimônia à luz do quadro clínico.

- A considerável proporção de resultados discrepantes em diferentes lâminas de IFI-HEp-2 indica a necessidade de estabelecimento de diretrizes internacionais para harmonização na fabricação de lâminas e kits, buscando maior consistência de resultados.

8. REFERÊNCIAS

1. Hoffman W, Lakkis FG, Chalasani G.B. Cells ,Antibodies,and More. Clin J Am Soc Nephrol. 2016;11(1):137-54.
2. Tasuku H, Michael R, Andreas R, Frederick A. B Cell Memory and Plasma Cell Development. Molecular Biology of B Cells. Elsevier, United Kingdom,2015;227–49.
3. Elkon K, Casali P. Nature and functions of autoantibodies. Nat Clin PractRheumatol. 2008;4(9):491–8.
4. Wang L, Wang FS, Gershwin ME. Human autoimmune diseases: A comprehensive update. J Intern Med. 2015;278(4):369–95.
5. Mariz HA, Sato EI, Barbosa SH, Rodrigues SH, Dellavance A, Andrade LEC. 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.
6. Agustinelli RA, Rodrigues SH, Mariz HA, Prado MS, Andrade LEC. Distinctive features of positive anti-cell antibody tests (indirect immunofluorescence on HEp-2 cells) in patients with non-autoimmune diseases. Lupus.2019; 28(5):629-634.
7. Didier K, Bolko L, Giusti D, Toquet S, Robbins A, Antonicelli F, Servettaz A. Autoantibodies associated with connective tissue diseases: What meaning for clinicians? Front Immunol. 2018;9: 541.
8. Lacroix-Desmazes S, Kaveri SV, Mouthon L, Ayoub A, Malanchère E, Coutinho A, KazatchkineMD. Self-reactive antibodies Ž natural autoantibodies in healthy individuals. J Immunol Methods. 1998; 216(1-2):117-37.
9. Ma WT, Chang C, Gershwin ME, Lian ZX. Development of autoantibodies precedes clinical manifestations of autoimmune diseases: A comprehensive review. J Autoimmun.2017;83:95–112.
10. Rowley MJ, Whittingham SF. The role of pathogenic autoantibodies in autoimmunity. Antibodies. 2015;4(4):314–53.
11. Ludwig RJ, Vanhoorelbeke K, Leyboldt F, Kaya Z, Bieber K, McLachlan SM, et al. Mechanisms of autoantibody-induced pathology. Front Immunol. 2017;8:603.
12. Biesen R, Dährich C, Rosemann A, Barkhudarova F, Rose T, Jakob O, et al. Anti-dsDNA-NcX ELISA: DsDNA-loaded nucleosomes improve diagnosis and monitoring of disease activity in systemic lupus erythematosus. Arthritis Res Ther. 2011;13(1) R26.

13. Sakakibara S, Arimori T, Yamashita K, Jinzai H, Motooka D, Nakamura S, et al. Clonal evolution and antigen recognition of anti-nuclear antibodies in acute systemic lupus erythematosus. *Sci Rep.* 2017;7(1):1-14.
14. Vos I, Van Mol C, Trouw LA, Mahler M, Bakker JA, Van Offel J, et al. Anticitrullinated protein antibodies in the diagnosis of rheumatoid arthritis (RA): diagnostic performance of automated anti-CCP-2 and anti-CCP-3 antibodies assays. *Clin Rheumatol.* 2017;36(7):1487-92.
15. Takeuchi T, Miyasaka N, Inui T, Yano T, Yoshinari T, Abe T, et al. High titers of both rheumatoid factor and anti-CCP antibodies at baseline in patients with rheumatoid arthritis are associated with increased circulating baseline TNF level, low drug levels, and reduced clinical responses: A post hoc analysis of the RISIN study. *Arthritis Res Ther.* 2017;19(1):1-11.
16. Onofrio FQ, Hirschfield GM, Gulamhusein AF. A practical review of primary biliary cholangitis for the gastroenterologist. *Gastroenterol Hepatol.* 2019;15(3):145–54.
17. Manns MP, Lohse AW, Vergani D. Autoimmune hepatitis-Update 2015. *J Hepatol.* 2015;62(1):S100-11.
18. Giordano P, Galli M, Del Vecchio GC, Altomare M, Norbis F, Ruggeri L, et al. Lupus anticoagulant, anticardiolipin antibodies and hepatitis C virus infection in thalassaemia. *Br J Haematol.* 1998;102(4):903-6.
19. Gussin AE, Ignat GP, Varga J, Teodorescu M. Anti – Topoisomerase I (Anti – Scl-70) Antibodies in Patients With Systemic Lupus Erythematosus. 2001;44(2):376–83.
20. Dellavance A, Gallindo C, Soares MG, Pereira N, Mortara RA, Andrade LEC. Redefining the Scl-70 indirect immunofluorescence pattern: autoantibodies to DNA topoisomerase I yield a specific compound immunofluorescence pattern. 2009;48(6):632-7.
21. Nishikai M1, Ohya K, Kosaka M, Akiya K TT. Anti-Jo-1 antibodies in polymyositis or dermatomyositis: evaluation by ELISA using recombinant fusion protein Jo-1 as antigen. *Br J Rheumatol.* 1998;37(4):357-61.
22. Van der Geld YM, Limburg PC, Kallenberg CG. Proteinase 3, Wegener’s autoantigen: from gene to antigen. *J Leukoc Biol.* 2001;69(2):177-90. 23.
23. Hargraves MM, Richmond HMR. Presentation of two bone marrow elements; the tart cell and the L.E. cell. *Proc Staff Meet Mayo Clin.* 1948;21;23(2):25-8.
24. Sundberg RD, LicK NB. LE cells in the blood in acute disseminated lupus erythematosus. *J Invest Dermatol.* 1949;12(2):83.
25. Dellavance A, Andrade LEC. Como interpretar e valorizar adequadamente o teste de anticorpos antinúcleo. *J. Bras. Patol.* 2007;43(3):157–68.

26. Dellavance A, Júnior AG, Cintra AFU, Ximenes AC, Nuccitelli B, Mühlen CA Von, et al. I Consenso Nacional para Padronização dos Laudos de FAN HEp-2. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* 2002; 38(3): 207-216.
27. Christine Castro, D.O, Mark Gourley MD. Interpretation of autoimmune serology. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125(S238–S247):1–23.
28. Franciscantonio PLC, Andrade LEC, Cruvinel WM, Araújo FLE, Dellavance A, Gabriel A, et al. III Consenso Brasileiro para pesquisa de autoanticorpos em células HEp-2: Perspectiva histórica, controle de qualidade e associações clínicas. *J BrasPatol e Med Lab.* 2009;45(3):185–99.
29. Satoh M, Chan EKL, 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.
30. Coons AH ; Kaplan MH. Localization of antigen in tissue cells. II. Improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. *J Exp Med.* 1950;93(1):1–13.
31. Wiik AS, Høier-Madsen M, Forslid J, Charles P, Meyrowitsch J. Antinuclear antibodies: A contemporary nomenclature using HEp-2 cells. *J Autoimmun .* 2010;35(3):276–90.
32. Silva M J,Dellavance A, Andrade LEC, Cruvinel WdeM.Evolução dos Consensos nacional e internacional para padronização da nomenclatura de padrões de autoanticorpos contra antígenos celulares (ANA-HEp-2). *Rev Paul Reum.* 2016;15(3):24–34.
33. Meroni PL, Schur PH. ANA screening: an old test with new recommendations. *Annals of the Rheumatic Diseases.* 2010;69(8) 1420-1422.
34. Kumar Y, Bhatia A, Minz RW. Antinuclear antibodies and their detection methods in diagnosis of connective tissue diseases : a journey revisited. *Diagn Pathol.* 2009;4(1).
35. LemerleJ,Renaudineau Y. Anti-Sm and Anti-U1-RNP Antibodies :An Update. *Lupus .*2016;1(3):2–5.
36. 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.
37. Ihn H, Yamane K, Yazawa N, Kubo M, Fujimoto M, Sato S, et al. Distribution and antigen specificity of anti-U1RNP antibodies in patients with. 1999;383–7.

38. Masi AT. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). Subcommittee for scleroderma criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee. *Arthritis Rheum.* 1980 ;23(5):581-90.
39. Tormey VJ, Bunn CC, Denton CP, Black CM. Anti-fibrillar antibodies in systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford).*2001;1157–62.
40. Haddouk S, Marzouk S, Jallouli M, Fourati H, Frigui M, Hmida YBH, et al. Clinical and diagnostic value of ribosomal P autoantibodies in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford).* 2009 ;48(8):953-7.
41. Carmona-fernandes D, Santos MJ, Canhão H, Fonseca JE. Anti-ribosomal P protein IgG autoantibodies in patients with systemic lupus erythematosus : diagnostic performance and clinical profile. *BMC Med.* 2013;11-98.
42. Fritzler M ,Kinsella T ,Garbutt E. The CREST syndrome: A distinct serologic entity with anticentromere antibodies. *Am J Med.* 1980;69 (4):520–6.
43. Fritzler MJ, Wiik A, Fritzler ML, Barr SG. The use and abuse of commercial kits used to detect autoantibodies. *Arthritis Res Ther.*2003;5(4): 192-201.
44. Dellavance A, Gabriel A, Cintra AFU, Ximenes AC, Nuccitelli B, Taliberti 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. *RevBrasReumatol.* 2000;43(3):129–40.
45. Francescantonio PLC, Cruvinel WdeM, Dellavance A, Andrade LEC, Taliberti BH, von Mühlen CA, et al. IV Brazilian Guidelines for autoantibodies on HEp-2 cells. *RevBras Reumatol.*2014;54(1):44–50.
46. Chan EKL, Damoiseaux J, Carballo OG, Conrad K, Cruvinel deMW, Francescantonio PLC, et al. Report of the First International Consensus on Standardized Nomenclature of Antinuclear Antibody HEp-2 Cell Patterns (ICAP). *Front Immunol.* 2015;6:412.
47. Chan EKL, Damoiseaux J, deMeloCruvinel W, Carballo OG, Conrad K, Francescantonio PLC, et al. Report on the second International Consensus on ANA Pattern (ICAP) workshop in Dresden 2015. *Lupus.* 2016;25(8) :797-804.
48. Damoiseaux J, Andrade LEC, Carballo OG, Conrad K, Francescantonio PLC, Fritzler MJ, et al. Clinical relevance of HEp-2 indirect immunofluorescent patterns: the International Consensus on ANA patterns (ICAP) perspective. *Ann Rheum Dis.* 2019;8(7):879-889.
49. Suleman Bhana. Tracking Concerns about ANA Testing Results. *American College of Rheumatology* 2019.

50. Hahm D, Anderer U. Establishment of HEp-2 cell preparation for automated analysis of ANA fluorescence pattern. *CytomPart A*. 2006;69(3):178–81.
51. Tsiakalou V, Tsangaridou E, Polioudaki H, Castanas E, Theodoropoulos PA. Optimized detection of circulating anti-nuclear envelope autoantibodies by immunofluorescence. *BMC Immunol*. 2006;6(7):20.
52. Stadler C, Skogs M, Brismar H, Uhlén M, Lundberg E. A single fixation protocol for proteome-wide immunofluorescence localization studies. *J Proteomics*. 2010;73 (6):1067-78.
53. Dellavance A, Cruvinel W de M, Francescantonio PLC, Manguiera CLP, Drugowick IC, Rodrigues SH, et al. Variability in the recognition of distinctive immunofluorescence patterns in different brands of HEp-2 cell slides. *J BrasPatol e Med Lab*. 2013;49(3):182-90.
54. Mello RCV de, Rezende DF de, Coutinho BR, Medeiros C de S, Alves Filho EA, Leite GC, et al. Análise comparativa de quatro kits de FAN HEp-2 para a detecção de autoanticorpos séricos. *J Bras Patol e Med Lab*. 2012;48(3):185–93.
55. Pisetsky DS, Spencer DM, Lipsky PE, Rovin BH. Assay variation in the detection of antinuclear antibodies in the sera of patients with established SLE. *Ann Rheum Dis*. 2018;77(6):911-913.
56. Chan EK, Fritzler MJ, Wiik A, Andrade LE, Reeves WH, Tincani A, Meroni PL: The IUIS/WHO/AF/CDC committee for the standardization of autoantibodies in rheumatic and related diseases - AutoAbSC.Org - Autoantibody Standardization Committee in 2006. *Autoimmun Rev*. 6:577-580.
57. Copple SS, Giles SR, Jaskowski TD, Gardiner AE, Wilson AM, Hill HR. Screening for IgG antinuclear autoantibodies by HEp-2 indirect fluorescent antibody assays and the need for standardization. *Am J ClinPathol*. 2012;137(5):825–30.
58. Dellavance A, Gabriel JA, Nuccitelli B, Taliberti BH, von Mühlen C A, Bichara CDA 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. *Bras. Reumatol*. 2009; 49(2): 89-98.
59. Van der Linden M, van denHoogen LL, Westerlaken GHA, Fritsch-Stork RDE, van Roon JAG, Radstake TRDJ, et al. Neutrophil extracellular trap release is associated with antinuclear antibodies in systemic lupus erythematosus and anti-phospholipid syndrome. *Rheumatology (Oxford)*. 2018;57(7):1228–34.
60. Cruvinel W deM, Andrade LEC, von Mühlen CA, Dellavance A, Ximenes AC, Bichara CD, et al. V Brazilian consensus guidelines for detection of anti-cell autoantibodies on hep-2 cells. *Rheumatol*. 2019;59(1):1–11.

61. Landis JR, Koch GG. The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data Data for Categorical of Observer Agreement The Measurement. *Biometrics* 2012;33(1):159–74.
62. Orme ME, Andalucia C, Sjölander S, Bossuyt X. A comparison of a fluorescence enzyme immunoassay versus indirect immunofluorescence for initial screening of connective tissue diseases: Systematic literature review and meta-analysis of diagnostic test accuracy studies. *BEST PRACT RES CL RH*. 2018; 32(4): 521-534.
63. Buchner C, Bryant C, Eslami A, Lakos G. Anti-nuclear antibody screening using HEp-2 cells. *J Vis Exp*. 2014;23(88): e51211.
64. Tebo AE. Recent approaches to optimize laboratory assessment of antinuclear antibodies. *Clin Vaccine Immunol*. 2017;24(12):1–10.
65. Olsen NJ, Choi MY, Fritzler MJ. Emerging technologies in autoantibody testing for rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther*. 2017;19(1):172.
66. Mahler M, Meroni PL, Bossuyt X, Fritzler MJ. Current Concepts and Future Directions for the Assessment of Autoantibodies to Cellular Antigens Referred to as Anti-Nuclear Antibodies. *J Immunol Res*. 2014; 2014:315179.
67. Khuntikij P, Sretriratanachi S. Preparation of HEp-2 Cells for Antinuclear Antibody Detection Using Immunofluorescent Technique. 2010;38(1):3045-3047.
68. Mariuzza RA, Phillips SE, Poljak RJ. The Structural Basis of Antigen-Antibody Recognition. *Annu Rev BiophysBiophys Chem*. 1987;16:139-59.
69. Tello D, Spinelli S, Souchon H, Saul FA, Riottot MM, Mariuzza RA, Lascombe MB, Houdusse A, Eiselé JL, Fischmann T et al. Three-dimensional Structure and Antigen Binding Specificity of Antibodies. *Biochimie*. 1990;72(8):507-12.
70. Sheriff S, Silverton EW, Padlan EA, Cohen GH, Smith-Gill SJ, Finzel BC DD. Three-dimensional structure of an antibody-antigen complex. *Proc Natl Acad Sci*. 1987;84(22):8075-9.
71. Lai JI, Verma D, Bailey-Kellogg C AM. Towards conformational fidelity of a quaternary HIV-1 epitope: computational design and directed evolution of a minimal V1V2 antigen. *Protein Eng Des Sel*. 2018;31(4):121–33.
72. Du L, Fukushima S, Sallmyr A, Manthorpe R, Bredberg A. Exposure of HEp-2 cells to stress conditions influences antinuclear antibody reactivity. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2002;9(2):287–94.
73. Yang K, Yang J, Yi J. Nucleolar Stress: hallmarks, sensing mechanism and diseases. *Cell Stress*. 2018;2(6):125-40.

74. Verheyden Y, Goedert L, Leucci E. Control of nucleolar stress and translational reprogramming by lncRNAs. *Cell Stress*. 2019;3(1):19–26.
75. Migliorini P, Baldini C, Rocchi V BS. Anti-Sm and anti-RNP antibodies. *Autoimmunity*. 2005;38(1):47-54.
76. Dellavance A, Andrade LEC. Detection of Autoantibodies by Indirect Immunofluorescence Cytochemistry on Hep-2 Cells. *Methods Mol Biol*. 2019;1901:19-46.
77. Yoda K, Ando S, Morishita S, Houmura K, Hashimoto K, Takeyasu K, et al. Human centromere protein A (CENP-A) can replace histone H3 in nucleosome reconstitution in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(13):7266-71.
78. 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.
79. Guillot PV, Xie SQ, Hollinshead M, Pombo A. Fixation-induced redistribution of hyperphosphorylated RNA polymerase II in the nucleus of human cells. *Exp Cell Res*. 2004;295(2):460–8.
80. Basu A, Woods-Burnham L, Ortiz G, Rios-Colon L, Figueroa J, Albesa R, et al. Specificity of antinuclear autoantibodies recognizing the dense fine speckled nuclear pattern: Preferential targeting of DFS70/LEDGFp75 over its interacting partner MeCP2. *Clin Immunol*. 2015;161(2) : 241–250.
81. Mahler M, Andrade LE, Casiano CA, Malyavantham KFM. Implications for redefining the dense fine speckled and related indirect immunofluorescence patterns. *Expert Rev Clin Immunol*. 2019;15(5):447-448.
82. Mahler M, Andrade LEC, Casiano CA, Malyavantham KFM. Anti-DFS70 antibodies: an update on our current understanding and their clinical usefulness. *Expert Rev Clin Immunol*. 2019;15(3):241–50.
83. Infantino M, Bizzaro N, Grossi V MM. The long-awaited 'pseudo-DFS pattern. *Expert Rev Clin Immunol*. 2019;15(5):445.
84. González DA, Rodríguez CC, Armas LM, Varela AR, Rodríguez IM, Duarte MT et. Anti-ENA profiles related with anti-SS-A/Ro. The detection of Ro52 and Ro60 according to the presence of SS-B/La, and ANA pattern and titer. *Immunol Lett*. 2014;161(1):6–12.
85. MonceNMJr, Cappel VL SC. A comparison of two fixatives on IFA HEp-2 slides for the detection of antinuclear antibodies. *J Immunoassay*. 1994;15(1):55–68.
86. Tan EM, Feltkamp TEW, Smolen JS, Butcher B, Dawkins R, Fritzler MJ, et al. Range of antinuclear antibodies in “healthy” individuals. *Arthritis Rheum*. 1997;40(9):1601–11.

87. Brito F de A, Santos SME, Ferreira GA, Pedrosa W, Gradiisse J, Costa LC, et al. Detecção de anticorpos antinucleares por imunofluorescência indireta em células HEp-2: Definindo a diluição de triagem adequada para o diagnóstico das doenças reumáticas autoimunes. *Rev Bras Reumatol*. 2014;54(1):13–20.
88. Tomizawa M, Shinozaki F, Fugo K, Motoyoshi Y, Sugiyama T, Yamamoto S, et al. Anti-mitochondrial M2 antibody-positive autoimmune hepatitis. *Exp Ther Med*. 2015;10(4):1419–22.
89. Pereira KMC., Dellavance A. AL. The challenge of identification of autoantibodies specific to systemic autoimmune rheumatic diseases in high throughput operation: Proposal of reliable and feasible strategies. *Clin Chim Acta*. 2014 ;437:203-10.
90. Lee SS, Lawton JW CW. between antinuclear antibody and P-ANCA. *J Clin Pathol*. 1991;44(11):962–3.
91. Clarke MC, Carr R, Burdash NM, Chen ZY, Ainsworth SK. A comparison of three anti-double stranded DNA antibody assays on sera from SLE and other diseases. *Diagn Immunol*. 1986;4(6):288-93.
92. Pisetsky DS. Antinuclear antibody testing-misunderstood or misbegotten? *Nat Rev Rheumatol*. 2017;13(8):495–502.
93. Jaskowski TD, Schroder C, Martins TB, Mouritsen CL, Litwin CM HH. Screening for antinuclear antibodies by enzyme immunoassay. *Am J Clin Pathol*. 1996;105(4):468-73.
94. Jaskowski TD, Schroder C, Martins TB, Mouritsen L HH. Comparison of three commercially available enzyme immunoassays for the screening of autoantibodies to extractable nuclear antigens. *J Clin Lab Anal*. 1995;9(3):166-72.
95. Mishra M, Tiwari S, Gomes AV. Protein purification and analysis: next generation Western blotting techniques. *Expert Rev Proteomics*. 2017 14(11):1037-1053.
96. Monogioudi E, Sheldon J, Meroni PL, Hutu DP, Schimmel H, Zegers I. Certified reference material against PR3 ANCA IgG autoantibodies. from development to certification. *Clin Chem Lab Med*. 2019;57(8):1197-1206.
97. Gniewek RA, Stites DP, McHugh TM, Hilton JF, Nakagawa M. Comparison of antinuclear antibody testing methods: immunofluorescence assay versus enzyme immunoassay. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1997;4(2):185–8.
98. Sinclair D, Saas M, Williams D, Hart M GR. Can an ELISA replace immunofluorescence for the detection of anti-nuclear antibodies? The routine use of anti-nuclear antibody screening ELISAs. *Clin Lab*. 2007;53(3-4):183-91.

99. Van Duijnhoven HL, Van De Warenburg FJ, Willems RJ, Ermens AM. A comparison of ELISA assays as routine diagnostic test for detection of autoantibodies against extractable nuclear antigens. *ClinBiochem.* 1999;32(3):179-83.

9. LISTA DE ANEXOS

9.1. ANEXO I: Lista de critérios de classificação para o diagnóstico das doenças autoimunes

Critérios de classificação para o diagnóstico da Cirrose Biliar Primária

Cirrose Biliar Primária de acordo com as diretrizes da Associação Americana para o estudo das doenças do Fígado (AAEDF) e Associação Europeia para o estudo do Fígado (AEEF) Para o estabelecimento do diagnóstico de (CBP) são necessários a confirmação de pelo menos dois dos três critérios listados abaixo.

Critérios	Alterações
Bioquímico	Evidência de colestase acompanhado do o aumento das enzimas hepáticas
Sorológico	Presença do autoanticorpo antimitocôndria (AMA)
Histológico	Evidência histológica de colangite não supurativa e destruição de ductos biliares interlobulares

Critérios de classificação para o diagnóstico de Esclerose Sistêmica

Critérios Diagnósticos da Esclerose Sistêmica em atividade de acordo com o CAR e da Liga Europeia contra o Reumatismo (LECR (2013)) *. *Estes critérios são aplicáveis a qualquer paciente para inclusão em um estudo de ES. Os critérios não são aplicáveis a pacientes com espessamento da pele da poupa dos dedos ou para pacientes que apresentem um transtorno de esclerodermia que se explica através de manifestações como, por exemplo, fibrose nefrogênica esclerosante, morféia generalizada, fasciíte eosinofílica, esclerodermia diabética, escleromixedema, eritromialgia, porfíria, líquen escleroso, doença do enxerto - versus hospedeiro e quiroartropatia diabética.

† A pontuação total é determinada pela adição da pontuação máxima (score) em cada categoria. Os pacientes com pontuação maior ou igual a 9 são classificados como tendo o diagnóstico de ES definitiva.

Item	Subitem	Score †
Espessamento da pele dos dedos de ambas as mãos estendendo-se para as articulações Metacarpo falangeanas proximal (critério suficiente)	----	9
Espessamento da pele dos dedos das mãos (contar apenas a pontuação mais elevada)	Dedos inchados Esclerodactilia dos dedos (das articulações metacarpo falangeanas distal, e articulações Inter falangeanas proximais.	2 4
Lesõesna ponta dos dedos (contar apenas a pontuação mais elevada)	Úlceras nas extremidades das digitais e Cicatrizesna ponta dos dedos	2 3
Telangiectasia	----	2
Capilaroscopia <i>periungueal anormal</i>	----	2
A hipertensão arterial pulmonare / ou doença intersticial pulmonar (pontuação máxima 2)	A hipertensão arterial pulmonar Doença intersticial pulmonar	2 2
	---	3
Autoanticorpos relacionados à ES (anticentrômero, antitopoisomerase I (SCL-70), Anti-RNA polimerase III) (pontuação máxima de 3)	Anticentrômero Antitopoisomerase I Anti-RNA polimerase III	3

9.2. Critérios codificados para o Diagnóstico de Hepatite autoimune pelo Grupo Internacional

Características	Definitiva	Provável
Histologia hepática	Interface de atividade da hepatite de moderada ou grave, com ou sem hepatite lobular ou portal ponte central de necrose, mas sem lesões biliares ou granulomas bem definidos ou outras alterações proeminentes sugestivos de uma etiologia diferente.	Segue o mesmo critério adotado na "definitiva"
Bioquímica sérica	Qualquer anormalidade nas enzimas aminotransferases, especialmente, se a fosfatase alcalina do soro não for significativamente elevada. Concentrações séricas de alfa-antitripsina, cobre e ceruloplasmina normal.	Segue o mesmo critério adotado na "definitiva" mas os pacientes com concentrações séricas anormais de cobre ou ceruloplasmina podem ser incluídos, desde que a doença de Wilson seja excluída por investigação apropriada
Imunoglobulinas séricas	Globulina sérica total, gama globulinas ou a concentração de IgG superiores a 1,5 vezes ao limite superior da normalidade	Qualquer elevação de globulina do soro, gama globulina ou concentrações de IgG acima do limite superior da normalidade
Autoanticorpos séricos	Positividade para ANA, AML, ou anticorpos anti-LKM 1 em títulos maior que 1:80. Títulos mais baixos (especialmente de anti LKM 1) pode ser significativo em crianças. Soro negativo para AMA.	Segue o mesmo critério adotado na "definitiva" mas com diferenças nos títulos \geq 1:40. Pacientes que são soronegativos para estes anticorpos, mas que são soropositivos para outro anticorpos especificados neste contexto pode ser incluído.
Marcadores Virais	Soro negativo para marcadores de infecção para os vírus da hepatite A, B, e C	Segue o mesmo critério adotado na "definitiva"
Outros fatores etiológicos	Consumo médio de álcool inferior a 25 g / dia. Sem história de uso recente de drogas hepatotóxicas conhecidas.	O consumo de álcool inferior a 50 g / dia sem o uso recente de drogas hepatotóxicas conhecidas. Pacientes que tenham consumido grandes quantidades de álcool ou que tenham tomado recentemente potenciais drogas hepatotóxicas podem ser incluídos, Clara evidência de danos no fígado após a abstinência de álcool ou retirada da droga

Tabela de critérios de classificação para o diagnóstico de Lúpus Eritematoso Sistêmico segundo os do ACR de 1997. Encaixam-se nestes critérios os pacientes que apresente quatro dos onze critérios.

1. Eritema malar: lesão eritematosa fixa em região malar, plana ou em relevo.
2- Lesão discóide: lesão eritematosa, infiltrada, com escamas queratóticas aderidas e tampões foliculares, que evolui com cicatriz atrófica e discromia.
3. Fotossensibilidade: exantema cutâneo como reação não-usual à exposição à luz solar, de acordo com a história do paciente ou observado pelo médico.
4. Úlceras orais/nasais: úlceras orais ou nasofaríngeas, usualmente indolores, observadas pelo médico.
5. Artrite: não-erosiva envolvendo duas ou mais articulações periféricas, caracterizadas por dor e edema ou derrame articular.
6. Serosite: pleuritis (caracterizada por história convincente de dor pleurítica, atrito auscultado pelo médico ou evidência de derrame pleural) ou pericardite (documentado por eletrocardiograma, atrito ou evidência de derrame pericárdico).
7. Comprometimento renal: proteinúria persistente (> 0,5 g/dia ou 3+) ou cilindrúria anormal.
8. Alterações neurológicas: convulsão (na ausência de outra causa) ou psicose (na ausência de outra causa).
9. Alterações hematológicas: anemia hemolítica ou leucopenia (menor que 4.000/mm em duas ou mais ocasiões) ou linfopenia (menor que 1.500/mm ³ em duas ou mais ocasiões) ou plaquetopenia (menor que 100.000/mm ³ na ausência de outra causa).
10. Alterações imunológicas: anticorpo antiDNA ou anti-Sm ou presença de anticorpo antifosfolípide com base em: a) níveis anormais de IgG ou IgM anticardiolipina; b) teste positivo para anticoagulante lúpico; ou c) teste falso-positivo para sífilis, por, no mínimo, seis meses.
11. Anticorpos antinucleares: título anormal de anticorpo antinuclear por imunofluorescência indireta ou método equivalente, em qualquer época, e na ausência de drogas conhecidas por estarem associadas à síndrome do lúpus induzido por drogas.

9.3. Critérios de classificação para o diagnóstico para a Síndrome de Sjögren

Aplica-se a indivíduos com sinais / sintoma sugestivo de SS, e serão aplicados a pacientes que tenham pelo menos dois dos três critérios e característicos objetivos.

1. Anti-SSA/Ro positivo no soro e / ou anti-SSB/La ou (fator reumatóide positivo e ANA título $\geq 1:320$)
2. Biópsia de glândula salivar de mucosa labial exibindo uma sialoadenitelinfocítica com score focal de ≥ 1 foco / 4 mm²
3. Ceratoconjuntivite seca com coloração ocular score ≥ 3 (assumindo que o indivíduo não está usando colírios diariamente para glaucoma e não fez cirurgia de córnea ou cirurgia corretiva das pálpebras nos últimos 5 anos)

Diagnóstico prévio de qualquer uma das seguintes condições excluiria a participação em estudos SS ou ensaios terapêuticos por causa das características clínicas que se sobrepõem ou interferem com os testes estabelecidos nos critérios:

História da radioterapia de cabeça e pescoço

Infecção por hepatite C

Síndrome da imunodeficiência adquirida

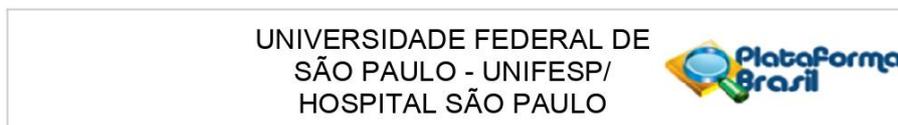
Sarcoidose

Amiloidose

Doença enxerto versus hospedeiro

Doenças relacionadas com a IgG4

9.4. Anexo II: Parecer Consubstanciado do CEP via Plataforma Brasil



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DA REPRODUTIBILIDADE DE PADRÕES MORFOLÓGICOS NO TESTE DE AUTOANTICORPOS CONTRA ANTÍGENOS CELULARES (FAN-HEP-2) EM DIFERENTES SUBSTRATOS

Pesquisador: Mônica de Jesus Silva

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 36868414.0.0000.5505

Instituição Proponente: Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP/EPM

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 945.320

Data da Relatoria: 03/02/2015

Apresentação do Projeto:

Trata-se de resposta de pendências apontadas no parecer 824.153.

Objetivo da Pesquisa:

resposta de pendências apontadas no parecer 824.153.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

resposta de pendências apontadas no parecer 824.153.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

resposta de pendências apontadas no parecer 824.153.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

resposta de pendências apontadas no parecer 824.153.

Recomendações:

Se houver inclusão de amostras da COLSAN, deverá apresentar autorização e ciência do uso do material.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

1) Apresentar autorização e ciência do guardião das amostras estocados para sua utilização no presente projeto (disciplina da reumatologia e da COLSAN).

Endereço: Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14	CEP: 04.023-061
Bairro: VILA CLEMENTINO	Município: SAO PAULO
UF: SP	E-mail: cepunifesp@unifesp.br
Telefone: (11)5539-7162	Fax: (11)5571-1062

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SÃO PAULO - UNIFESP/
HOSPITAL SÃO PAULO



Continuação do Parecer: 945.320

APRESENTADA CARTA DA DISCIPLINA DE REUNATOLOGIA, PORÉM NÃO DA COLSAN.

2) De acordo com a resolução CNS 441/11: TCLE - utilização de material estocado em biorrepositório, em nova pesquisa: Portaria MS 2201 de 14 de setembro de 2011 Art. 18. O sujeito da pesquisa deverá ser contatado para consentir, a cada nova pesquisa, sobre a utilização do material biológico humano armazenado em biorrepositório, formalizando-se o consentimento por meio de TCLE específico. Os pacientes serão reconsentidos para utilização de suas amostras na presente pesquisa?

RESPONDIDO.

3) Adequar o TCLE apresentado: - é necessário informar que o termo está sendo disponibilizado em 2 vias originais (e não 2 cópias), uma para ficar com o participante e outra para ficar com o pesquisador. - todas as folhas devem ser numeradas (ex: 1/4, 2/4, etc.) e rubricadas pelo pesquisador e pelo participante da pesquisa no momento da aplicação do TCLE.

RESPONDIDO.

4) Adequar o TCLE à Resolução CNS 466/2012, IV- b) prestar informações em linguagem clara e acessível, utilizando-se das estratégias mais apropriadas à cultura, faixa etária, condição socioeconômica e autonomia dos convidados a participar da pesquisa.

Há trechos de difícil compreensão para a população de participantes da pesquisa, como por exemplo: " A imunofluorescência indireta utilizando células HEp-2 como substrato antigênico é o teste padrão ouro para a pesquisa de autoanticorpos contra antígenos celulares (FAN-HEp-2). Contudo, as condições de cultivo, fixação e permeabilização celular interferem diretamente na preservação e distribuição espacial dos antígenos. Portanto, pode se presumir que distintas condições no preparo das células possam interferir no reconhecimento dos padrões de imunofluorescência associados aos diversos autoanticorpos. Sendo assim nosso objetivo é avaliar a reprodutibilidade dos resultados obtidos em substratos de células HEp-2 de diferentes fornecedores frente a amostras de soro de pacientes com doenças autoimune e não autoimunes", "A obtenção do soro ocorrerá pela centrifugação sendo posteriormente armazenados a -70°C ADEQUADO

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14
Bairro: VILA CLEMENTINO **CEP:** 04.023-061
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)5539-7162 **Fax:** (11)5571-1062 **E-mail:** cepunifesp@unifesp.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SÃO PAULO - UNIFESP/
HOSPITAL SÃO PAULO



Continuação do Parecer: 945.320

Considerações Finais a critério do CEP:

O CEP informa que a partir desta data de aprovação, é necessário o envio de relatórios semestrais (no caso de estudos pertencentes à área temática especial) e anuais (em todas as outras situações). É também obrigatória, a apresentação do relatório final, quando do término do estudo.

SAO PAULO, 04 de Fevereiro de 2015

Assinado por:
Miguel Roberto Jorge
(Coordenador)

Endereço: Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14
Bairro: VILA CLEMENTINO **CEP:** 04.023-061
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)5539-7162 **Fax:** (11)5571-1062 **E-mail:** cepunifesp@unifesp.br

9.5. ANEXO III Relação dos projetos de pesquisa aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP com anuência para utilização de amostras em projetos futuros contidas no banco de dados da disciplina de Reumatologia da UNIFESP

1- Cirrose Biliar Primária

Titulação: “Características da resposta autoimune humoral e celular em indivíduos na fase subclínica da cirrose biliar primária”.

O Presente trabalho possui Carta de aprovação e parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa Institucional do Parecer: 5779.13 N° CEP: 01.246-903.

2- Esclerose Sistêmica

Titulação: “Associação entre marcadores séricos e alterações na microcirculação em pacientes com fenômeno de Reynaud”

O Presente trabalho possui Carta de aprovação e parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa Institucional. N ° CEP: 0825/10.

3- Hepatite Autoimune e pacientes infectados pelo Vírus da Hepatite C:

Titulação: “Caracterização de autoanticorpos associados ao padrão de imunofluorescência Rods&Rings em pacientes infectados com o vírus da Hepatite C”.

O presente trabalho possui Carta de aprovação e parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa Institucional. N° CEP: 0381/09.

4- Lúpus Eritematoso Sistêmico

Titulação: “Avaliação do título e padrão de FAN (fator antinúcleo) em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico em atividade e fora de atividade de doença”

O presente trabalho possui Carta de aprovação e parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa Institucional. N° 188.661 CEP:04.023-061

5- Outras doenças não autoimunes: hipertensão arterial, Câncer, pacientes psiquiátricos e pacientes infectados pelo vírus da Imunodeficiência Humana (HIV)

Titulação: “Caracterização do Padrão de Fluorescência de Anticorpos Antinúcleo em Enfermos Não Autoimunes”.

O presente trabalho possui Carta de aprovação e parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa Institucional. N ° 378.820. CEP 04.023-061.

6- Indivíduos hígidos

Estas amostras são provenientes do banco do Sangue Colson São Paulo doados para pesquisa que incluem diferentes tipos de projetos. A utilização destas amostras pertencentes ao nosso banco de dados já possui Carta de aprovação e parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa Institucional. N° 341.624 CEP: 04.023-061

Através do projeto temático de pesquisa intitulado “Estudo Multifacetado do fenômeno de autoanticorpos em indivíduos normais”

9.6. Anexo IV: Termo de Consentimento livre e Esclarecido

1 – Título do projeto: Reprodutibilidade de padrões morfológicos no teste de autoanticorpos contra antígenos celulares (FAN-HEp-2) em diferentes substratos.

2 – Desenho do estudo e objetivo(s) “essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo. Normalmente, os anticorpos são elementos fundamentais na defesa do organismo. Entretanto, algumas vezes estes anticorpos se voltam contra constituintes celulares denominando-se autoanticorpos responsáveis pelo desenvolvimento de doenças autoimunes como a Artrite reumatóide, Lúpus Eritematoso Sistêmico, etc. A imunofluorescência indireta utilizando células HEp-2 como substrato antigênico é o teste padrão ouro para a pesquisa de autoanticorpos contra antígenos celulares (FAN-HEp-2). Contudo, as condições de cultivo, fixação e permeabilização celular interferem diretamente na preservação e distribuição espacial dos antígenos. Portanto, pode se presumir que distintas condições no preparo das células possam interferir no reconhecimento dos padrões de imunofluorescência associados aos diversos autoanticorpos. Sendo assim nosso objetivo é avaliar a reprodutibilidade dos resultados obtidos em substratos de células HEp-2 de diferentes fornecedores frente a amostras de soro de pacientes com doenças autoimune e não autoimunes.

3 – Descrição dos procedimentos que serão realizados, com seus propósitos e identificação dos que forem experimentais e não rotineiros: Serão resgatadas amostras pertencentes ao banco de amostras da Disciplina de Reumatologia da Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) de acordo com a aprovação prévia do Comitê de ética em Pesquisa da UNIFESP. Ocorrerá também a seleção de novos participantes para o desenvolvimento deste protocolo, que ocorrerá nos ambulatórios da Disciplina de Reumatologia UNIFESP. Serão também analisados pacientes com doenças não autoimunes e doadores do banco de sangue (COLSAN São Paulo). O projeto será composto por 900 pacientes divididos em três grupos que atendam os critérios de inclusão e exclusão: *Grupo I*: Será composto por 300 amostras de soro de pacientes com doenças autoimunes sistêmicas, ((amostras já existentes em nosso banco, com exceção de 20 amostras de pacientes com Síndrome de Sjögren) *Grupo II*: composto por 300 amostras de soro de doadores do banco de sangue considerados hígidos (amostras já existentes em nosso banco) e *Grupo III*: composto por 300 amostras de soro de pacientes com doenças não autoimunes incluindo amostras de soro de pacientes psiquiátricos, neoplásicos, hipertensos e infecciosos (amostras já existente em nosso banco).

4 – Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados – coleta de sangue por punção periférica da veia do antebraço: As amostras já existentes no banco de dados serão identificadas e separadas para análise. Vale salientar que estes pacientes já assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido ao qual permitiam o uso de suas amostras em diferentes pesquisas, enquanto que as novas coletas, de 20 amostras de pacientes com Síndrome de Sjögren) serão realizadas nos ambulatórios da UNIFESP. Será coletado cerca de 20ml de sangue em tubo seco. A obtenção do soro ocorrerá pela centrifugação sendo posteriormente armazenados a -70 ° C

5 – Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos dos itens 3 e 4: O paciente poderá apresentar um desconforto mínimo, provocado pela inserção de uma agulha em seu braço, comum a uma coleta de sangue. Ainda assim, o paciente corre riscos mínimos como a formação de hematomas e perigo de contaminação, eliminados pelos cuidados pré e pós coleta.

6 – Benefícios para o participante (Por exemplo: Não há benefício direto para o participante. Trata-se de estudo descritivo para a análise de reprodutibilidade de diferentes lâminas para a pesquisa de autoanticorpos

Somente no final do estudo poderemos concluir a presença de algum benefício através dos dados de frequência obtidos, que possam contribuir para um melhor diagnóstico das doenças autoimunes.

7 – Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais o paciente pode optar. Não se aplica.

8 – Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é **Mônica de Jesus Silva** ; tendo como pesquisadores associados, Dra. Alessandra Dellavance e Dr. Luís Eduardo Coelho Andrade que podem ser encontrados no endereço: Rua Pedro de Toledo, 650, Hospital São Paulo, terceiro andar, disciplina de Reumatologia. Telefone: 5576-4239, e-mail: monycajs@yahoo.com.br. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Botucatu, 572 – 1º andar – cj 14, 5571-1062, FAX: 5539-7162 – E-mail: cepunifesp@unifesp.br

9 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;

10 – Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com as de outros voluntários, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente;

11 – Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

12 – Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

13 – Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), o participante tem direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas.

14 - Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa. Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo avaliação do teste de autoanticorpos contra antígenos celulares (FAN-HEp-2) em pacientes com doenças reumáticas autoimunes na presença e na ausência de autoanticorpos específicos que tem como objetivo avaliar de forma qualitativa a frequência de FAN-HEp-2 positivos em pacientes com doenças reumáticas autoimunes na presença e na ausência de autoanticorpos específicos utilizando amostras de sangue. Eu discuti com a Dra. **Mônica de Jesus Silva**. Sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

15- Declaro estar ciente que a amostra coleta poderá ser armazenada para estudos futuros.

Assinatura do paciente/representante legal

Data / /

Assinatura da testemunha

Data / /

Para casos de voluntários menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo

Data / /