

# CONIC SEMESP

## 15º Congresso Nacional de Iniciação Científica

**TÍTULO:** AVALIAÇÃO DE ANTICORPO ANTI-BETA2 GLICOPROTEÍNA COMO BIOMARCADOR NA ESCLEROSE SISTÊMICA

**CATEGORIA:** CONCLUÍDO

**ÁREA:** CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E SAÚDE

**SUBÁREA:** CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

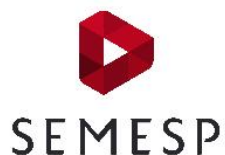
**INSTITUIÇÃO:** CENTRO UNIVERSITÁRIO DAS FACULDADES METROPOLITANAS UNIDAS

**AUTOR(ES):** CAROLINE DA COSTA ABRAHÃO

**ORIENTADOR(ES):** PERCIVAL DEGRAVA SAMPAIO BARROS

**COLABORADOR(ES):** ELAINE PIRES LEON, VILMA DOS SANTOS TRINDADE VIANA

Realização:



Apoio:



# AVALIAÇÃO DE ANTICORPO ANTI- $\beta$ 2 GLICOPROTEÍNA COMO BIOMARCADOR NA ESCLEROSE SISTÊMICA.

## 1. RESUMO

Considerando que a associação de doenças autoimunes num mesmo paciente tem sido cada vez mais descrita na literatura, torna-se importante a caracterização clínica e laboratorial de séries de pacientes com doenças reumatológicas autoimunes. Tal associação, embora rara, parece exercer um impacto tanto nas características clínicas quanto no diagnóstico preciso e no tratamento adequado. Como a Esclerose Sistêmica (ES) apresenta um número significativo de pacientes com manifestações vasculares, torna-se primordial a avaliação da presença concomitante de doenças que cursam com fenômenos tromboembólicos, como a síndrome antifosfolípide (SAF). Além da avaliação clínica criteriosa, a pesquisa de anticorpos anticardiolipina IgG/IgM (ACLA IgG/IgM) e anti- $\beta$ 2 glicoproteína IgG/IgM (anti- $\beta$ 2GPI IgG/IgM) é de grande auxílio, pois estes anticorpos são considerados marcadores sorológicos desta síndrome.

Este estudo analisou amostras de soro de 324 pacientes consecutivos com ES, pertencentes ao biorrepositório da Disciplina de Reumatologia da FMUSP. Os prontuários eletrônicos dos pacientes em seguimento no ambulatório de Esclerose Sistêmica do serviço de Reumatologia do HCFMUSP foram revisados sistematicamente para avaliação dos dados clínicos à época da coleta de sangue. Houve predomínio de pacientes do gênero feminino (90%) e da forma clínica limitada (77%). Os anticorpos ACLA IgG/IgM e anti- $\beta$ 2GPI, além dos anticorpos associados à ES (como anticentrômero, anti-Scl70, anti-RNA polimerase III, anti-fibrilarina, anti-Ku, anti-PMScI, anti-Th/To) foram detectados por ELISA ou *immunoblotting*, utilizando-se kits comerciais.

O ACLA IgG foi detectado somente em um paciente (0,3%), enquanto o ACLA IgM foi positivo em 12 (3,7%) das 324 amostras de soro testadas. Da mesma forma, enquanto o anti- $\beta$ 2GPI IgG foi observado somente em um paciente (0,3%), o anti- $\beta$ 2GPI IgM foi detectado em 22 (6,9%) das 321 amostras testadas para esse

anticorpo. A forma clínica limitada da ES foi mais freqüente tanto nos pacientes com ACLA IgM (84%) quanto nos pacientes com anti- $\beta$ 2GPI (91%).

Com relação á concomitância de auto-anticorpos nos pacientes esclerodérmicos do estudo, foi encontrada uma significativa concomitância (91%) entre a presença dos anticorpos anti- $\beta$ 2GPI IgM e anticorpos anticentrômero (anti-CENP A e B) e com diferentes manifestações vasculares da doença, como úlceras isquêmicas e hipertensão pulmonar. Não foi encontrada nenhuma associação significativa entre os ACLA e outros anticorpos.

Concluindo, o presente estudo mostra que o anticorpo anti- $\beta$ 2GPI IgM pode representar um biomarcador de forma clínica limitada com manifestações vasculares numa extensa série de pacientes com ES.

## **2. INTRODUÇÃO**

As doenças reumatológicas constituem-se em um grupo heterogêneo de doenças caracterizadas pela perda da tolerância imunológica para antígenos próprios, culminando com o acometimento de órgãos e sistemas, e dependem de fatores genéticos e ambientais para o seu desenvolvimento (HUDSON *et al.*, 2008).

A Esclerose Sistêmica (ES) faz parte desse grupo de doenças difusas do tecido conjuntivo (DDTC) de natureza autoimune e de etiologia ainda não completamente estabelecida. Sua incidência é rara e variável e os relatos nos EUA e na Austrália apontam para 230 casos/milhão de habitantes, acometendo principalmente pacientes do sexo feminino numa proporção de 3-10:1, preferencialmente na faixa etária entre 20 e 50 anos. As manifestações clínicas são variadas e afetam múltiplos sistemas e órgãos, sendo que os sintomas se mostram associados à disfunção de vasos sanguíneos bem como à ativação de fibroblastos que resulta em produção excessiva de colágeno (MAYES, 2003). Do ponto de vista fisiopatológico, a ES se caracteriza pelo acúmulo maciço de proteínas da matriz extracelular levando à fibrose e à doença vascular caracterizada por espasmo arterial, hiperreatividade da musculatura vascular, proliferação da íntima com oclusão eventual vascular resultando num quadro isquêmico. Dentre as manifestações cutâneas da ES incluem-se fenômeno de Raynaud, úlceras digitais,

espessamento cutâneo, telangiectasia e calcinose e os órgãos principalmente envolvidos são pulmões (fibrose e hipertensão pulmonar), coração (arritmias, fibrose do miocárdio, insuficiência cardíaca congestiva), rim (crise renal esclerodérmica), sistema musculoesquelético (artrite, artralgia, miopatias), trato gastrointestinal (hipomotilidade do esôfago, estômago e intestino, e doença de refluxo gastroesofágico) (MAYES *et al.*, 2003).

A ES apresenta diferentes graus de fibrose cutânea associada ao envolvimento visceral. Dependendo da extensão do espessamento cutâneo, a ES pode ser subdividida em duas formas clínicas: *difusa*, caracterizada por espessamento cutâneo da face, tronco e membros; e *limitada*, caracterizada pelo espessamento cutâneo acometendo somente os segmentos distais do corpo do paciente, como mãos e antebraços, pés e pernas, além de pescoço e face (LEROY *et al.*, 1988).

Tão importante quanto as formas clínicas da ES, são os auto-anticorpos, geralmente associados a manifestações viscerais específicas da doença, como o anti-Scl 70 (com fibrose intersticial pulmonar), o anticentrômero (com hipertensão pulmonar), e o anti-RNA polimerase II (com a crise renal esclerodérmica).

O anticorpo anti-Scl-70 é dirigido à proteína topoisomerase I, presente no nucleoplasma e nucléolo da célula (STEEN, 2005). Tal anticorpo é altamente específico (99,5%) e de grande valor prognóstico (98%) para a ES (HÉNAULT *et al.*, 2004). Estes anticorpos estão presentes em 20-60% dos pacientes com a forma difusa da ES podendo também ser detectados, em menor frequência, na forma limitada (STEEN, 2005). Pela técnica de imunofluorescência indireta em células HEP-2, a reatividade anti-Scl70 caracteriza-se pela marcação do núcleo e do nucléolo com padrão pontilhado/homogêneo (DELLAVANCE *et al.*, 2009). Atualmente a detecção dos anticorpos anti-Scl-70 é feita rotineiramente utilizando ensaio semiquantitativo, ELISA, utilizando a proteína na sua forma purificada. A ocorrência concomitante de anti-Scl70 e anticentrômero é extremamente rara sendo observada em menos de 1% dos casos (KIKUCHI & INAGAKI, 2000).

O anticorpo anticentrômero (ACA) reconhece uma família de proteínas presente na região centromérica das células eucariontes durante o ciclo celular. As três principais proteínas reconhecidas são CENP-A (17 kDa), CENP-B (80 kDa) e CENP-C (140 kDa). Dentre essas proteínas, a CENP-B é o principal antígeno

centromérico alvo dos ACA (95%) nos pacientes com ES ou com fenômeno de Raynaud. ACA está presente em 12 – 43% dos pacientes com ES, sendo 57 a 82% naqueles com a forma cutânea limitada da doença, exibindo associação com hipertensão pulmonar. Este anticorpo pode estar também presente em pacientes com a forma cutânea difusa, porém em menor frequência (3 – 12%) (STEEN, 2005). Sua presença no soro pode ser avaliada pela técnica de imunofluorescência indireta em células HEp-2. ACA pode ser detectado anos antes do desenvolvimento de sintomas da ES, assim, sua positividade em pacientes com fenômeno de Raynaud é um importante indicador de desenvolvimento de ES (AVOUAC *et al.*, 2011).

O anticorpo anti-RNA polimerase III é caracterizado por possuir o maior complexo dentre três polimerases nucleares, contendo 17 subunidades e com função de sintetização de componentes com moléculas de RNA; está presente em pacientes com a forma difusa da ES que apresentam severo acometimento cutâneo e renal. Representa em torno de 10-15% do total de pacientes com ES e 35-45% que possuem a forma cutânea difusa da doença (SANTIAGO *et al.*, 2007). Na imunofluorescência em células HEp-2, estes anticorpos estão associados ao padrão nuclear pontilhado/nucleolar granular nas células em intérfase. Os níveis séricos destes anticorpos podem ser determinados pela técnica de ELISA empregando a proteína RNAP-III recombinante.

E, como a ES apresenta um número significativo de pacientes com manifestações vasculares, a avaliação da presença associada de anticorpos marcadores de fenômenos vasculares, como a síndrome antifosfolípide (SAF), torna-se importante. Além da avaliação clínica criteriosa, a pesquisa de anticorpos anticardiolipina IgG/IgM (ACLA IgG/IgM) e anti- $\beta$ 2 glicoproteína I IgG/IgM (anti- $\beta$ 2GPI IgG/IgM) é de grande auxílio, pois estes são considerados marcadores sorológicos da SAF (STEEN, 2005).

Com relação à SAF, os anticorpos antifosfolipídicos são uma família de imunoglobulinas de IgG, IgM, IgA, ou uma combinação destes isótopos. No caso, o  $\beta$ 2-glicoproteína I ( $\beta$ 2GPI), é uma proteína de ligação de fosfolípidios, também reconhecido como o alvo mais clinicamente relevante antigênico para anticorpos antifosfolípidos. Estes anticorpos reagem com os fosfolípidios (complexos de proteínas) carregados negativamente, e certas proteínas plasmáticas localizadas em superfícies de membrana ativadas (MATSUURA *et. al.*, 2007). Já as anticardiolipinas

são normalmente detectadas por qualquer radioimunoensaio (RIA) ou um ensaio semiquantitativo (ELISA), utilizando a cardiolipina como um antígeno em fase sólida (KAMASHTA & BERTOLACCINI, 2007).

### 3. OBJETIVOS

Avaliar a presença e correlações clínicas dos anticorpos anticardiolipina IgG/IgM (ACLA IgG/IgM) e anti- $\beta$ 2 glicoproteína I IgG/IgM (anti- $\beta$ 2GPI IgG/IgM) numa série de pacientes com ES atendidos num hospital terciário de referência.

### 4. METODOLOGIA

Foram incluídas no estudo as amostras de soro de 324 pacientes consecutivos caracterizados como ES segundo os novos critérios de classificação estabelecidos pelo *American College of Rheumatology* (ACR) juntamente com a *European League Against Rheumatism* (EULAR). As amostras estão armazenadas no Laboratório de Imunologia Humoral e fazem parte do biorrepositório da Disciplina de Reumatologia da FMUSP. Os prontuários eletrônicos dos pacientes em seguimento no ambulatório de Esclerose Sistêmica do serviço de Reumatologia do HCFMUSP foram revisados sistematicamente para avaliação dos dados clínicos à época da coleta de sangue.

A pesquisa dos anticorpos anticardiolipina IgG/IgM (ACLA IgG/IgM) e anti- $\beta$ 2 glicoproteína I IgG/IgM (anti- $\beta$ 2GPI IgG/IgM) foi realizada por meio do teste de ELISA (*INOVA Diagnostics Inc, EUA*). Para detecção dos auto-anticorpos associados à ES como o anti-Sc170 (*INOVA Diagnostics Inc, EUA*), o RNA-POL III (*MBL Medical & Biological Laboratories Ltd, KDX, Japão*) e o PM/Scl (*EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika, AG, Alemanha*) foram detectados por ELISA utilizando kits comerciais e seguindo o protocolo estabelecido pelos fabricantes. Anticorpos antinucleares (ANA) e anticentromérico foram determinados pela técnica de imunofluorescência indireta em células HEP-2 (*INOVA Diagnostics Inc, USA*).

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC/FMUSP – CAPPesp).

## **5. DESENVOLVIMENTO**

A aluna de Iniciação Científica teve inicialmente aulas teóricas sobre a doença a ser investigada, a esclerose sistêmica, e sobre a importância de se avaliar a presença de biomarcadores. Foi realizada uma pesquisa bibliográfica de artigos importantes para se compreender esta sistemática autoimune.

Em seguida, a aluna de Iniciação Científica passou a ter aulas de como proceder com respeito à realização dos testes laboratoriais para identificar os biomarcadores (autoanticorpos) da pesquisa. E, conseqüentemente, passou a realizar os respectivos testes laboratoriais, sob supervisão das biólogas do Laboratório de Imunologia Humoral da FMUSP, pelo período de um ano.

Após a realização dos testes laboratoriais, compilou os resultados, que estão submetidos à estatística, e de onde deverão sair pelo menos dois trabalhos científicos para serem submetidos à publicação internacional. Os resultados iniciais, que constam no presente trabalho, são promissores.

## **6. RESULTADOS**

O ACLA IgG foi detectado somente em um paciente (0,3%), enquanto o ACLA IgM foi positivo em 12 (3,7%) das 324 amostras de soro testadas. Da mesma forma, enquanto o anti- $\beta$ 2GPI IgG foi observado somente em um paciente (0,3%), o anti- $\beta$ 2GPI IgM foi detectado em 22 (6,9%) das 321 amostras testadas para esse anticorpo. A forma clínica limitada da ES foi mais freqüente tanto nos pacientes com ACLA IgM (84%) quanto nos pacientes com anti- $\beta$ 2GPI (91%).

O anticorpo anti-Scl 70 foi positivo em 28%, o anticentrômero em 25% e o anti-RNA polimerase III em 7% dos pacientes. Com relação à concomitância de auto-anticorpos nos pacientes esclerodérmicos do estudo, foi encontrada uma

significante concomitância (91%) entre a presença dos anticorpos anti- $\beta$ 2GPI IgM e anticorpos anticentrômero (anti-CENP A e B) e com diferentes manifestações vasculares da doença, como úlceras isquêmicas, amputação de dedos e hipertensão pulmonar. Não foi encontrada nenhuma associação significativa entre os ACLA e outros anticorpos.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dentro da linha de pesquisa de se procurar auto-anticorpos que possam se correlacionar especificamente com manifestações viscerais específicas em pacientes com doenças auto-imunes, o presente estudo mostra que o anticorpo anti- $\beta$ 2GPI IgM representa um biomarcador da forma clínica limitada com manifestações vasculares numa extensa série de pacientes com ES.

## 8. FONTES CONSULTADAS

AVOUAC, J; FRANSEN, J; WALKER, UA; RICCIERI, V; SMITH, V; MULLER, C; *et al*; EUSTAR GROUP. Preliminary criteria for the very early diagnosis of systemic sclerosis: results of a Delphi Consensus Study from EULAR Scleroderma Trials and Research Group. **Ann Rheum Dis** 70: 476-81, 2011.

DELLAVANCE, A; GALLINDO, C; SOARES, MG; SILVA, NP; MORTARA, RA; ANDRADE, LE. Redefining the Scl-70 indirect immunofluorescence pattern: autoantibodies to DNA topoisomerase I yield a specific compound immunofluorescence pattern. **Rheumatology (Oxford)** 48(6): 632-7, 2009.

HÉNAULT, J; TREMBLAY, M; CLÉMENT, I; RAYMOND, Y; SENÉCAL JL. Direct binding of anti-DNA topoisomerase I autoantibodies to the cell surface of fibroblasts in patients with systemic sclerosis. **Arthritis Rheum** 50(10): 3265-74, 2004.



- HUDSON, M; ROJAS-VILLARRAGA, A; CORAL-ALVARADO, P; LÓPEZ-GUZMÁN, S; MANTILLA, RD; CHALEM, P; CANADIAN SCLERODERMA RESEARCH GROUP; COLOMBIAN SCLERODERMA RESEARCH GROUP; BARON, M; ANAYA, JM. Polyautoimmunity and familial autoimmunity in systemic sclerosis. **J Autoimmunity** 31(2): 156-59, 2008.
- KAMASHTA, MA; BERTOLACCINI, ML. Anticardiolipin antibodies. In: Shoenfeld, Y.; Gershwin, E. & Meroni, P. L. Autoantibodies. Elsevier, 2a. ed, 2007, pág. 741-45.
- KIKUCHI, M. & INAGAKI, T. Bibliographical study of the concurrent existence of anticentromere and antitopoisomerase I antibodies. **Clin Rheumatol** 19(6): 435-41, 2000.
- LEROY, E. C; BLACK, C; FLEISCHMAJER, R; JABLONSKA, S; KRIEG, T; MEDSGER, TA; *et al.* Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. **J Rheumatol** 15(2): 202-5, 1988.
- MATSUURA, E; DIER, K.J; LOPES LR. Beta2-glicoprotein I autoantibodies. In: Shoenfeld, Y; Gershwin, E & Meroni, PL. Autoantibodies. Elsevier, 2a. ed., 2007, pág. 687-93.
- MAYES, MD. Scleroderma epidemiology. **Rheum Dis Clin North Am** 29(2): 239-54, 2003.
- SANTIAGO, M; BARON, M; HUDSON, M; BURLINGAME, RW; FRITZLER, MJ. Antibodies to RNA polymerase III in systemic sclerosis detected by ELISA. **J Rheumatol** 34(7): 1528-34, 2007.
- STEEN, VD. Autoantibodies in systemic sclerosis. **Semin Arthritis Rheum** 35(1): 35-42, 2005.

VAN DEN HOOGEN, F; KHANNA, D; FRANSEN, J; JOHNSON, SR; BARON, M; TYNDALL, A; *et al.* 2013 Classification criteria for systemic sclerosis: an American College of Rheumatology/European League against Rheumatism collaborative initiative. **Arthritis Rheum** 65(11): 2737-47, 2013.