



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR  
Ciências

# Prevalência de Autoanticorpos com Valor Preditivo em Dadores de Sangue Portugueses

Ana Patrícia Bernardo Geraldes

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
**Bioquímica**  
(2º ciclo de estudos)

Orientador: Prof. Doutora Cândida Ascensão Teixeira Tomáz  
Co-orientador: Prof. Doutor Paulo Manuel Tavares Vicente Beja Ratado

Covilhã, Junho de 2011



*"...Aceite com sabedoria o facto de que o caminho está cheio de contradições. Há momentos de alegria e desespero, confiança e falta de fé, mas vale a pena seguir adiante..."*

**Paulo Coelho**



## Agradecimentos

À minha orientadora e directora de curso, Prof. Doutora Cândida Ascensão Teixeira Tomáz, por me ter sempre acompanhado em todo o meu percurso académico, pela sua disponibilidade, prontidão e simpatia.

Ao Dr. Paulo Manuel Tavares Beja Ratado, agradeço a sua orientação científica e o facto de me ter possibilitado estagiar no Laboratório de Patologia Clínica da Unidade Local de Saúde da Guarda (ULS) e me ter disponibilizado todos os recursos técnicos e humanos para o desenvolvimento deste trabalho científico, enfim, por me ter aberto os horizontes;

À Dra. Patrícia Isabel da Silva Fonseca pela paciência, pelos seus ensinamentos, disponibilidade e amizade.

A todo o pessoal técnico, administrativo e auxiliar do Laboratório de Patologia Clínica da ULS pelo espírito de ajuda demonstrado e pela recepção acolhedora.

À empresa A. MENARINI Diagnostics® por terem cedido, a título gracioso, os reagentes utilizados no trabalho experimental.

Ao Hospital São Teotónio na pessoa da Dra. Marina Ofélia Costa pela cedência das amostras de sangue utilizadas neste trabalho.

Aos meus pais, Cursino e Manuela, por me terem proporcionado todos estes anos de aprendizagem, por me terem transmitido todos os seus ensinamentos, por todo o seu amor e carinho. Sem eles não me tinha sido possível alcançar mais este objectivo.

Ao meu noivo, namorado, amigo e futuro marido Carlos, pelo seu incentivo, ajuda, carinho e amor, sem ti esta caminhada teria sido muito mais difícil.

À minha irmã e amiga, Sara, obrigada pela tua amizade e carinho.

Ao Sr. Carlos e à D. Adélia por me tratarem como se fosse sua filha e me apoiaram nesta fase da minha vida.

A todas as restantes pessoas (amigos e familiares) que de uma ou outra forma me apoiaram e me fizeram pôr mãos ao trabalho quando estas teimavam em não o fazer, às que me arrancaram um sorriso e às que me deram conselhos.

## Resumo

Existe um conjunto de doenças que se assemelham entre si pelo facto de apresentarem danos em órgãos e tecidos que decorrem de respostas a antigénios do próprio. A essas doenças dá-se o nome de doenças auto-imunes. Estas apresentam uma prevalência e incidência distintas entre si, sendo superiores no sexo feminino e aumentando com o decorrer da idade. Existem autoanticorpos que são mais prevalentes em certas doenças auto-imunes, no entanto, nem todos podem prever com exactidão a ocorrência de doença. Apesar disso, tem-se conhecimento que existem autoanticorpos que se encontram no soro de doentes até 10 anos antes do início do aparecimento da doença.

Este estudo pretendeu avaliar a prevalência dos anticorpos anti-*Saccharomyces cerevisiae*, os anticorpos anti-mitocondriais, os anticorpos anti-nucleares, os anticorpos anti-fosfolípidos, anticorpos anti-péptidos cíclicos citrulinados, factor reumatóide, anticorpos anti-gliadina e anticorpos anti-transglutaminase tecidular. Para isso, foram executados métodos de análise e métodos de confirmação, tendo-se contabilizado como apresentando autoanticorpos apenas os dadores que apresentaram positividade nos métodos confirmatórios.

Obteve-se uma prevalência de autoanticorpos no total da população de 12,54%, o que está dentro dos valores encontrados na bibliografia. Os resultados obtidos revelam uma maior prevalência de autoanticorpos em dadores do sexo feminino e um aumento da prevalência de autoanticorpos no decorrer da idade. Para a totalidade dos dadores os autoanticorpos mais prevalentes foram os anticorpos anti-*Saccharomyces cerevisiae* (IgA e IgG) seguidos do factor reumatóide, tendo-se obtido os mesmos resultados quando se analisam apenas os dadores masculinos. A prevalência nos dadores femininos foi distinta, apresentando como autoanticorpos mais prevalentes os anticorpos anti-*Saccharomyces cerevisiae* (IgA e IgG), seguindo-se os anticorpos anti-fosfolípidos.

Verifica-se a necessidade de se fazerem estudos e exames complementares de modo a confirmar os resultados obtidos neste trabalho.

## Palavras-chave

Doenças Auto-imunes, Autoanticorpos preditivos, Prevalência, Dadores de Sangue Portugueses



## Abstract

Autoimmune diseases are a very similar group of diseases presenting injuries on organs and tissues which come from overactive immune response to its own antigens.. They have a very different prevalence and incidence, being higher on females and increasing with age. There are some autoantibodies prevalent in certain autoimmune diseases, although, not all can predict with precision the emergency of the disease. Even so there is the knowledge that some auto antibodies are in the serum of patients until 10 years before the appearance of the disease.

The aim of this study was to evaluate the prevalence of antibodies anti-*Saccharomyces cerevisiae*, the anti-mitochondrial antibodies, anti-nuclear antibodies, anti-phospholipids antibodies, anti-cyclic citrullinated peptides antibodies, rheumatoid factor , anti-gliadin antibodies and anti-tissue transglutamine. Only donors who tested positive in the confirmation test for autoantibodies were recorded in the study. .

Was found a prevalence of 12,54% in the total population with autoantibodies, being within the values of bibliography. The results obtained reveal a higher prevalence of autoantibodies in female donors and an increase of autoantibodies with aging. For all the donors the most prevalent autoantibodies were the anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibodies (IgA and IgG) followed by the rheumatoid factor, having been obtained the same results when considering only male donors. The prevalence in female donors was distinct, showing as most prevalent autoantibodies the anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibodies (IgA and IgG) followed by the anti-phospholipids antibodies.

It's necessary to make more studies and laboratory tests to confirm the results obtained in this study.

## Keywords

Autoimmune Diseases, Predictive autoantibodies, prevalence, Portuguese Blood Donors



# Índice Geral

Agradecimentos .....	v
Resumo.....	vii
Palavras-chave .....	vii
Abstract.....	ix
Keywords .....	ix
Índice Geral .....	xi
Lista de Figuras.....	xvii
Lista de Gráficos .....	xix
Lista de Tabelas .....	xxi
Lista de Abreviaturas .....	xxiii
I. INTRODUÇÃO .....	1
1.1 Auto-imunidade e doenças auto-imunes.....	3
1.2 Doenças auto-imunes.....	4
1.2.1. Incidência e prevalência das doenças auto-imunes .....	4
1.2.2. Associação entre género e doenças auto-imunes .....	6
1.2.3. Idades mais frequentes para o aparecimento das doenças auto-imunes .....	7
1.3 Autoanticorpos .....	8
1.4 Autoanticorpos mais prevalentes nas Doenças Auto-imunes .....	9
1.4.1. Autoanticorpos associados à Artrite Reumatóide .....	9
1.4.2. Anticorpos anti-nucleares .....	10
1.4.2.1 Anticorpos anti-DNA de dupla cadeia .....	10
1.4.2.2 Anticorpos contra antígenos nucleares extraíveis.....	10

1.4.3.	Anticorpos anti-fosfolípidos.....	11
1.4.4.	Anticorpos anti-citoplasma de neutrófilos .....	11
1.4.5.	Autoanticorpos associados a doenças inflamatórias intestinais .....	11
1.4.6.	Anticorpos anti-mitocondriais .....	12
1.4.7.	Anticorpos anti-gliadina e anti-transglutaminase tecidular.....	12
1.4.8.	Autoanticorpos associados à Tireoidite de Hashimoto .....	13
1.4.9.	Auto-anticorpos presentes na Diabetes <i>Melittus</i> tipo 1 .....	13
1.5	Autoanticorpos com valor preditivo .....	14
1.5.1.	Anticorpos anti-nucleares no Lúpus Eritmatoso Sistémico .....	15
1.5.2.	Anticorpos anti-fosfolípidos na Síndrome anti-fosfolípídica .....	15
1.5.3.	Anticorpos anti- péptidos cíclicos citrulinados e o Factor Reumatóide na Artrite Reumatóide .....	15
1.5.4.	Anticorpos anti-peroxidase tiroideia no Hipotiroidismo .....	16
1.5.5.	Anticorpos anti-mitocondriais na Cirrose Biliar Primária .....	16
1.5.6.	Anticorpos anti-células de ilhéus de Langerhans na Diabetes <i>Melittus</i> tipo 1 .. .....	17
1.5.7.	Anticorpos anti- transglutaminase tecidular na Doença Celíaca .....	17
1.5.8.	Anticorpos anti- <i>Saccharomyces cerevisiae</i> nas Doenças inflamatórias intestinais .....	17
1.6	Estudos de prevalência de autoanticorpos em dadores de sangue .....	18
1.6.1.	“Prevalência de anticorpos anti-mitocondriais no soro de dadores de sangue saudáveis.” .....	18
1.6.2.	“Prevalência da Doença Celíaca em dadores de sangue aparentemente saudáveis na Comunidade Autónoma de Madrid.” .....	18
1.6.3.	“ <i>Screening</i> de anticorpos anti-tranlglutaminase tecidular associados à Doença Celíaca em dadores de sangue. <i>Screening</i> na população Turca.” .....	19

1.6.4.	“O uso de um único marcador serológico subestima a prevalência da Doença Celiaca em Israel: um estudo de dadores de sangue.” .....	19
1.6.5.	“Alta prevalência da Doença Celiaca em dadores de sangue voluntários brasileiros com base no rastreamento de anticorpo AtTG.” .....	19
1.6.6.	“Frequência e especificidade dos anticorpos anti-fosfolípidos em dadores de sangue voluntários.” .....	20
1.6.7.	“Auto-anticorpos específicos precedem os sintomas de Artrite Reumatóide” . .....	20
1.6.8.	“ANAs, anticorpos anti- citoplasmáticos (ACI) anticorpos anti-SS-A/Ro em dadores de sangue do sexo feminino.” .....	21
1.7	Objectivos do estudo.....	21
II.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
2.1	População em Estudo.....	25
2.2	Equipamento utilizado .....	25
2.3	Métodos de Pesquisa e Confirmação de autoanticorpos .....	27
2.3.1	Caracterização do perfil de autoanticorpos anti- <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (ASCA) 27	
2.3.1.1	Métodos para pesquisa e identificação dos ASCA .....	28
2.3.1.2	Método de confirmação do ASCA IgA e ASCA IgG.....	28
2.3.2	Caracterização do perfil dos autoanticorpos anti-fosfolípidos .....	29
2.3.2.1	Métodos para pesquisa e identificação dos ACA.....	29
2.3.2.2	Métodos de confirmação dos ACA positivos .....	29
2.3.2.2.1	Pesquisa dos ACA IgG e ACA IgM.....	29
2.3.2.2.2	Pesquisa dos AAs anti-B2- glicoproteínas I (B2-GPI) tipo IgG e IgM.....	30
2.3.3	Métodos para pesquisa e identificação dos anticorpos anti-mitocondriais (AMA). .....	31
2.3.3.1	Pesquisa dos AMA .....	31

2.3.3.2	Confirmação dos AMA .....	31
2.3.3.2.1	Pesquisa dos AMA por Imunofluorescência Indirecta (IFI).....	31
2.3.3.2.2	Estudo da especificidade dos AMA .....	32
2.3.3.2.3	Determinação dos AMA M3 .....	32
2.3.3.2.4	Determinação de anticorpos anti-sp100 .....	33
2.3.3.2.5	Determinação de anticorpos anti- gp210 .....	33
2.3.4	Métodos para a pesquisa e confirmação dos anticorpos anti-nucleares (ANA) .	33
2.3.4.1	Pesquisa e identificação dos ANA.....	34
2.3.4.2	Confirmação dos ANA .....	34
2.3.4.2.1	Confirmação dos ANA por IFI.....	34
2.3.4.2.2	Confirmação dos ANA pelo método FEIA .....	35
2.3.5	Métodos para pesquisa e identificação dos anticorpos anti-gliadina (AGA) e anticorpos anti -transglutaminase tecidual (AtTG) .....	36
2.3.5.1	Pesquisa e identificação dos AGA.....	36
2.3.5.2	Pesquisa e identificação dos AAs AtTG .....	37
2.3.5.2.1	Pesquisa dos AAs AtTG .....	37
2.3.5.2.2	Pesquisa dos anticorpos AtTG Quimérica .....	37
2.3.5.3	Confirmação das amostras positivas .....	38
2.3.5.3.1	Confirmação das amostras positivas usando um método de detecção dos AGA IgG e dos AGA IgA .....	38
2.3.5.3.2	Confirmação das amostras positivas usando um método de detecção dos Acs AtTG IgA e AtTG IgG .....	38
2.3.6	Métodos para a pesquisa e confirmação do Factor Reumatóide (RF) e dos anticorpos anti-péptidos cíclicos citrulinados (ACCP) .....	39
2.3.6.1	Pesquisa e identificação dos RF.....	39

2.3.6.1.1	Confirmação dos anticorpos RF IgM.....	39
2.3.6.2	Pesquisa e identificação dos Acs ACCp IgG.....	40
2.3.6.2.1	Confirmação dos Acs ACCp IgG .....	40
III.	RESULTADOS .....	43
3.1	População em estudo .....	45
3.2	Dadores com autoanticorpos.....	46
3.2.1	Distribuição dos AAs por faixa etária.....	46
3.2.2	Prevalência dos AAs por faixa etária .....	49
3.2.3	Número de AAs por dador .....	52
3.2.4	Distribuição dos AAs por género.....	52
3.2.5	Prevalência de AAs na população em estudo .....	59
3.2.6	Perfis dos AAs dos dadores de sangue.....	65
3.2.7	Cálculo do <i>score</i> de risco de DAI .....	74
IV.	DISCUSSÃO DE RESULTADOS .....	77
V.	CONCLUSÕES.....	87
VI.	PERSPECTIVAS FUTURAS .....	91
VII.	BIBLIOGRAFIA .....	95
VIII.	ANEXOS .....	101



## Lista de Figuras

<b>FIGURA 1</b> - TIPO DE RESPOSTAS DO SISTEMA IMUNITÁRIO. (ADAPTADO DE BARABAS <i>ET AL</i> , 2011).....	3
<b>FIGURA 2</b> -ANALISADOR AUTOMÁTICO TRITURUS® ONDE FORAM EXECUTADAS TODAS AS TÉCNICAS DE ELISA. [ADAPTADO DE .....	25
<b>FIGURA 3</b> - ANALISADOR AUTOMÁTICO IMMUNOCAP 250® E CANETAS COM 10 A 12 POÇOS ONDE ESTÃO FIXADOS OS ANTIGÉNIOS (ESPECÍFICOS PARA CADA CANETA) QUE IRÃO REAGIR COM OS AA DOS SOROS. [ADAPTADO DE <a href="http://www.ddm360.com/en/detail1.asp?id=4">HTTP://WWW.DDM360.COM/EN/DETAIL1.ASP?ID=4</a> , A 11/04/11] .....	26
<b>FIGURA 4</b> - ANALISADOR PHD™. (ADAPTADO DE <a href="http://www3.biorad.com/B2B/BioRAD/PRODUCT/BR_CATEGORY.JSP?">HTTP://WWW3.BIORAD.COM/B2B/BioRAD/PRODUCT/BR_CATEGORY.JSP?</a> , A 20/05/11) E MICROSCÓPIO NIKON ECLIPSE E600 (ADAPTADO DE <a href="http://www.labx.com/v2/spiderdealer2/vistasearchdetails.cfm?lvid=7733703">HTTP://WWW.LABX.COM/V2/SPIDERDEALER2/VISTASEARCHDETAILS.CFM?LVID=7733703</a> , A 20/05/11) .....	26
<b>FIGURA 5</b> - O NEFELÓMETRO IMAGE (BECKMAN COULTER®) (ADAPTADO DE <a href="http://www.beckmancoulter.ch/clinical_diagnostics/image-800.asp">HTTP://WWW.BECKMANCOULTER.CH/CLINICAL_DIAGNOSTICS/IMAGE-800.ASP</a> , 05/06/11). .....	27
<b>FIGURA 6</b> - DISTRIBUIÇÃO DOS AUTO-ANTICORPOS MAIS PREVALENTES NA TOTAL DA POPULAÇÃO EM ESTUDO SEGUNDO A FAIXA ETÁRIA. ....	49
<b>FIGURA 7</b> - DISTRIBUIÇÃO DOS AUTO-ANTICORPOS MAIS PREVALENTES NOS DADORES DO SEXO MASCULINO SEGUNDO A FAIXA ETÁRIA. ....	50
<b>FIGURA 8</b> - DISTRIBUIÇÃO DOS AUTOANTICORPOS MAIS PREVALENTES NOS DADORES DO SEXO FEMININO, SEGUNDO A FAIXA ETÁRIA. ....	51
<b>FIGURA 9</b> - NÚMERO DE DADORES QUE TÊM COMPROVADAMENTE 1, 2 OU AUTOANTICORPOS (COM AS RESPECTIVAS PERCENTAGENS) EM RELAÇÃO À TOTALIDADE DAS AMOSTRA E DISTRIBUIÇÃO E PREVALÊNCIAS NOS DADORES DE AMBOS OS SEXOS. ....	52
<b>FIGURA 10</b> - DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS QUE APRESENTARAM POSITIVIDADE CONFIRMADA PARA OS ANTICORPOS ANTI- <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> E A SUA DISTRIBUIÇÃO QUANTO AO TIPO DE IMUNOGLOBULINAS (IGA E IGG) E AO GÉNERO. ....	53
<b>FIGURA 11</b> - DISTRIBUIÇÃO DOS DADORES DO SEXO MASCULINO E FEMININO QUE COMPROVADAMENTE APRESENTARAM POSITIVIDADE DE PARA OS ACA IGM E ACA IGG ASSIM COMO PARA AS B <sub>2</sub> .GPI IGM E B <sub>2</sub> .GPI IGG. ....	54
<b>FIGURA 12</b> - DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS QUE COMPROVADAMENTE APRESENTARAM POSITIVIDADE PARA ALGUM DOS PARÂMETROS ANALISADOS PARA O ESTUDO DOS ANTICORPOS ANTI-MITOCONDRIAIS EM FUNÇÃO DO GÉNERO DAS AMOSTRAS. ....	55

<b>FIGURA 13</b> - DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS POSITIVAS PARA OS ANTICORPOS ANTI-NUCLEARES RELATIVAMENTE AO GÉNERO. ....	55
<b>FIGURA 14</b> - DISTRIBUIÇÃO DOS AUTOANTICORPOS ANTI-GLIADINA IGG E IGA, AUTO-ANTICORPOS ANTI-TRANSGLUTAMINASE TECIDULAR IGG E IGA E AUTOANTICORPOS ANTI-TRANSGLUTAMINASE TECIDULAR QUIMÉRICA NOS DADORES DO SEXO MASCULINO E FEMININO. ....	57
<b>FIGURA 15</b> - OS DADORES QUE APRESENTARAM FACTOR REUMATÓIDE. ....	58
<b>FIGURA 16</b> - DISTRIBUIÇÃO DOS AUTO-ANTICORPOS ANTI-PÉPTIDOS CÍCLICOS CITRULINADOS EM RELAÇÃO AOS DOIS MÉTODOS USADOS PARA A SUA CONFIRMAÇÃO - ELISA E FEIA E EM RELAÇÃO AO GÉNERO DOS DADORES. ....	58
<b>FIGURA 17</b> - PREVALÊNCIAS DOS AUTOANTICORPOS NO TOTAL DA POPULAÇÃO EM ESTUDO. ....	60
<b>FIGURA 18</b> - PREVALÊNCIA DOS AUTOANTICORPOS NOS DADORES DO SEXO MASCULINO. OS NÚMEROS CORRESPONDEM À QUANTIDADE DE DADORES COM RESULTADOS POSITIVOS PARA O RESPECTIVO AUTOANTICORPO. ....	62
<b>FIGURA 19</b> - PREVALÊNCIA DE AUTOANTICORPOS NOS DADORES DO SEXO FEMININO. OS NÚMEROS CORRESPONDEM À QUANTIDADE DE DADORES COM RESULTADOS POSITIVOS PARA O RESPECTIVO AUTOANTICORPO. ....	64

## Lista de Gráficos

GRÁFICO 1 - DISTRIBUIÇÃO PERCENTUAL POR SEXO DAS AMOSTRAS.....	45
GRÁFICO 2 - DISTRIBUIÇÃO ETÁRIA E POR SEXO DA AMOSTRA.....	45
GRÁFICO 3 - DISTRIBUIÇÃO ETÁRIA DOS DADORES COM AMOSTRAS POSITIVAS POR SEXO E IDADE. ....	47
GRÁFICO 4 - PERFIL DE AUTOANTICORPOS DOS DADORES 1 AO 15. ....	66
GRÁFICO 5 - PERFIL DE AUTOANTICORPOS DOS DADORES 16 AO 30. ....	67
GRÁFICO 6 - PERFIL DE AUTOANTICORPOS DOS DADORES 31 AO 45. ....	68
GRÁFICO 7 - PERFIL DE AUTOANTICORPOS DOS DADORES 46 AO 60. ....	69
GRÁFICO 8 - PERFIL DOS AUTOANTICORPOS DOS DADORES 61 AO 75 . ....	70
GRÁFICO 9 - PERFIL DOS AUTOANTICORPOS DOS DADORES 76 AO 90. ....	71
GRÁFICO 10 - PERFIL DE AAS DOS DADORES 91 AO 103.....	72



## Lista de Tabelas

<b>TABELA 1</b> - INCIDÊNCIA E PREVALÊNCIA DE DIVERSAS DOENÇAS AUTO-IMUNES NA POPULAÇÃO DOS EUA. (ADAPTADO DE COOPER <i>ET AL</i> , 2003; DE TOZZOLI, 2008 E DE REWERS, 2005) .....	5
<b>TABELA 2</b> - RAZÃO DA PREVALÊNCIA DAS DOENÇAS AUTO-IMUNES ENTRE SEXOS. (ADAPTADO DE SELMI, 2008)....	6
<b>TABELA 3</b> - DISTRIBUIÇÃO DAS MÉDIAS DAS IDADES AQUANDO DO DIAGNÓSTICO DE CERTAS DOENÇAS AUTO-IMUNES. (ADAPTADO DE COOPER <i>ET AL</i> , 2003 E SÁRDI <i>ET AL</i> , 2007) .....	7
<b>TABELA 4</b> - ASSOCIAÇÃO DE DIVERSOS AUTOANTICORPOS COM ALGUMAS DOENÇAS AUTO-IMUNES.(ADAPTADO DE WATTS, 2002).....	13
<b>TABELA 5</b> - DISTRIBUIÇÃO DOS PONTOS PARA SE CALCULAR A PROBABILIDADE DE CADA DADOR VIR A SOFRER DE QUALQUER DAI. ....	41
<b>TABELA 6</b> - NÚMERO E A PERCENTAGEM DE DADORES COM AÁS POSITIVOS, POR GÉNERO. ....	46
<b>TABELA 7</b> - IDADE MÁXIMA E MÍNIMA DOS DADORES DO SEXO MASCULINO E FEMININO.....	47
<b>TABELA 8</b> - PERCENTAGEM DE DADORES COM AUTO-ANTICORPOS EM RELAÇÃO À TOTALIDADE DOS DADORES EXISTES EM CADA FAIXA ETÁRIA E POR GÉNERO. ....	48
<b>TABELA 9</b> - SCORE DE RISCO PARA O DESENVOLVIMENTO DE DOENÇA PARA CADA DADOR. ....	74



## Lista de Abreviaturas

<b>AA</b>	Autoanticorpo
<b>AAs</b>	Autoanticorpos
<b>Ac</b>	Anticorpo
<b>ACA</b>	Anticorpos Anti-Cardiolípinas
<b>ACI</b>	Anti-Citoplasmático
<b>Acs</b>	Anticorpos
<b>Ag</b>	Antigénio
<b>AGA</b>	Anticorpo Anti-Gliadina
<b>Ags</b>	Antigénios
<b>AI</b>	Auto-Imunidade
<b>ACCp</b>	Anti-Péptidos Cíclicos Citrulinados
<b>AMA</b>	Anticorpo Anti-Mitocondrial
<b>ANA</b>	Anticorpo Anti-Nuclear
<b>ANCA</b>	Anticorpos Anti-Citoplasma de Centrómeros
<b>Anti-CEMP</b>	Anti-Centrómero
<b>Anti-dsDNA</b>	Anti- DNA de cadeia dupla
<b>Anti-GADA</b>	Anti- Descarboxilase do Ácido Glutâmico
<b>Anti-Jo 1</b>	Anti-Sintetase do Histidil-tRNA
<b>Anti-RNP 70</b>	Anti-Complexo de Ribonúcleoproteína de 70 kDa
<b>Anti-Scl 70</b>	Anti-Topoisomerase I
<b>Anti-Sm</b>	Anti-Proteínas Sm
<b>Anti-TPO</b>	Anti- Peroxidase Tiroideia

<b>Anti-U1 RNP</b>	Anti-Complexo de Ribonúcleoproteína U1
<b>AtTG</b>	Anti-Transglutaminase Tecidual
<b>aPC</b>	Anti-Fosfatidilcolina
<b>aPE</b>	Anti-Fosfatidiletanolamina
<b>aPL</b>	Anti-Fosfolípidos
<b>aPS</b>	Anti-Fosfatidilserina
<b>APS</b>	Síndrome Anti-Fosfolípido
<b>ATg</b>	Anti-tireoglobulina
<b>ASCA</b>	Anticorpos Anti- <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<b>BIP</b>	Anticorpos anti-proteínas que se ligam a imunoglobulinas
<b>BCOADC-E2</b>	Subunidade E2 do Complexo 2-oxo Ácido Desidrogenase de Cadeia Ramificada
<b>CBP</b>	Cirrose Biliar Primária
<b>CD</b>	Doença Celíaca
<b>DAI</b>	Doença Auto-Imune
<b>DCr</b>	Doença de Crohn
<b>DII</b>	Doenças inflamatórias intestinais
<b>DM</b>	Diabetes <i>Mellitus</i> Tipo I
<b>DO</b>	Densidade Óptica
<b>Dx</b>	Dadores com AAs com n.º x
<b>EIA</b>	Ensaio imunoenzimático
<b>EMA</b>	Anti-Endomísio
<b>ENA</b>	Anticorpos anti-antígenos nucleares extraíveis
<b>FEIA</b>	Imunoensaio de Fluorescência

<b>HEp-2</b>	Células epiteliais humanas
<b>HT</b>	Tiroidite de Hashimoto
<b>IAA</b>	Anticorpos anti-insulina
<b>ICA</b>	Anti-Células de Ilhéus de Langerhans
<b>IFI</b>	Imunofluorescência Indirecta
<b>IgA</b>	Imunoglobulina A
<b>IgG</b>	Imunoglobulina G
<b>IgM</b>	Imunoglobulina M
<b>OGDC-E2</b>	Subunidade E2 do Complexo Glutarato Desidrogenase
<b>PDC-E2</b>	Subunidade E2 do Complexo Piruvato Desidrogenase
<b>QUIM</b>	Quimérica
<b>RA</b>	Artrite Reumatóide
<b>RIA</b>	Rádioimunoensaio
<b>RF</b>	Factor Reumatóide
<b>SE</b>	Esclerose Sistémica
<b>SLE</b>	Lúpus Eritmatoso Sistémico
<b>SS</b>	Síndrome de Sjögren
<b>SS-A/ Ro</b>	Antigénio A da Síndrome de Sjögren
<b>SS-B/ La</b>	Antigénio B da Síndrome de Sjögren
<b>UC</b>	Colite Ulcerosa
<b>ULS</b>	Unidade Local de Saúde da Guarda
<b>B2 GPI</b>	B2 Glicoproteína I



# I. INTRODUÇÃO



## 1.1 Auto-imunidade e doenças auto-imunes

O termo auto-imunidade (AI) pretende descrever uma complexa rede de respostas imunes contra o próprio, sendo a maioria benéficas para o hospedeiro, mas que por vezes podem ser prejudiciais a ponto de causar ou permitir o desenvolvimento de doenças auto-imune (DAI) e cancro. Dentro do termo AI podem descrever-se dois tipos de respostas imunes, uma resposta positiva e uma que leva ao aparecimento de doença (Figura 1). Assim o sistema imunitário tem como objectivo manter a tolerância e a normalidade contra interferências internas e externas. (Barabas *et al*, 2011)

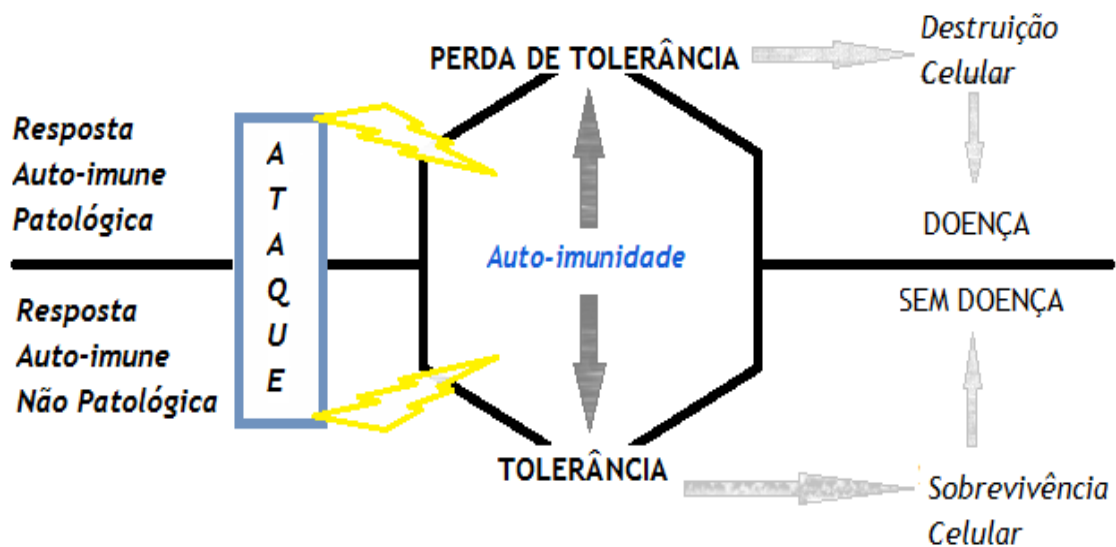


Figura 1 - Tipo de respostas do sistema imunitário. (adaptado de Barabas *et al*, 2011)

## 1.2 Doenças auto-imunes

As doenças auto-imunes (DAI) incluem um conjunto de doenças distintas em termos do seu perfil demográfico e manifestações clínicas, mas que apresentam semelhanças no dano aos tecidos e órgãos em que decorre a resposta aos próprios antigénios (Cooper *et al*, 2003), sendo que nestas se incluem mais de 70 distúrbios distintos. (Lleo *et al*, 2010)

As DAI são classicamente divididas em doenças sistémicas, como a artrite reumatóide (RA), lúpus eritematoso sistémico (SLE), esclerose sistémica (SE) e em doenças específicas de órgão, como tiróidites, diabetes mellitus (DM), doença celíaca (CD) e a cirrose biliar primária (CBP). (Tozzoli, 2008) A etologia destas doenças é ainda desconhecida, mas existem um conjunto de factores ambientais, drogas, químicos e toxinas que podem ser considerados como factores que levem à predisposição para estas doenças. (D'Cruz, 2002)

As DAI são geralmente consideradas como sendo relativamente raras, embora a sua mortalidade e morbidade seja bastante elevada, sendo uma importante causa de morte em mulheres de meia-idade (idade inferior a 65) nos Estados Unidos da América. (Cooper *et al*, 2003)

### 1.2.1. Incidência e prevalência das doenças auto-imunes

Estima-se que a incidência deste tipo de doenças (número de novos casos diagnosticados por ano) seja de um (Hepatite crónica, *Myasthenia gravis*, CBP e Escleroderma) até 20 casos em 100.000 pessoas (caso da Artrite Reumatóide (RA) e da Tireoidite de Hashimoto (HT)). Por seu lado, a sua prevalência (número de pessoas com a doença num tempo específico) varia de cerca de 5 (Hepatite crónica, Uveíte e Granulomatose de Wegener) até 50 indivíduos em cada 100.000 (Doença de Grave's, RA e HT) (Tabela 1). Pode dizer-se que no geral, pelo menos 3% da população dos EUA apresenta uma qualquer DAI (Cooper *et al*, 2003). Estima-se que a população em geral seja afectada entre 5-10% (Selmi, 2008 e Lleo *et al*, 2010) e que essa proporção continue a crescer. (Metskula *et al*, 2006)

**Tabela 1** - Incidência e prevalência de diversas doenças auto-imunes na população dos EUA. (adaptado de Cooper *et al*, 2003; de Tozzoli, 2008 e de Rewers, 2005)

Doenças	Incidência em 100.000 pessoas por ano	Prevalência em 100.000 pessoas
Doença de Addison's	0,6	14,0
Hepatite crónica	0,7	4,0
Glomerulonefrite Primária	3,6	40,0
IgA	2,4	23,2
<i>Diabetes mellitus</i> (tipo 1)		
Idade <20	12,2	192,0
Idade = ou > a 20	8,1	Sem dados
Doença de Graves/ Hipertiroidismo	13,9	1151,5
Esclerose múltipla	3,2	58,3
<i>Myasthenia Gravis</i>	0,4	5,1
Anemia perniciosa	Sem dados	150,9
Polimiosite/ dermatomiosite	1,8	5,1
Cirrose Biliar Primária	0,9	3,5
Artrite Reumatóide Juvenil (idade <16)	17	148,8
Adultos	23,7	860,0
Esclerose Sistémica (escleroderma)	1,4	4,4
Síndrome de Sjögren	3,9	14,4
Lúpus Eritmatoso Sistémico	7,3	23,8
Tiroidite/ Hipotiroide		
10-19 idade	Sem dados	532,1
Idade >19	21,8	791,7
Granulomatose de Wegener	1,0	3,0
Vasculite sistémica primária	2,0	14,5
Doença Celíaca	0,2/1,3	57,1

### 1.2.2. Associação entre género e doenças auto-imunes

Quase todas as DAI afectam maioritariamente as mulheres (Tabela 2). Em algumas doenças (HT, Escleroderma, SLE e Síndrome de Sjögren (SS) mais de 80% dos doentes são do sexo feminino. (Cooper *et al*, 2003 e Selmi, 2008) A disparidade da prevalência entre sexos é mais pequena noutras doenças (por exemplo 60-75% dos doentes do sexo feminino na RA e na esclerose múltipla). Um risco equivalente entre homens e mulheres ocorre em certas doenças frequentes na infância (é o caso da DM) no entanto pode observar-se um maior predomínio do género feminino noutras (RA juvenil). (Cooper *et al*, 2003)

**Tabela 2** - Razão da prevalência das doenças auto-imunes entre sexos. (adaptado de Selmi, 2008)

DAI	Razão entre sexos (feminino:masculino)
Doença de Addison's	De 0,8 a 2,4:1
Miastenia Gravis	5:1
Hepatite crónica	7:1
Doença de Grave's	7:1
Esclerose Múltipla	2:1
Cirroze Biliar Primária	10:1
Artrite Reumatóide	2:1
Síndrome de Sjögren	9:1
Lúpus Eritmatoso Sistémico	9:1
Esclerose sistémica	5:1
Doença Celíaca	1:1
Vasculite sistémica primária	1:1
Diabetes mellitus tipo 1	1:1
Espondilite anquilosante	1:2
Síndrome Guillain-Barré	1:1,25

### 1.2.3. Idades mais frequentes para o aparecimento das doenças auto-imunes

Existe uma diferença notável na distribuição da incidência das DAI nas distintas idades. Embora estas possam ocorrer em qualquer idade, existem picos bem definidos para o início das mesmas. (Cooper *et al*, 2003) Adicionalmente, estudos demonstram que os anticorpos (Acs) aumentam com a idade, sendo encontrados valores elevados em doentes com idade mais avançada. (Hornig *et al*, 1999)

Estudos populacionais recentes que pretenderam determinar a idade de aparecimento do SLE e da esclerodermia provam que essas doenças podem surgir mais tarde (entre os 30 e os 50 anos) do que havia sido relatado noutros estudos anteriores. Outras doenças que ocorrem geralmente entre as idades de 30 e 50 anos incluem a Miastenia *gravis*, Esclerose Múltipla e a Doença de Graves. Uma idade mais avançada no momento do diagnóstico (40-70 anos) é observada na Miosite, na HT, na SS, na RA, na Granulomatose de Wegener, assim como noutros tipos de vasculite sistémica (Tabela 3). (Invernizzi *et al*, 2009)

**Tabela 3** - Distribuição das médias das idades aquando do diagnóstico de certas doenças auto-imunes. (adaptado de Cooper *et al*, 2003 e Sárdi *et al*, 2007)

DAI	Média das Idades
Doença de Addison's	33
Tiroidite	59
Doença de Grave's	48
Esclerose Múltipla	21
Miastenia Gravis	40
Cirrose Biliar Primária	50
Artrite Reumatóide	58
Síndrome de Sjögren	59
Lúpus Eritmatoso Sistémico	40
Esclerose sistémica	50
Doença Celíaca	17,5
Vasculite sistémica primária	63
Diabetes mellitus tipo 1	10
Colite ulcerosa (UC)	48,3
Doença de Crohn (DCr)	41,4
Síndrome Anti-Fosfolípídico (APS)	41,4

As diferenças de idade aquando do surgimento destes distúrbios podem ser associadas a diferentes progressos para cada doença. Por exemplo, o SLE surge 5-10 anos mais cedo nas mulheres do que nos homens. (Cooper *et al*, 2003)

Um outro episódio encontrado foi a existência de diferenças no risco de desenvolvimento de DAI em diferentes países ou grupos étnicos, podendo apresentar uma maior prevalência para uma certa doença e uma menor para outra. (Cooper *et al*, 2003)

É do conhecimento científico que os títulos de autoanticorpos (AAs) aumentam com o incremento da idade, apresentando níveis bastante mais elevados na faixa etária dos idosos (idades superiores a 65 anos). Por outro lado, tem-se observado que estes AAs apresentam títulos instáveis, podendo aumentar ou decrescer com a progressão ou actividade da doença. Estudos baseados no uso de Helicase A de RNA demonstraram, nos doentes com SLE, que os níveis elevados de AAs predominam nos estágios iniciais da doença e o seu título e prevalência diminui quando a doença progride. (Fritzler, 2008)

### 1.3 Autoanticorpos

A presença de AAs proporciona critérios de classificação e de diagnóstico para as DAI. Em vários casos, são ferramentas de prognóstico, agindo como marcadores da actividade da doença ou de lesões celulares e a órgãos. Tal associação pode ser explicada, pelo menos em alguns casos, pela capacidade dos AAs poderem mediar mecanismos patológicos subjacentes a uma determinada doença. (Meroni *et al*, 2008)

Um grande número de AAs dirigidos contra estruturas funcionais da célula (ácidos nucleicos, as moléculas nucleares, receptores ou outros componentes celulares) pode ser detectados nas DAI. (Lleo *et al*, 2010) A detecção de AAs no soro de doentes com suspeita de DAI é uma parte importante do processo de diagnóstico, sendo que a sua utilidade clínica depende da especificidade e sensibilidade dos métodos laboratoriais usados. Um método ideal tem alta sensibilidade e especificidade, ou seja, é preciso e identifica todos os doentes que apresentam efectivamente doença (sensibilidade alta) e é negativo para os que não têm a doença (especificidade do diagnóstico alta). Vários métodos diferentes são usados para detectar AAs com diferentes sensibilidades e especificidades. Os métodos mais utilizados são a imunofluorescência indirecta (IFI) e a ELISA. (Watts, 2002)

Observam-se alguns mecanismos patogénicos exclusivos para as DAI, como acontece nos anticorpos contra receptores na superfície celular que afectam a sua função (portadores de *Miastenia gravis*), enquanto noutras DAI podemos identificar o mesmo tipo de mecanismos envolvidos na defesa contra os vírus (ou seja, ligação de superfície celular e lise). Por outro lado, a patogenia da maioria das DAI é complexa e envolve mais de uma via humoral e celular. (Lleo *et al*, 2010)

Vários estudos têm mostrado que as doenças auto-imunes são precedidas por uma longa fase pré-clínica, e que muitos AAs podem ser detectados no soro de indivíduos assintomáticos, anos antes das manifestações clínicas se tornarem evidentes. (Bizzaro, 2007)

Como nenhum autoanticorpo (AA) oferece 100% de especificidade, o maior desafio é distinguir entre falsos positivos e verdadeiros positivos que prever o início e o desenvolvimento da doença. (Bizzaro, 2007) No entanto, existem AAs característicos em cada doença, que podem ser usados para auxiliar no diagnóstico e permitir um diagnóstico diferencial. (Tozzoli, 2008)

## 1.4 Autoanticorpos mais prevalentes nas Doenças Auto-imunes

### 1.4.1. Autoanticorpos associados à Artrite Reumatóide

Encontram-se descritos alguns AAs relacionados com a RA, esta doença sistémica tem como características a inflamação crónica das articulações sinoviais levando á destruição de tecido ósseo e cartilagineo. De todos os AAs associados a esta doença, apenas três, (o factor reumatóide (RF), os anticorpos anti-péptidos cíclicos citrulinados (ACCP) e os anticorpos contra proteínas que ligam imunoglobulinas (BiP)) têm mostrado sensibilidade e especificidade suficientes para serem considerados clinicamente úteis, no entanto, apenas dois (FR e ACCP) são usados na prática clínica. (Mewar *et al*, 2006)

O factor reumatóide (RF) é um anticorpo IgM ou IgA ou IgG dirigido contra a fracção Fc das moléculas de IgG do próprio indivíduo. Embora 70-80% dos doentes com artrite reumatóide apresentem FR, esses anticorpos não são específicos dessa doença e ocorrem numa ampla gama de DAI e infecções. (Watts, 2002)

Os anticorpos ACCP são um grupo específico de anticorpos (Ac) que tem como alvo resíduos de arginina citrulinados. Estes AAs mostram ter uma sensibilidade comparável com o FR (50-80%), apresentando, no entanto, maior especificidade (cerca de 95%). (Mewar *et al*, 2006)

### 1.4.2. Anticorpos anti-nucleares

Os anticorpos anti-nucleares (ANA) são AAs dirigidos contra as proteínas nucleares e ácidos nucleicos. Apesar do seu nome, vários dos antígenos (Ags) responsáveis pelo aparecimento destes AAs estão parcial ou totalmente localizados no citoplasma celular. Os anticorpos ANA mais comuns reagem com complexos de DNA-proteína ou RNA-proteína. O “screening” dos ANA é uma etapa inicial importante na avaliação das DAI, principalmente as DAI sistémicas. O método de detecção destes AAs mais usado é a imunofluorescência indirecta (IFI) em linhas de células humanas cultivadas como as HEp-2 (células epiteliais humanas), uma vez que tanto a célula como os seus organelos são facilmente identificados. Estas células dividem-se rapidamente e apresentam Ag que são apenas escassamente presente ou ausentes nos núcleos de células em cortes de tecido. (Watts, 2002)

#### 1.4.2.1 Anticorpos anti-DNA de dupla cadeia

A detecção de Acs anti-DNA de cadeia dupla (anti-dsDNA) é fundamental para a monitorização dos doentes com LES, sendo o seu título elevado associado com a evolução dos danos nos rins, no entanto, estes são encontrados numa ampla variedade de patologias auto-imunes e infecciosas. Os Ac anti-dsDNA podem ser detectados através de vários métodos (rádio imunoensáio (RIA), imunoensáio de fluorescência (FEIA), ensaio imunoenzimático (EIA) e IFI). O mais específico é o IFI *Crithidia luciliae*, que é um protozoário flagelado tem um cinetoplasto contendo dsDNA circular. (Watts, 2002)

#### 1.4.2.2 Anticorpos contra antígenos nucleares extraíveis

A detecção dos Acs contra Ag nucleares extraíveis (ENA) é útil no diagnóstico de várias DAI. Os determinantes antigénicos das ribonucleoproteínas (RNP) são encontrados associados com o U1-RNA, enquanto que os determinantes Sm estão presentes em U1, U2 e U4 e U6 RNA. Outros dois antígenos nucleares importantes, o Ro e o La, são AAs associados com a Ss. Foram identificados AAC para seis das 20 tRNA sintetases existentes em doentes com polimiosite. Têm sido descritos os seguintes AAC contra o tRNA sintetases: Jo-1 (histidil), PL-7 (treonil), PL-12 (alanil), JO (isoleucil), EJ (glicil) e SK (asparaginil). O anti-Jo-1 é o mais comum e tem sido associado a cerca de 30% dos doentes com Miosite. O anti-Scl-70 associa-se à variante cutânea da esclerodermia. Os anticorpos anti-centrómero (detectados por IFI em células HEp-

2) são específicos para a variante cutânea da Esclerodermia e reage com o cinétocoro de cromossomas em metafase. (Watts, 2002)

#### 1.4.3. Anticorpos anti-fosfolípidos

Os Acs anti-fosfolípidos (aPL) (particularmente os Acs anti-cardiolipina (ACA)) são responsáveis pela existência de falsos positivos nas análises da VDRL e anticoagulante lúpico, em doentes com síndrome anti-fosfolípido (APS) primário e em alguns pacientes com LES. Interações de fosfolípidos com o cofactor  $\beta_2$  da glicoproteína I ( $\beta_2$ - GPI) são necessárias para a antigenicidade dos ACA. Os aPL estão associados a um risco aumentado de trombose vascular, perda fetal recorrente, livedo reticularis e trombocitopenia. Métodos comerciais para detecção de anticorpos contra a  $\beta_2$ - GPI foram inseridos no rastreio dos doentes que se pensa terem APS, e sabe-se que estes anticorpos apresentam uma melhor relação com a trombose do que os anticorpos ACA. (Watts, 2002)

#### 1.4.4. Anticorpos anti-citoplasma de neutrófilos

Os Acs anti-citoplasma de neutrófilos (ANCA) foram inicialmente detectados nos soros de doentes com vasculite sistémica. Os ANCA são específicos para as proteínas dos grânulos de neutrófilos e monócitos. Foram identificados dois alvos antigénicos principais - proteinase 3 (PR3), que se encontra associado com padrão citoplasmático em IFI (cANCA), e a mieloperoxidase (MPO), que está associado com o padrão peri-nuclear em IFI (pANCA). A combinação de cANCA e PR3 é altamente específica (> 90%) para Granulomatose de Wegener, enquanto pANCA e MPO ocorre em Poliangeite microscópica e Síndrome de Churg-Strauss, entre outras, apresentado no entanto outras especificidades. (Watts, 2002)

#### 1.4.5. Autoanticorpos associados a doenças inflamatórias intestinais

As doenças inflamatórias intestinais (DII), nas quais se incluem a Doença de Crohn (DCr) e a colite ulcerativa (UC), entre outras, estão entre os distúrbios gastrointestinais mais comuns. Tanto as imunoglobulinas IgA como as IgG contra componentes oligoméricos de *Saccharomyces cerevisiae* (anticorpos anti- *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA)) apresentaram maior prevalência em doentes com DCr (50% -70%) do que em doentes com UC (10% -15%). Assim pode afirmar-se que os ASCA são marcadores serológicos promissores para o diagnóstico destas DCr, no entanto, nem só os ASCA têm mostrado especificidade para esta patologia sendo os ANCA, os Ac anti-células calciformes intestinais e os Ac anti-acinos pancreáticos

também úteis no diagnóstico desta doença. Os ASCA apresentam uma elevada sensibilidade (cerca de 60%) e especificidade (até 80% dependendo dos métodos), apresentando-se esta última mais elevada para os ASCA IgA. A presença destes AAs parece preceder os sintomas clínicos, na medida em que sua presença foi demonstrada antes do diagnóstico de DCr (Russell *et al*, 2009).

#### 1.4.6. Anticorpos anti-mitocondriais

Os Acs anti-mitocondriais (AMA) são Acs contra constituintes mitocondriais e que se encontram presentes na CBP com uma prevalência em 90-95% dos doentes, sendo originalmente a sua detecção feita pelo método IFI. A CBP é uma doença hepática colestática crónica, caracterizada pela destruição progressiva das vias biliares e que em casos graves leva a fibrose e cirrose hepática. Dentro do espectro de marcadores serológicos da CBP há um interesse crescente nos anticorpos anti-sp100 e anti-gp210, que se enquadram dentro dos antigénios nucleares, sendo que o primeiro apresenta reactividade contra componentes nucleares e o segundo contra o complexo do poro nuclear. Embora estes AAs possuam uma baixa sensibilidade, apresentam uma elevada especificidade para esta doença (superior a 99%) e podem ser considerados marcadores da doença nos casos em que os AMA se apresentam ausentes (Lleoi *et al*, 2008).

#### 1.4.7. Anticorpos anti-gliadina e anti-transglutaminase tecidular

Os Acs anti-gliadina (AGA), os Ac anti-transglutaminase tecidular (AtTG) e os Acs anti-endomisio (EMA) são os AAs mais prevalentes na CD, sendo os primeiros os mais usados na rotina clínica. A CD é uma doença inflamatória em que o doente se torna sensível ao glúten, mediada por linfócitos T e que afecta maioritariamente o intestino delgado. O diagnóstico definitivo requer biopsia intestinal. (Vermeersch *et al*, 2009) A associação entre a transglutaminase tecidular e a gliadina deve-se ao facto de as células T intestinais de pacientes celíacos responderem a péptidos específicos de gliadina que tenham sido desaminados, um processo que é mediado pela ligação das transglutaminases a péptidos de gliadina. A gliadina, um componente do glúten é usada como Ag para a detecção serológica de AGA por ELISA. Os níveis de AGA IgA e de AGA IgG são frequentemente elevados em casos não tratados, no obstante estes AAs apresentam moderada sensibilidade e especificidade, por seu lado, os AAs AtTG apresentam sensibilidades e especificidades mais elevadas (Marietta *et al*, 2009).

#### 1.4.8. Autoanticorpos associados à Tireoidite de Hashimoto

Os Ac anti-tireoglobulina (ATg) e Ac anti- peroxidase tiroideia (anti-TPO) têm sido utilizados para diagnosticar a HT (Takasu, N; 2008).

Os Ac anti-TPO são dirigidos contra a enzima-chave dos tirócitos. Estes AAs são detectados em concentrações elevadas em quase todos os doentes com HT. A HT é caracterizada por uma extensa fase pré-clínica, onde a detecção dos AAs anti-TPO é associada à existência de infiltração linfocitária precoce da glândula da tiróide, sendo que estes AAs precedem os primeiros sintomas clínicos em cerca de 10 anos. (Tozzoli, 2008)

#### 1.4.9. Auto-anticorpos presentes na Diabetes *Melittus* tipo 1

Na DM, a resposta auto-imune é dirigida contra alvos moleculares relacionados com os ilhéus de Langerhans. Os Ags existentes dos ilhéus e que são importantes no DM são a (pro) insulina, a isoforma de 65 kDa da descarboxilase do ácido glutâmico (GAD65). Os AAs correspondentes são conhecidos como Ac anti-insulina (IAA) e Ac anti-descarboxilase do ácido glutâmico (GADA), existindo no entanto outros AAs associados a esta patologia. Os sintomas desta doença são precedidos por Ac anti-ilhéus de Langerhans (ICA). (Tozzoli, 2008)

Na tabela seguinte (Tabela 4) podem observar-se as principais associações de AAs com diversas DAI.

**Tabela 4** - Associação de diversos autoanticorpos com algumas doenças auto-imunes. (adaptado de Watts, 2002)

AAs	Prevalência (%)	Aplicações Clínicas
Anticorpo anti-nuclear (ANA)	95/98	Útil no diagnóstico do SLE mas não é específico.
Anticorpos anti- dsDNA	50/80	Específico para SLE.
Anticorpos do Síndrome de Sjögren's		
SS-A 60 kDa	30	Lúpus neo-natal, SLE cutâneo sub-agudo.
SS-a 52 kDa	?	Polimiosites
Factor Reumatóide (RF)	80	Dos doentes com AR. Não específico para a

AAs	Prevalência (%)	Aplicações Clínicas
		AR.
	30	Dos doentes com SLE.
	70/80	Dos doentes com síndrome de Sjögren
	20/30	Dos doentes com esclerose sistémica
	5	Das pessoas que não apresentam doença
Anticorpos anti-fosfolipídicos*	95/100	Dos doentes com síndrome de Hughes: Trombose, gravidez com elevada morbidade
Anticorpos anti-mitocondriais (AMA)	90/95	Dos doentes com PBC.
Anti-tiroglobulina	76/100	Dos doentes com doença de Hashimoto.
	33	Dos doentes com Hipertiroidismo.
Anticorpos anti-gliadina (AGA)	100	Dos doentes celíacos.
Anticorpos anti-endomisio (EMA)	98	Dos doentes celíacos.

(\* principalmente os anticorpos anti- cardiolipinas (ACA))

A presença e a concentração de AAs séricos reflectem a intensidade de algumas respostas imunes em muitas DAI, e podem ser marcadores úteis para a predição da actividade da doença e gravidade durante o desenvolvimento destas doenças, assim como para o prognóstico a longo prazo. (Tozzoli, 2008)

## 1.5 Autoanticorpos com valor preditivo

Existem algumas evidências científicas a apoiar o valor indicativo de muitos AAs para prever o desenvolvimento de uma DAI em indivíduos assintomáticos com bastante antecedência. (Bizzaro, 2007) No entanto, nem todos os AAs podem ser preditivos ou específicos para certas DAI. Determinados Acs são raramente encontrados em grupos com diagnóstico bem estabelecido e por essa razão têm sido referidos como AAs “esotéricos” ou “órfãos”. (Meroni *et al*, 2008) No entanto, vários estudos têm demonstrado que existem diversos AAs que predizem (têm valor preditivo) para o desenvolvimento de determinada DAI. (Bizzaro, 2007)

### 1.5.1. Anticorpos anti-nucleares no Lúpus Eritmatoso Sistémico

Num estudo com militares dos EUA onde se analisaram 130 pacientes com LES, 88,5% apresentaram pelo menos um dos AAs associado a esta doença antes do diagnóstico (até 9,4 anos mais cedo, com média de 3,3 anos) e antes do aparecimento da primeira manifestação clínica. Encontraram-se ANA em 78% dos doentes, anticorpos anti-dsDNA em 55%, anti-Ro em 47%, anti-La em 34%, anti-Sm em 32% e anti-RNP em 26%. A presença dos ANA, anti-Ro e anti-La foi mais precoce que os anti-Sm e anti-RNP. Dos 130 controles estudados, 3,8% apresentaram positividade para um ou mais AAs. Assim, o valor preditivo positivo da presença de AAs variou de 94,7% para os anti-dsDNA, a 100% para o anti-Sm, com um valor médio de 95,8% para todos os anticorpos considerados no estudo. (Bizzaro, 2007)

Os Acs anti-dsDNA são detectáveis em cerca de 95% dos doentes não tratados com SLE activo sendo que os seus títulos diminuem após a administração de terapêuticas eficazes. A determinação de Acs anti-dsDNA nos soros destes doentes tem-se tornado uma ferramenta importante no algoritmo de diagnóstico e no acompanhamento da doença. O seu potencial para prever surtos da doença e eficácia da terapêutica tem sido amplamente avaliado sob diferentes cenários clínicos e experimentais. (Munoz *et al*, 2008)

### 1.5.2. Anticorpos anti-fosfolípidos na Síndrome anti-fosfolípídica

Os aPL são marcadores de diagnóstico da síndrome anti-fosfolípídica (APS). Os aPL encontram-se associados a um elevado de risco para a ocorrência de eventos trombóticos e repetição nas complicações na gravidez. A  $\beta_2$ -glicoproteína I ( $\beta_2$ -GPI) e a protrombina (PT) são os principais antígenos fosfolípidicos de ligação às proteínas reconhecidas pelos anticorpos. Há ainda algumas controvérsias sobre o seu valor preditivo para as manifestações vasculares ou complicações da gravidez. (Meroni *et al*, 2008)

Em eventos trombo-embólicos os anticorpos anti- $\beta_2$ GPI apresentam, aparentemente, uma maior especificidade e valor preditivo do que os ACA. Resultados semelhantes também foram relatados em relação ao valor preditivo de manifestações obstétricas desta síndrome. (Meroni *et al*, 2008)

### 1.5.3. Anticorpos anti- péptidos cíclicos citrulinados e o Factor Reumatóide na Artrite Reumatóide

O valor preditivo dos RF tem sido comprovado em numerosos estudos. No entanto, recentemente, a prática clínica tem sido emparelhar o estudo dos ACCp com estes AAs (que

apesar de tudo apresentam um valor preditivo baixo) e que apresentam elevada sensibilidade, mas baixa especificidade. Devido à elevada especificidade dos AAs ACCp (cerca de 70%) estes podem ser associados a um valor preditivo de diagnóstico e prognóstico em doentes com AR. (Bizzaro, 2007) Conclusão que também se pode tirar devido ao facto destes AAs estarem presentes anos antes das primeiras manifestações clínicas da doença. (Venjrooij *et al*, 2006) Além disso, os ACCp também podem prever o desenvolvimento da AR em pacientes com artrite indiferenciada. (Bizzaro, 2007)

#### 1.5.4. Anticorpos anti-peroxidase tiroideia no Hipotiroidismo

Os Acs anti-TPO são os principais marcadores de DAI da tiróide, especialmente HT, que se caracteriza por uma longa fase pré-clínica, com infiltração linfocitária progressiva da glândula, e a presença de Ac anti-TPO. Estudos mostram que a presença de anti-TPO pode preceder os primeiros sintomas clínicos em décadas. (Bizzaro, 2007)

#### 1.5.5. Anticorpos anti-mitocondriais na Cirrose Biliar Primária

Os AAs anti-mitocondriais tipo 2 (AMA-M2), dirigidos contra os componentes dos complexos 2-oxo-ácido desidrogenase da membrana interna da mitocôndria, são marcadores serológicos clássicos do PBC. O antígeno (Ag) alvo principal da AMA-M2 é a subunidade E2 da piruvato desidrogenase (PDC-E2). Nos últimos anos, o uso generalizado da AMA em perfis de AAs conduziu a um diagnóstico mais precoce do PBC, como consequência de vários estudos prospectivos, demonstrando assim que os auto-anticorpos podem ser detectados anos antes dos sintomas clínicos da doença se revelarem. (Tozzoli, 2008)

Em 1986, Mitchison relatou um grupo de 29 pacientes que obtiveram resultados positivos para os AMA, o marcador de doença específico para a PBC, mas que apresentavam função hepática normal e não possuíam sintomas de doença no fígado. No entanto, observou-se que quase todos os doentes que haviam apresentado positividade para os AMA (24 doentes), mesmo na ausência de danos clínicos ou bioquímicos de dano hepático, já tinha apresentado lesões histológicas compatíveis com PBC ou surgiram evidências da doença nos anos que se seguiram. Outro estudo demonstrou que depois da deteção da presença de AMA, 50% dos pacientes desenvolveram sintomas após 5 anos e 95% após 20 anos. (Bizzaro, 2007)

Conjuntamente, esses estudos mostram que os AMA poderão estar presentes, antes da manifestação clínica da PBC e que eles apresentam um muito elevado valor preditivo positivo. (Bizzaro, 2007)

### 1.5.6. Anticorpos anti-células de ilhéus de Langerhans na Diabetes

#### *Melittus* tipo 1

Os ICA e os anticorpos contra a insulina, 65-kD descarboxilase do ácido glutâmico e tirosina fosfatase são preditores de diabetes tipo 1 e representam a resposta auto-imune contra as células da ilhota pancreática, já se encontrando presentes durante a fase pré-clínica da doença. (Bizzaro, 2007)

Em vários estudos prospectivos efectuados em diabéticos e noutras populações foi demonstrado que os métodos apresentaram uma elevada, mas não absoluta especificidade e sensibilidade (cerca de 90%). De facto, alguns dos indivíduos não desenvolveram diabetes durante muitos anos e alguns dos indivíduos diabéticos não parecem apresentar anticorpos antes do início da doença, embora o risco de diabetes aumente progressivamente com o número de AAs positivos. (Bizzaro, 2007)

### 1.5.7. Anticorpos anti- transglutaminase tecidular na Doença Celíaca

Os Ac AtTG e os Ac EMA são métodos serológicos úteis para detectar a CD. O seu valor de diagnóstico (sensibilidade e especificidade) é elevado e o seu valor preditivo para o início da doença foi recentemente documentado. Estudos mostram que, em jovens, a positividade do AtTG é comum ser transitória e que o valor preditivo de Ac AtTG não é superior a 50-60%. No entanto, como a taxa anual de sero-conversão dos Ac AtTG até 6 anos de idade é de cerca de 1%, é possível que, pelo menos uma parte das crianças com biopsias de intestino negativas, possam desenvolver CD nos anos seguintes. (Bizzaro, 2007)

### 1.5.8. Anticorpos anti- *Saccharomyces cerevisiae* nas Doenças inflamatórias intestinais

Vários Acs (pANCA, ASCA, entre outros) têm sido associados com diferentes fenótipos clínicos de DCr. (Tozzoli, 2008) A identificação dos ASCA como marcadores para DCr abriu novas possibilidades para a classificação e diagnóstico desta doença inflamatória crónica intestinal. O seu valor preditivo foi recentemente documentado. As amostras de soro de 32 indivíduos que posteriormente foram diagnosticadas para a DCr e de 8 com colite ulcerosa, foram analisados para os AAs ASCA; 95 amostras controlo, foram também estudados. Os ASCA estiveram presentes em 10/32 (31,3%) dos doentes, em comparação com 0/95 controlos (P <0,001). Com isto pode concluir-se que os ASCA estão presentes mesmo antes do aparecimento dos sintomas da doença. Nenhum dos oito pacientes com UC foi positivo para os

ASCA. O intervalo médio entre a detecção dos ASCA e o diagnóstico da doença foi de 38 meses. (Bizzaro, 2007)

## 1.6 Estudos de prevalência de autoanticorpos em dadores de sangue

Os dadores de sangue são considerados pessoas saudáveis e a maioria dos estudos utiliza-os para comparar a prevalência e incidência de um certo AA, ou seja, na maioria das vezes servem de população de controlo e não de população em estudo. Assim sendo, notou-se a existência de um pequeno número de estudos que tenha como objectivo estudar e analisar os níveis de AAs serológicos neste tipo de população. Seguidamente, descrevem-se os principais objectivos e conclusões de diversos estudos de prevalência realizados em dadores:

### 1.6.1. “Prevalência de anticorpos anti-mitocondriais no soro de dadores de sangue saudáveis.”

O principal objectivo deste estudo foi detectar a presença de ANA em 500 dadores de sangue brasileiros com idades entre os 18 e os 60 anos (média de 33,1 anos) e com uma distribuição de género de 63,6% de dadores do sexo masculino e 36,4% do sexo feminino. A presença deste tipo de AAs foi detectada em 22.6% das amostras estudadas, em que a maioria apresentou títulos 1/140. Não foi significativa a presença de outros AAs (Fernandez *et al*, 2003).

### 1.6.2. “Prevalência da Doença Celíaca em dadores de sangue aparentemente saudáveis na Comunidade Autónoma de Madrid.”

O objectivo deste estudo foi determinar a prevalência da CD entre 2215 dadores de sangue adultos moradores em Madrid com idades compreendidas entre os 18 e os 65 anos (média de  $32,2 \pm 12,4$  anos), A determinação AAs contra a transglutaminase tecidual (AtTG IgA) foi realizada em 1285 homens (58%) e 930 mulheres (42%) por métodos serológicos. A prevalência destes AAs em dadores de sangue assintomáticos e que anteriormente não tenham sido diagnosticados como doentes celíacos (pelo questionário feito aquando da colheita de sangue) foi de 0,5%. (Novo *et al*, 2007))

### 1.6.3. “*Screening* de anticorpos anti-tran glutaminase tecidular associados à Doença Celíaca em dadores de sangue. *Screening* na população Turca.”

Este estudo teve como finalidade a determinação da prevalência de CD em dadores de sangue saudáveis. O soro de 2000 dadores, maioritariamente do sexo masculino (95,7%) e com uma média de idades de  $32 \pm 9$  anos, foi analisado para os Acs AtTG IgA e AtTG IgG. Em 23 dadores (1,15%) foram detectados AAs IgA e 3 foram positivo para a AAs IgG, sendo que não houve amostras positivas simultaneamente para as 2 classes de Acs, sendo que a prevalência total de anticorpos AtTG foi de 1,3% para este grupo de dadores de sangue Turcos. (Tatar *et al*, 2004)

### 1.6.4. “O uso de um único marcador serológico subestima a prevalência da Doença Celíaca em Israel: um estudo de dadores de sangue.”

Foi usada uma estratégia de combinações de múltiplos marcadores serológicos para explorar a prevalência da CD em Israel e a utilidade dos vários anticorpos no exame desta. Para isso foram testados 1571 dadores de sangue. Foi sugerida a execução de uma biópsia ao intestino delgado a todos os dadores que tivessem dado positivo para os anticorpos AtTG, analisaram-se os anticorpos EMA e os AGA IgA, tendo sido feita a análise dos AGA IgG nas amostras com défice de imunoglobulina A. (Shamir *et al*, 2007)

A CD foi diagnosticada em 10 pacientes, estabelecendo uma prevalência de 1:157 (0,6%) na população geral. O uso de apenas um marcador serológico teria sub-estimado a prevalência desta, já que em apenas dois pacientes obtiveram resultados positivos para AAs EMA (prevalência de 0,1%) e seis pacientes obtiveram valores positivos para os AAs AtTG (prevalência de 0,4%) (Shamir *et al*, 2007).

### 1.6.5. “Alta prevalência da Doença Celíaca em dadores de sangue voluntários brasileiros com base no rastreamento de anticorpo AtTG.”

Um estudo transversal, realizado em S. Paulo, Brasil, envolveu 3.000 dadores de sangue, 1500 homens e 1500 mulheres, com idade média  $34,4 \pm 10,8$  anos. Cada participante com níveis de Acs AtTG IgA acima de 10 U/ml foi convidado a submeter-se a uma biópsia do intestino delgado através de uma endoscopia alta digestiva. (McIntyre *et al*, 2003)

Os Ac AtTG foram positivos em 1,5% (45/3000) da população estudada. De entre o grupo com anticorpos positivos, 21 (46,6%) concordaram em fazer uma biopsia, e dentro destes o padrão histológico de atrofia das vilosidades foi confirmado em 66,7% (14/21). Consequentemente, a prevalência de CD foi no mínimo de 0,47%. (McIntyre *et al*, 2003)

#### 1.6.6. “Frequência e especificidade dos anticorpos anti-fosfolípidos em dadores de sangue voluntários.”

Neste trabalho foi estudada a incidência de aPLs (ACA, anticorpos anti-fosfatidilserina (aPS), anticorpos anti- fosfatidiletanolamina (aPE) e anticorpos anti- fosfatidilcolina (aPC)) de isotipos IgG, IgA e IgM em 775 dadores de sangue no Indiana (EUA). A média das suas idades foi de 43 anos, com um intervalo dos 17 aos 82 anos e 45% dos dadores eram do sexo feminino. 63 dadores (8,1%) apresentaram pelo menos um isotipo de imunoglobulinas (IgG, IgA ou IgM) positivo com um ou mais das quatro especificidades de aPL (ACA, aPS, aPE ou aPC). O aPE foi mais prevalente, seguido do ACA, aPS e aPC. Observou-se reactividade cruzada entre os ACA e os aPS, mas raramente se encontrou a junção de aPE e os aPC no mesmo dador. Apenas um dador tinha anticorpos para ambos os aPE e os aPS. (McIntyre *et al*, 2003)

#### 1.6.7. “Auto-anticorpos específicos precedem os sintomas de Artrite Reumatóide”

Diversos AAs têm sido detectados em amostras de soro de indivíduos saudáveis até 10 anos antes de desenvolverem RA. Os doentes com AR que foram anteriormente dadores de sangue antes do início dos sintomas da doença foram registados. Aceitaram entrar no estudo 79 ex-dadores de sangue (49 mulheres (62%) e 30 homens) com idade média de início dos sintomas de 51,4 anos. Todas as amostras foram testadas para o FR IgM e ACCp. Foram recuperadas amostras antigas com uma média de 7,5 anos (intervalo 0,1-14,5) antes do início dos sintomas. Trinta e nove pacientes (49%) foram positivos para RF IgM e/ou ACCp em pelo menos uma ocasião, antes do desenvolvimento dos sintomas de RA, uma média de 4,5 anos (intervalo 0,1-13,8) antes do início dos sintomas. Das 2.138 amostras controlo, 1,1% foram positivos para IgM-RF, e 0,6% foram positivos para ACCp. Concluiu-se que aproximadamente metades dos doentes com AR apresentam alterações serológicas específicas vários anos antes do início dos sintomas. Concluiu-se que níveis séricos elevados de RF IgM ou Ac ACCp num indivíduo saudável acarretam um risco elevado para o desenvolvimento da AR. O FR IgM e os AAs ACCp são métodos com alta especificidade adequada para auxiliar na detecção precoce da AR em populações de alto risco. (Nielen *et al*, 2004)

### 1.6.8. “ANAs, anticorpos anti- citoplasmáticos (ACI) anticorpos anti-SS-A/Ro em dadores de sangue do sexo feminino.”

Foi realizado um estudo com 2500 soros de dadores de sangue do sexo feminino com idades entre 20 e 50 anos para determinar a frequência dos ANA, ACI e AMA. Quando os soros foram testados por IFI em células HEp-2, 15,9% tiveram títulos superiores a 1/20 e 1,1% tiveram títulos superiores a 1/80 para os ANA IFI. A análise destes soros para AAS específicos mostrou: 1,5% ANA, 1,0% da matriz anti-nuclear, 0,2% aparelho anti-fuso mitótico. Títulos superiores a 1/80 foram observados em 2,5% das fluorescências positivas para AMA IFI e títulos superiores a 1/160 foram observados em 1,0% das amostras positivas para os AMA IFI. Nenhum dos soros apresentou AAs anti-dsDNA. Foi feito um ensaio adicional de 2.500 soros para o estudo dos anticorpos anti-SS-A/Ro que revelou a frequência 0,44% sendo esta mais elevada na faixa etária 45-50 (0,72%) e relativamente alta (0,58%) nos grupos etários 20 - 24. (Fritzler *et al*, 1985)

Embora não abundem os estudos sobre a prevalência de AAs na população Portuguesa e não se ter encontrado, na bibliografia existente, estudos em dadores de sangue Portugueses, é de ressaltar um trabalho feito em 2006 em que foi realizada a “*Primeira determinação de prevalência de doença celíaca numa população Portuguesa*”. Foram estudados jovens (14± 0.5 anos) que não estavam diagnosticados para a CD (e na sua grande maioria assintomáticos) rastreando os AAc AtTg e os EMA. Obtiveram uma prevalência de CD de 0,75% (1:134). (Antunes *et al*, 2006)

## 1.7 Objectivos do estudo

Como já foi referido anteriormente, os AAs encontram-se em níveis serológicos que permitem a sua detecção anos antes do aparecimento das DAI. Sendo assim, com este trabalho pretendeu-se fazer um estudo inédito em Portugal, já que é a primeira vez que é determinado um leque tão alargado de AAs (ASCA, ACA, AMA, ANA, ACCp, RF, AtTG, AGA), numa amostra significativa de indivíduos saudáveis (dadores de sangue). Além disso, neste trabalho tentou-se ir mais longe e determinou-se a especificidade de cada AA positivo determinando assim não só a prevalência de cada um destes AA como criando um perfil de AA. Com o cálculo do *score* de cada dador pretendeu-se calcular o risco de futuramente ocorrer doença para cada dador.

Assim pode dizer-se que o objectivo deste trabalho foi analisar um conjunto variado de diversos AAs preditivos associados a certas DAI para estabelecer a sua prevalência em dadores de sangue portugueses.



## **II. MATERIAIS E MÉTODOS**



## 2.1 População em Estudo

Foram estudados os soros de 821 dadores benévolos de sangue. As amostras de soro foram obtidas a partir de colheitas sanguíneas em dadores de sangue de ambos os sexos e com idades compreendidas entre os 18 e os 65 anos. Estes efectuaram as suas dádivas no Hospital de São Teotónio, em Viseu, durante um ano. Os soros estudados foram obtidos após centrifugação de 10 mL de sangue total a 4500 rotações durante 5 minutos, numa centrífuga refrigerada (2-8 °C). O soro obtido foi dividido em duas alíquotas, devidamente identificadas e posteriormente congeladas a -80°C até ao momento da sua análise. Antes da recolha das amostras, todos os sujeitos foram informados dos objectivos do estudo e assinaram uma declaração de consentimento informado (Declaração de Helsínquia). A realização deste estudo só foi possível depois do estudo ser aceite pelo Conselho de Ética do HST de Viseu.

## 2.2 Equipamento utilizado

Neste trabalho foram usados diversos equipamentos, nos quais se efectuaram distintas metodologias, e que processaram e analisaram as amostras em estudo.

Todas as amostras que foram analisadas pelo método de ELISA foram executadas no analisador automático GRIFOLS Triturus® (Figura 2) Os métodos ELISA usados basearam-se no método de imunoensaio de sanduíche.

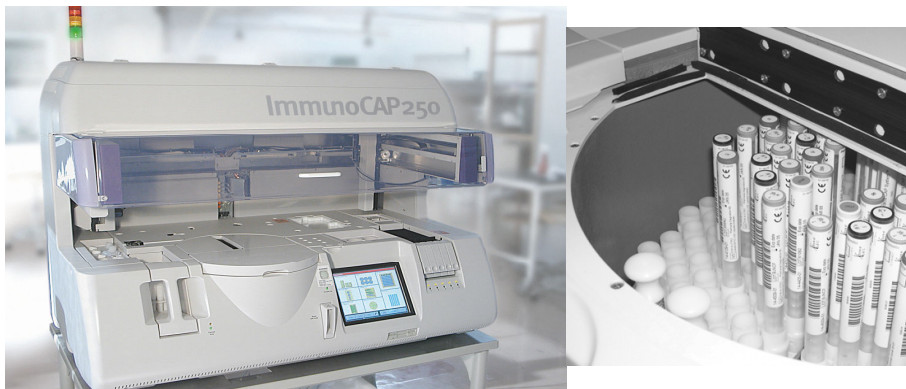


**Figura 2** -Analisador automático TRITURUS® onde foram executadas todas as técnicas de ELISA.

[adaptado de

<http://www3.surrey.ac.uk/MDA/Pages/GuildfordEvaluations/PreviousReports/Reports/Grifols%20Triturus.html> a11/04/11]

Por sua vez, todas as amostras que foram analisadas segundo o método FEIA foram estudadas usando o analisador automático ImmunoCAP 250® (Figura 3).



**Figura 3** - Analisador automático ImmunoCAP 250® e canetas com 10 a 12 poços onde estão fixados os antígenos (específicos para cada caneta) que irão reagir com os AA dos soros. [adaptado de <http://www.ddm360.com/en/detail1.asp?id=4>, a 11/04/11]

Para a execução método IFI foram usados dois aparelhos, um para processamento das lâminas e outro para a sua visualização. Para o processamento das amostras foi usado o PhD™ (BIO-RAD SA.®) que é um processador de lâminas automático, por seu lado, para a visualização dos padrões obtidos, foi usado o microscópio Nikon Eclipse E600®, com uma lâmpada de 100W de mercúrio (Figura 4).



**Figura 4** - Analisador PhD™. (adaptado de [http://www3.biorad.com/B2B/BioRad/product/br\\_category.jsp](http://www3.biorad.com/B2B/BioRad/product/br_category.jsp), a 20/05/11) e microscópio Nikon Eclipse E600 (adaptado de <http://www.labx.com/v2/spiderdealer2/vistasearchdetails.cfm?LVid=7733703>, a 20/05/11)

Ainda se usou um nefelômetro cinético automático, o IMAGE (BECKMAN COULTER®). O sistema mede a velocidade de aumento da dispersão da luz produzida pelas partículas

suspendidas na solução, resultantes dos complexos formados durante uma reacção antigénio-anticorpo (Figura 5).



Figura 5 - O nefelómetro IMAGE (BECKMAN COULTER®) (adaptado de [http://www.beckmancoulter.ch/clinical\\_diagnostics/image-800.asp](http://www.beckmancoulter.ch/clinical_diagnostics/image-800.asp), 05/06/11).

## 2.3 Métodos de Pesquisa e Confirmação de autoanticorpos

Cada amostra de soro foi sujeita à pesquisa e confirmação, por métodos distintos, de diversos AAs: ASCA, AMA, AGA, Acs AtTG, ANA, RF e Acs ACCp. Em todas as amostras foram pesquisados por um ensaio imuno-enzimático (ELISA) os ASCA (IgG e IgA separadamente), os ACA (IgA, IgG e IgM conjuntamente), os AMA M2, os ANA, o RF (IgG/IgM/IgA), os Acs aCCp IgG e os AGA (IgG e IgA conjuntamente) assim como os Acs AtTG (IgA e IgG conjuntamente). Os reagentes usados para estas determinações foram cedidos pela firma *A. Menarini diagnostics* ao abrigo do protocolo para o estudo de DAI celebrado entre o Serviço de Patologia Clínica da Unidade Local de Saúde da Guarda (ULS). Todos os resultados obtidos com estes reagentes foram confirmados por métodos previamente validados no Serviço de Patologia Clínica da ULS e em utilização pelo menos 5 anos.

### 2.3.1 Caracterização do perfil de autoanticorpos anti-*Saccharomyces cerevisiae* (ASCA)

Os AA foram determinados usando o método de ELISA usando os métodos ASCA IgA e ASCA Ig G (A. Menarini®).

### 2.3.1.1 Métodos para pesquisa e identificação dos ASCA

Detecção de anticorpos ASCA IgG e ASCA IgA em soro humano. A fase sólida é composta por Ags *Saccharomyces cerevisiae* que se encontravam ligados a micropoços de poliestireno.

- Controlo de Qualidade

Para cada método (determinação dos ASCA IgG e ASCA IgA) fez-se o branco e os controlos positivos e negativos.

- Interpretação dos resultados

Os resultados iguais ou superiores a 20 UE/mL foram considerados positivos para a presença destes anticorpos.

Procedeu-se à confirmação das amostras positivas, usando o mesmo método (ELISA), mas usando reagentes de outra marca (ASCA IgA e ASCA IgG (INOVA diagnostics)).

### 2.3.1.2 Método de confirmação do ASCA IgA e ASCA IgG

Detecção semi-quantitativa de Acs ASCA, um para a determinação de ASCA IgA e ASCA IgG no soro, como fase sólida foram usados os antigénios purificados (*Saccharomyces cerevisiae*) ligados a uma placa de poliestireno.

- Controlo de Qualidade

Foi efectuado o controlo positivo baixo, o controlo positivo alto, o controlo negativo e o branco.

- Interpretação dos resultados

As amostras com resultados menores de 20 UE/mL foram consideradas negativas, por contrário, os resultados iguais ou superiores foram considerados positivos.

### 2.3.2 Caracterização do perfil dos autoanticorpos anti-fosfolipídios

Para a análise do perfil de AAs anti-fosfolipídios efectuou-se o método ELISA para a determinação de ACA (A. Menarini®).

#### 2.3.2.1 Métodos para pesquisa e identificação dos ACA

Detecção conjunta de Acs ACA das classes IgA, IgG e IgM. A fase sólida usada foi o Ag cardiolipina que se encontrava fixo em micropoços de placas de poliestireno.

- Controlo de Qualidade

Em todos os ensaios foi executado o branco e os controlos positivo e negativo.

- Interpretação dos resultados

Os soros com concentrações superiores ou iguais a 20 EU/mL considerados positivos para estes Ac.

#### 2.3.2.2 Métodos de confirmação dos ACA positivos

Confirmaram-se os soros positivos para os ACA por FEIA. Assim, procedeu-se à quantificação dos anticorpos ACA IgA e dos ACA IgG (Phadia®) separadamente, assim como das  $\beta_2$ -GPI IgA e  $\beta_2$ -GPI IgA (Phadia®).

##### 2.3.2.2.1 Pesquisa dos ACA IgG e ACA IgM

A determinação dos ACA IgG e dos ACA IgM foi feita em soro humano. Como fase sólida tinham-se cardiolipina bovina e  $\beta_2$ -GPI bovina como co-facto e que se encontravam fixos a poços de poliestireno.

- Controlo de Qualidade

Analisaram-se o controlo negativo, o controlo positivo (controlo de multiparâmetros contendo anticorpos IgG/IgM/IgA para cardiolipina e  $\beta_2$ -GPI).

- Interpretação dos resultados

As concentrações de ACA IgG e IgM são calculadas em  $\mu\text{g/L}$ , no entanto os resultados para os ACA IgG são apresentados em GPL-U/ml, assim os resultados superiores ou iguais a 10 GPL-U/mL foram considerados positivos. Para a isoforma IgM, os valores superiores a 10 MPL-U/mL consideraram-se positivos.

#### 2.3.2.2.2 Pesquisa dos AAs anti- $\beta_2$ - glicoproteínas I ( $\beta_2$ -GPI) tipo IgG e IgM

A determinação dos anticorpos foi executada usando como fase sólida  $\beta_2$ - GPI humanas purificadas assentes em poços de poliestireno.

- Controlo de Qualidade

Sempre que necessário construir curvas de calibração, analisou-se o controlo negativo, o controlo positivo (controlo de multiparâmetros contendo anticorpos IgG/IgM/IgA para cardiolipina e  $\beta_2$ - GPI).

- Interpretação dos resultados

Em ambos os casos (IgG e IgM), as amostras com concentrações superiores as 10U/mL consideraram-se positivas para a presença de AAs anti- $\beta_2$ -GPI.

### 2.3.3 Métodos para pesquisa e identificação dos anticorpos anti-mitocondriais (AMA)

#### 2.3.3.1 Pesquisa dos AMA

Para a quantificação dos AMA usou-se um método ELISA que determina a fracção antigénica M2 (OGDC-E2 e PDC-E2) dos AMA (A. Menarini®) em soro humano. A fase sólida é composta por Ags mitocondriais purificados que revestem micropoços.

- Controlo de Qualidade

Em todos os ensaios foram testados o controlo positivo, o controlo negativo e o branco.

- Interpretação dos resultados

Valores de concentrações iguais ou superiores a 20 EU/mL consideraram-se positivos para a presença de AMA M2.

Para as amostras positivas procedeu-se ao estudo dos AMA por um método de IFI.

#### 2.3.3.2 Confirmação dos AMA

As amostras positivas foram confirmadas por um método IFI e 3 métodos ELISA, que pretenderam esclarecer a especificidade dos AMA já encontrados.

##### 2.3.3.2.1 Pesquisa dos AMA por Imunofluorescência Indirecta (IFI)

A fase sólida é constituída por células HEp-2 fixas a lâminas de vidro.

- **Controlo de qualidade**

O controlo de qualidade foi feito usando um controlo negativo sem qualquer AA e um controlo positivo com uma concentração conhecida de AMA tipo M2 e com um padrão característico esperado.

- **Interpretação dos resultados**

As amostras que apresentaram resultados com fluorescência para uma diluição superior ou igual a 1/80 e com um padrão citoplasmático ponteadado do tipo mitocondrial foram consideradas positivas.

#### 2.3.3.2.2 Estudo da especificidade dos AMA

Foram analisadas usando 3 métodos de ELISA (AMA (MIT3), anti-sp100 e anti-gp210) (INOVA Diagnostics, Inc) para a determinação de outros AAS característicos da Cirrose Biliar Primária.

#### 2.3.3.2.3 Determinação dos AMA M3

Este método tem como fase sólida Ags ligados aos poços de poliestireno. Esses Ags são compostos por Ags recombinantes purificados contendo porções imunodominantes de PDC-E2, BCOADC-E2 e OGDC-E2.

- **Controlo de Qualidade**

Procedeu-se à análise dos controlos negativo, positivo baixo e positivo alto.

- **Interpretação dos resultados**

Os resultados foram interpretados como negativos ou positivos tendo em conta se situavam abaixo de 20 EU/mL ou acima e igual a 20 EU/mL.

#### 2.3.3.2.4 Determinação de anticorpos anti-sp100

Este método pretende detectar anticorpos anti-sp100 da classe IgG em soro humano. A fase sólida é constituída por fragmentos purificados da proteína sp100 ligados a micropoços de poliestireno.

- Controlo de Qualidade

Ensaíram-se em todas as análises o branco, o baixo e o alto positivo e o negativo.

- Interpretação dos resultados

Os resultados foram considerados positivos se eram iguais ou superiores a 20 EU/mL.

#### 2.3.3.2.5 Determinação de anticorpos anti- gp210

Este método pretende determinar AAs anti-gp210 da classe IgG em soro humano. A fase sólida usada é uma porção da proteína gp210 ligada a micropoços de poliestireno.

- Controlo de Qualidade

Os controlos positivo baixo, o positivo alto assim como o negativo foram processados em todas as análises.

- Interpretação dos resultados

Os resultados foram considerados positivos quando o resultado se apresentava iguais ou superiores a 20 EU/mL, sendo os resultados inferiores considerados negativos.

#### 2.3.4 Métodos para a pesquisa e confirmação dos anticorpos anti-nucleares (ANA)

### 2.3.4.1 Pesquisa e identificação dos ANA

Para a determinação destes AA usou-se um método de ELISA para a detecção e Acs anti-nucleares e citoplasmáticos em soro humano. Como fase sólida usou-se um lisado de culturas de Hep-2 enriquecido com Acs citoplasmáticos e nucleares.

- Controlo de qualidade

Em todos os métodos se executaram o branco, o controlo negativo e o controlo positivo de modo a verificar a integridade e precisão do método.

- Interpretação dos resultados

Os valores inferiores a 20 UE/mL foram considerados negativos e os superiores e iguais a 20 EU/mL forma considerados positivos.

A confirmação das amostras positivas foi realizada com um método FEIA para a determinação de ENA e um método de IFI .

### 2.3.4.2 Confirmação dos ANA

#### 2.3.4.2.1 Confirmação dos ANA por IFI

Como fase sólida usaram-se células Hep-2 (células epiteliais do carcinoma da laringe) compostas por células em repouso (células em interfase) e em várias fases da mitose.

- Controlo de qualidade

O controlo de qualidade foi feito usando um controlo negativo sem qualquer AA e um controlo positivo com uma concentração conhecida de ANA e com um padrão homogéneo.

- Interpretação dos resultados

O método foi considerado negativo caso não se observasse nenhum padrão específico de fluorescência. As amostras que apresentaram resultados com fluorescência para uma diluição superior ou igual a 1/80 e com um padrão específico (homogéneo, mosqueado, nuclear...) foram consideradas positivas.

#### 2.3.4.2.2 Confirmação dos ANA pelo método FEIA

Usaram-se como fase sólida proteínas recombinantes humanas U1RNP (RNP70, A, C), SS-A/Ro (60 kDa, 52 kDa), SS-B/La, Centrómero, Scl-70 e Jo-1, proteínas Sm purificadas.

- Controlo de qualidade

Sempre que necessário devem executar-se os controlos, positivos (com todos os AAs analisados) e negativos (sem AAs) e o branco.

- Interpretação dos resultados

Os valores superiores a 0,7 U/mL foram considerados positivos, enquanto que os restantes se consideraram negativos.

No caso de um destes métodos de confirmação ter apresentado positividade executaram-se diversos métodos para determinar a especificação dos AAs. Deste modo foram executados vários métodos FEIA (Phadia®), com as seguintes fases sólidas:

- Proteínas RNP (RNP70, A, C) recombinantes humanas (EliA™ U1RNP®)
- Proteínas SS-A/Ro (60 kDa, 52 kDa) recombinantes humanas (EliA™ SS-A/Ro®)
- Proteínas SS-B/La recombinantes humanas (EliA™ SS-B/La®)

- Proteínas do centrómero B recombinantes humanas (EliA™ CEMP®).
- Proteína Scl-70 recombinante humana (EliA™ Scl-70®).
- Proteínas Jo-1 recombinantes humanas (EliA™ Jo-1®).
- Proteínas Sm purificadas a partir de tecido bovino (EliA™ Sm®).

A positividade de todos estes métodos foi estabelecida quando uma amostra se apresentava com uma concentração destes anticorpos superior a 10 U/mL. Todos os métodos foram efectuados após a execução dos parâmetros de controlo de qualidade (controlos positivos e negativos).

### 2.3.5 Métodos para pesquisa e identificação dos anticorpos anti-gliadina (AGA) e anticorpos anti-transglutaminase tecidular (AtTG)

Fez-se a determinação, pelo método de ELISA, dos AGA e dos AAs AtTG.

#### 2.3.5.1 Pesquisa e identificação dos AGA

Fez-se a detecção conjunta de Acs IgG e IgA AGA em soro humano, sendo que a fase sólida usada são antigénios de gliadina ligados a micropoços de poliestireno.

- Controlo de Qualidade

Para a correcta quantificação destes anticorpos é necessário ensaiar o branco e os controlos positivos e negativos.

- Interpretação dos resultados

Os valores inferiores a 20 EU/ml foram considerados negativos, sendo os soros com valores superiores a 20 EU/mL considerados positivos para estes anticorpos, confirmando-os mais tarde com o auxílio de outro método.

### 2.3.5.2 Pesquisa e identificação dos AAs AtTG

#### 2.3.5.2.1 Pesquisa dos AAs AtTG

Fez-se a detecção conjunta de Acs IgG e IgA de tTG, sendo que a fase sólida usada são os Acs de tTG recombinantes humanos ligados a micropoços de poliestireno.

- Controlo de Qualidade

Para cada ensaio foi realizada a quantificação do branco e os controlos positivos e negativos.

- Interpretação dos resultados

Os valores de anticorpos inferiores a 20 EU/ml foram considerados negativos, sendo os soros com valores superiores a 20 EU/mL considerados positivos.

#### 2.3.5.2.2 Pesquisa dos anticorpos AtTG Quimérica

A fase sólida é composta por transglutaminase tecidular humanas com ligações cruzadas com péptidos de gliadina (tTG quimérica). Este método permite a determinação de Acs IgA e IgG contra neo-epítomos de tTG em soro humano.

- Controlo de Qualidade

Para cada ensaio foi realizada a quantificação do branco e dos controlos positivos e negativos. A leitura da absorvência do branco deveria ser <0.3 e a do controlo negativo < 16 UE/mL.

- Interpretação dos resultados

Os valores de anticorpos iguais ou superiores a 16 EU/ml foram considerados positivos, tendo sido continuado o seu estudo.

Para qualquer amostra positiva, quer tenha sido apenas num método ou em todos eles, procedeu-se à sua confirmação usando o analisador automático ImmunoCap 250®.

### 2.3.5.3 Confirmação das amostras positivas

#### 2.3.5.3.1 Confirmação das amostras positivas usando um método de detecção dos AGA IgG e dos AGA IgA

A fase sólida é composta por Ags de gliadina de trigo agregados aos micropoços.

- Controlo de Qualidade

Para cada ensaio foi realizada a quantificação do branco e dos controlos positivo (controlo de multi-parâmetros contendo para AtTG IgA e IgG AGA IgG e IgA) e negativo.

- Interpretação dos resultados

Para valores menores que 7 U/mL os soros foram considerados negativos para anticorpos AGA IgG e AGA IgA, sendo os valores iguais ou superiores considerados positivos.

#### 2.3.5.3.2 Confirmação das amostras positivas usando um método de detecção dos Acs AtTG IgA e AtTG IgG

A fase sólida é composta por Ags de tTG ligados covalentemente aos micropoços.

- **Controlo de Qualidade**

Para cada ensaio foi realizada a quantificação do branco dos controlos positivos (controlo de multi-parâmetros contendo Acs IgG e IgA para AtTG e AGA) e negativos.

- **Determinação e interpretação dos resultados**

Para valores menores que 7 EU/mL os soros foram considerados negativos para anticorpos tTG IgG e IgA, sendo os valores iguais ou superiores considerados positivos.

### 2.3.6 Métodos para a pesquisa e confirmação do Factor Reumatóide (RF) e dos anticorpos anti-péptidos cíclicos citrulinados (ACCP)

#### 2.3.6.1 Pesquisa e identificação dos RF

Para a pesquisa dos RF foi usado um método ELISA para a detecção conjunta de Acs IgG/IgA/IgM FR em soro humano, sendo que a fase sólida é composta por Acs de FR ligados a micropoços de poliestireno.

- **Controlo de Qualidade**

Em todos os ensaios foi executado o branco, e os controlos positivos e negativos.

- **Interpretação dos resultados**

Os valores inferiores a 20 EU/mL foram considerados negativos, sendo os soros com valores superiores ou iguais a 20 EU/mL considerados positivos para estes anticorpos.

As amostras que se apresentaram positivas para os RF IgG/IgM/IgA foram confirmadas.

#### 2.3.6.1.1 Confirmação dos anticorpos RF IgM

Os Acs RF IgM foram determinados por um método de nefelometria cinético.

- **Controlo de Qualidade**

O ensaio foi verificado pela utilização de controlo de qualidade interno. Um controlo com concentração elevada de RF e outro com concentração normal (concentração positiva mas que não representa doença).

- **Interpretação dos resultados**

Os valores superiores ou iguais a 50 IU/mL foram considerados positivos para o estudo do RF enquanto que valores abaixo foram considerados negativos.

### 2.3.6.2 Pesquisa e identificação dos Acs ACCp IgG

Esta detecção é feita usando como fase sólida um péptido cíclico sintético altamente purificado que contem resíduos de arginina modificada.

- **Controlo de Qualidade**

Em cada ensaio analisaram-se o branco, e os controlos positivos e negativos.

- **Interpretação dos resultados**

Quando os resultados para uma dada amostra se apresentavam iguais ou superiores a 20 EU/mL eram considerados como positivos.

Para os resultados positivos procedia-se a uma repetição do estudo dos Acs ACCp executando-se para o efeito um método FEIA.

#### 2.3.6.2.1 Confirmação dos Acs ACCp IgG

A fase sólida é composta por antígenos de péptidos cíclicos citrulinados ligados covalentemente a micropoços.

- **Controlo de Qualidade**

Para cada ensaio foi realizada a quantificação do branco e dos controlos positivo (contendo anticorpos IgG) e negativo.

- **Interpretação dos resultados**

Os valores superiores a 10 U/mL foram considerados positivos, sendo os restantes considerados negativos.

Baseado na leitura de diversos artigos e após e verificar quais os factores que levam a predisposição de ocorrência de DAI, propôs-se um *score* de risco para o desenvolvimento de doença segundo os seguintes parâmetros: sexo, número de AA e idade dos dadores (Tabela 5), no entanto este método não está validado clinicamente.

**Tabela 5** - Distribuição dos pontos para se calcular a probabilidade de cada dador vir a sofrer de qualquer DAI.

<b>Sexo</b>	Feminino	3	<b>Idades</b>	Dos 18-25	1	<b>N.º de AAs</b>	1 AA	1
	Masculino	1		Dos 26-40	2		2 AAs	2
				Maiores de 40	5		3 AAs	4

Somando os pontos de cada parâmetro foi estimado o *score* e o grau do risco de desenvolvimento da doença:

- Até 7 pontos → *Score* 1 → Risco Moderado
- 8 ou + pontos → *Score* 2 → Risco Elevado



### **III. RESULTADOS**



### 3.1 População em estudo

A população em análise era constituída por 821 dadores com idades médias de 36,17 ( $\pm 11,01$ ) anos, dos quais 330 (40,15%) pertencem ao sexo feminino e 491 (59,85%) ao sexo masculino (Gráfico 1) com idades compreendidas entre os 18 e os 65 anos.

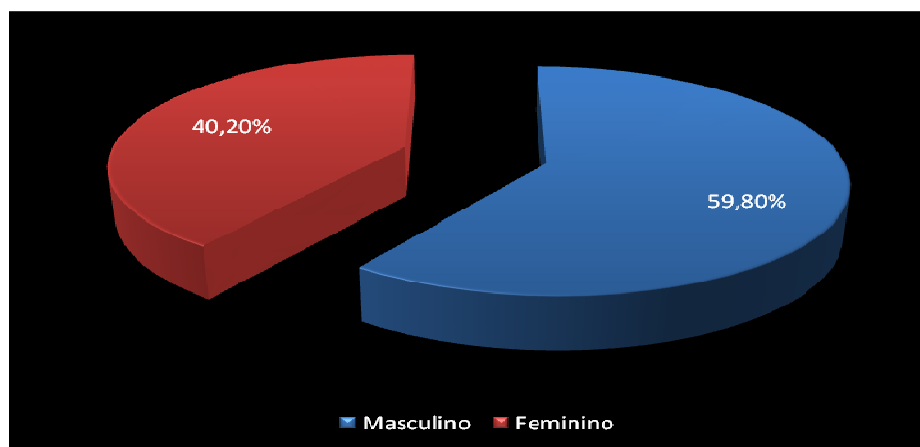


Gráfico 1 - Distribuição percentual por sexo das amostras.

A idade mínima da população foi de 18 anos e a idade máxima correspondeu a 65 anos para indivíduos do sexo masculino e 64 anos para os do sexo feminino.

No gráfico que se segue estão evidenciadas as distribuições etárias para os dois sexos (Gráfico 2).

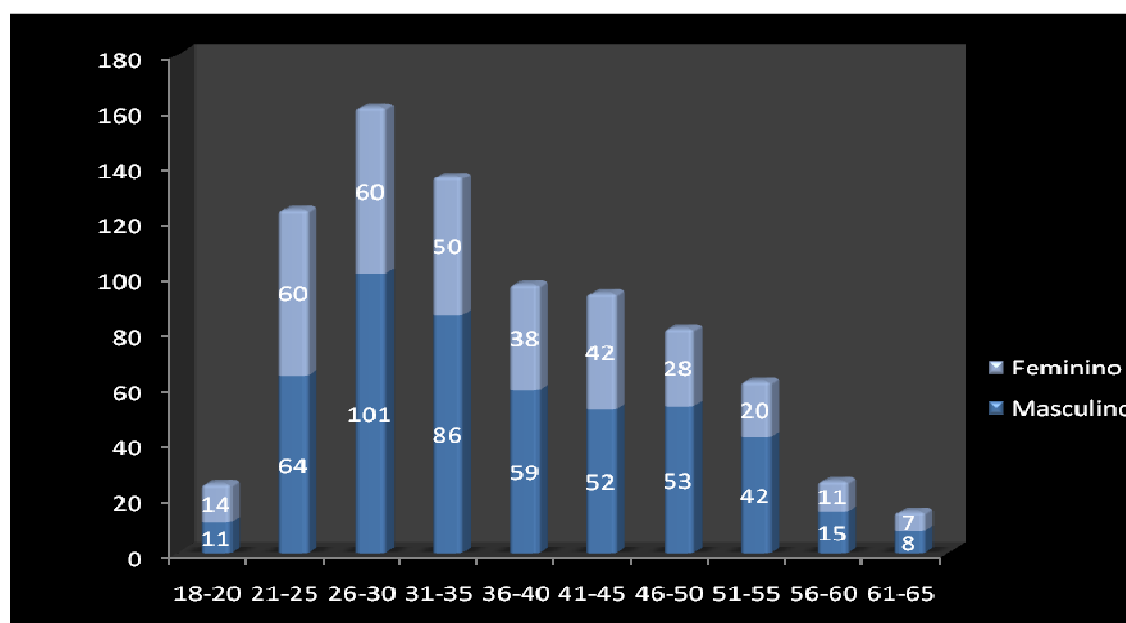


Gráfico 2 - Distribuição etária e por sexo da amostra

Pode verificar-se que existe um pico de dadores na faixa etária dos 26-30 começando depois a decrescer o número de dadores à medida que a idade avança. Esse facto pode ocorrer devido ao facto de o aumento da idade implicar quase sempre o aparecimento de várias doenças que condicionam a doação de sangue.

## 3.2 Dadores com autoanticorpos

### 3.2.1 Distribuição dos AAs por faixa etária

Após a análise dos soros, verificou-se que 103 dos 821 soros apresentaram resultados positivamente confirmados para pelo menos um AA, valor que equivale a 12,54% do total das amostras. Só foram considerados como apresentando AAs as amostras que apresentaram positividade para pelo menos um dos métodos confirmatórios. Destas, como se pode ver na Tabela 6, 47 eram do sexo feminino e os restantes do sexo masculino.

Tabela 6 - Número e a percentagem de dadores com autoanticorpos positivos, por género.

Sexo	Nº Dadores Positivos	% Dadores Positivos
Feminino	47	45,6
Masculino	56	54,4

Assim pode verificar-se que 45,6% dos dadores que apresentaram positividade para pelo menos um AA eram do sexo feminino e 54,4% do sexo masculino.

Os dadores com resultados positivos apresentaram uma faixa e distribuição etária distinta entre os indivíduos do sexo masculino e o sexo feminino segundo a Tabela 7 e Gráfico 3.

Tabela 7 - Idade máxima e mínima dos dadores do sexo masculino e feminino.

Sexo	Média das Idades ( $\pm$ SD)	Intervalo de idades
Feminino	35,6 $\pm$ 10,18	21-55
Masculino	36,4 $\pm$ 10,01	19-59

A média das idades dos dadores do sexo masculino foi ligeiramente superior à média das idades dos dadores femininos, sendo também os intervalos de idades também distintos e apresentando uma maior amplitude de idades nos homens.

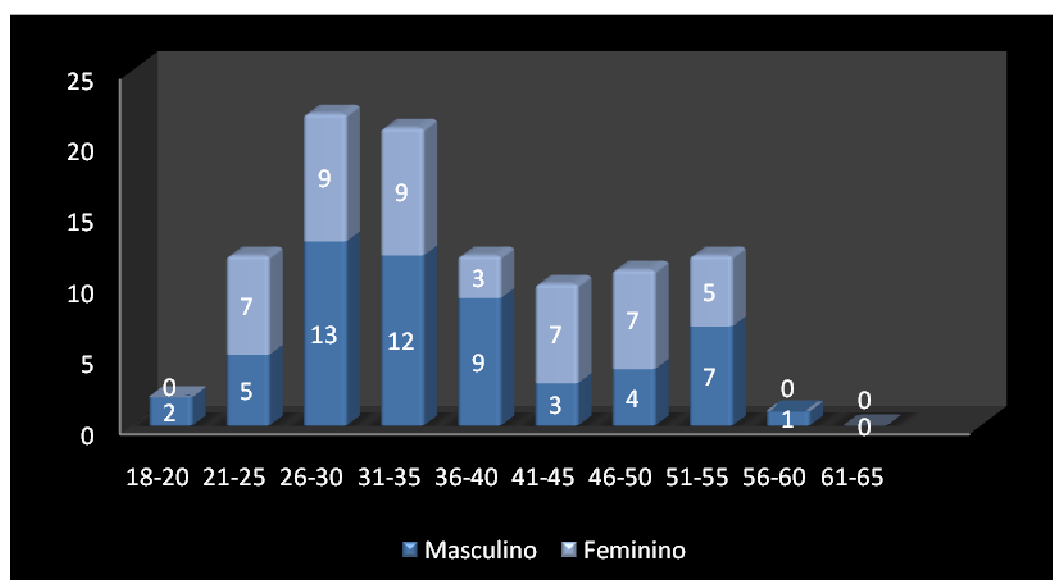


Gráfico 3 - Distribuição etária dos dadores com amostras positivas por sexo e idade.

Verificou-se que 11,50% do total da população masculina apresentou reactividade para pelo menos um AA, por seu lado, 14,24% das amostras pertencentes à totalidade dos dadores do sexo feminino também apresentaram a mesma reactividade.

Pôde observar-se que a média das idades dos dadores que apresentaram reactividade a pelo menos um AA foi de 35,96 $\pm$ 10,06 anos. Verificou-se ainda que a média individual dos dadores masculinos era de 35,55  $\pm$  10,18 enquanto que a média das idades dos dadores femininos que apresentaram positividade para pelo menos um AA foi ligeiramente mais elevada, 36,45  $\pm$ 10,01 anos.

Na Tabela 8 pode observar-se a distribuição de dadores do sexo masculino e feminino com reactividade a pelo menos um AA por cada faixa etária.

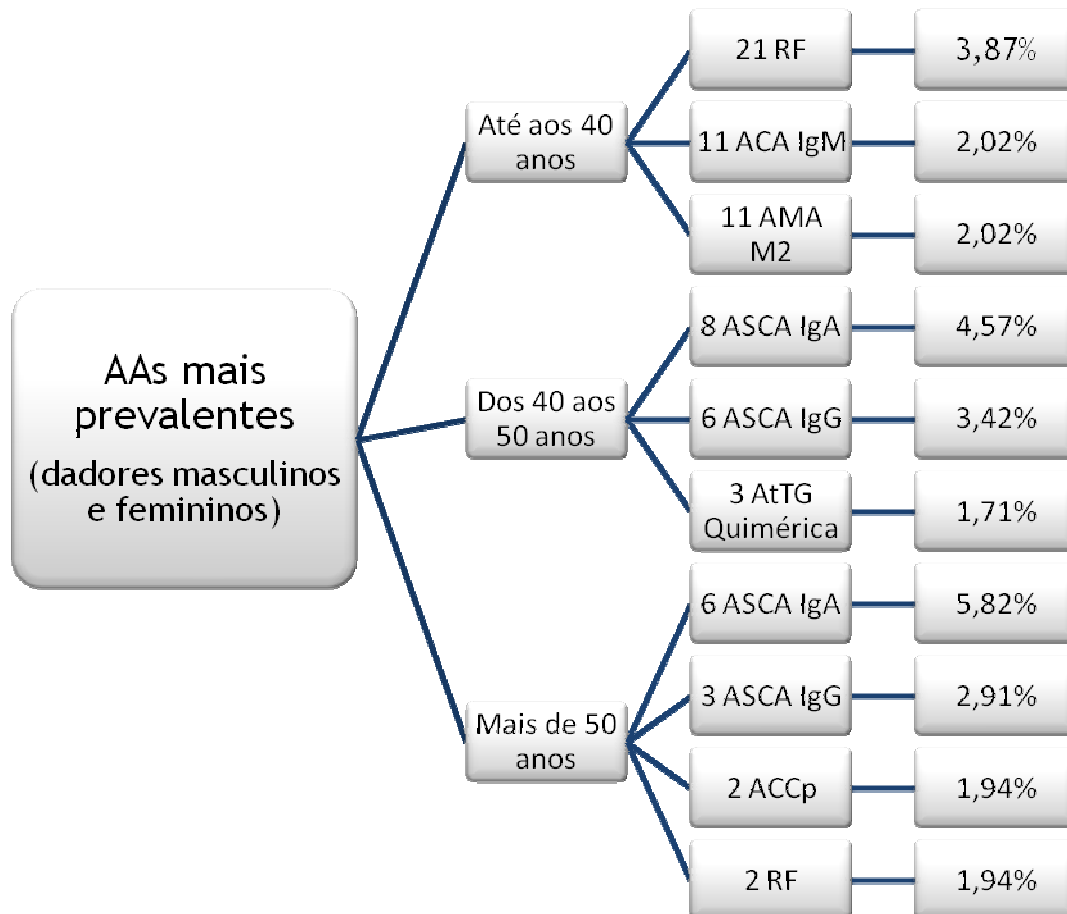
**Tabela 8** - Percentagem de dadores com autoanticorpos em relação à totalidade dos dadores existentes em cada faixa etária e por género.

<i>Faixa etária</i>	<i>% Dadores masculinos</i>	<i>% Dadores femininos</i>
18/20	18,18	0,00
21/25	7,81	11,67
26/30	12,87	15,00
31/35	13,95	18,00
36/40	15,25	7,89
41/45	5,77	16,67
46/50	7,55	25,00
51/55	16,67	25,00
56/60	6,67	0,00
61/65	0,00	0,00

Comparando cada faixa etária pode observar-se a existência de uma maior prevalência de AAs nas mulheres comparativamente com a dos homens (excluindo a faixa etária dos 18/20, dos 36/40 e dos 56/60).

### 3.2.2 Prevalência dos AAs por faixa etária

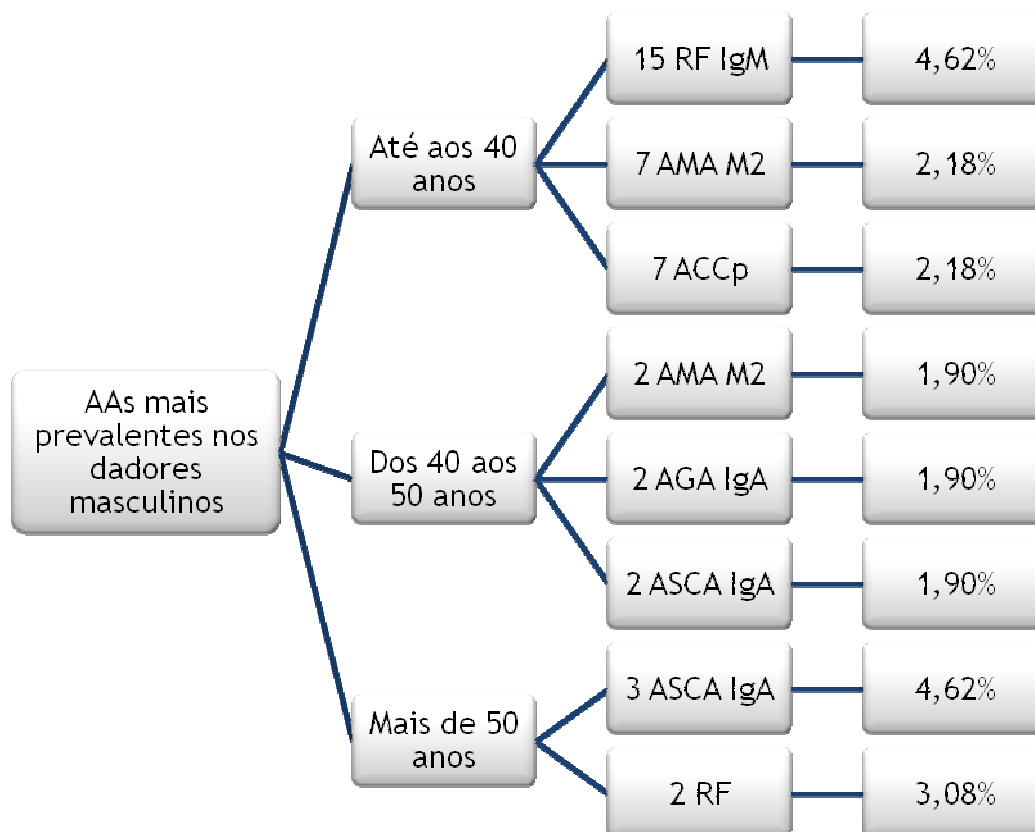
Verificou-se que a distribuição dos AAs em cada faixa etária apresentou algumas diferenças. Abaixo podem ver-se os AAs mais prevalentes em cada uma delas (Figura 6).



**Figura 6** - Distribuição dos auto-anticorpos mais prevalentes na total da população em estudo segundo a faixa etária.

Neste esquema pode verificar-se que cada faixa etária se encontra associada a AAs distintos e que a estes se associam prevalências também distintas. Foram detectados, nos dadores até aos 40 anos, 93 AAs, nos dadores com idades dos 41 aos 50 foram detectados 27 AAs e nos dadores com idades a partir dos 50 foram detectados 21 AAs. Este decréscimo de AAs pode ser explicado pelo decréscimo do número de dadores com o avanço da idade. Pode ainda notar-se que à medida que a idade aumenta, a prevalência do AA mais comum em cada faixa também aumenta corroborando o facto de o aumento da idade implicar uma maior probabilidade da ocorrência de DAI.

A distribuição dos AAs nos dadores do sexo masculino também apresentou diferenças nas distintas faixas etárias, como se pode observar no esquema abaixo (Figura 7) onde estão expressas as prevalências dos AAs mais comuns nas diferentes faixas etárias.

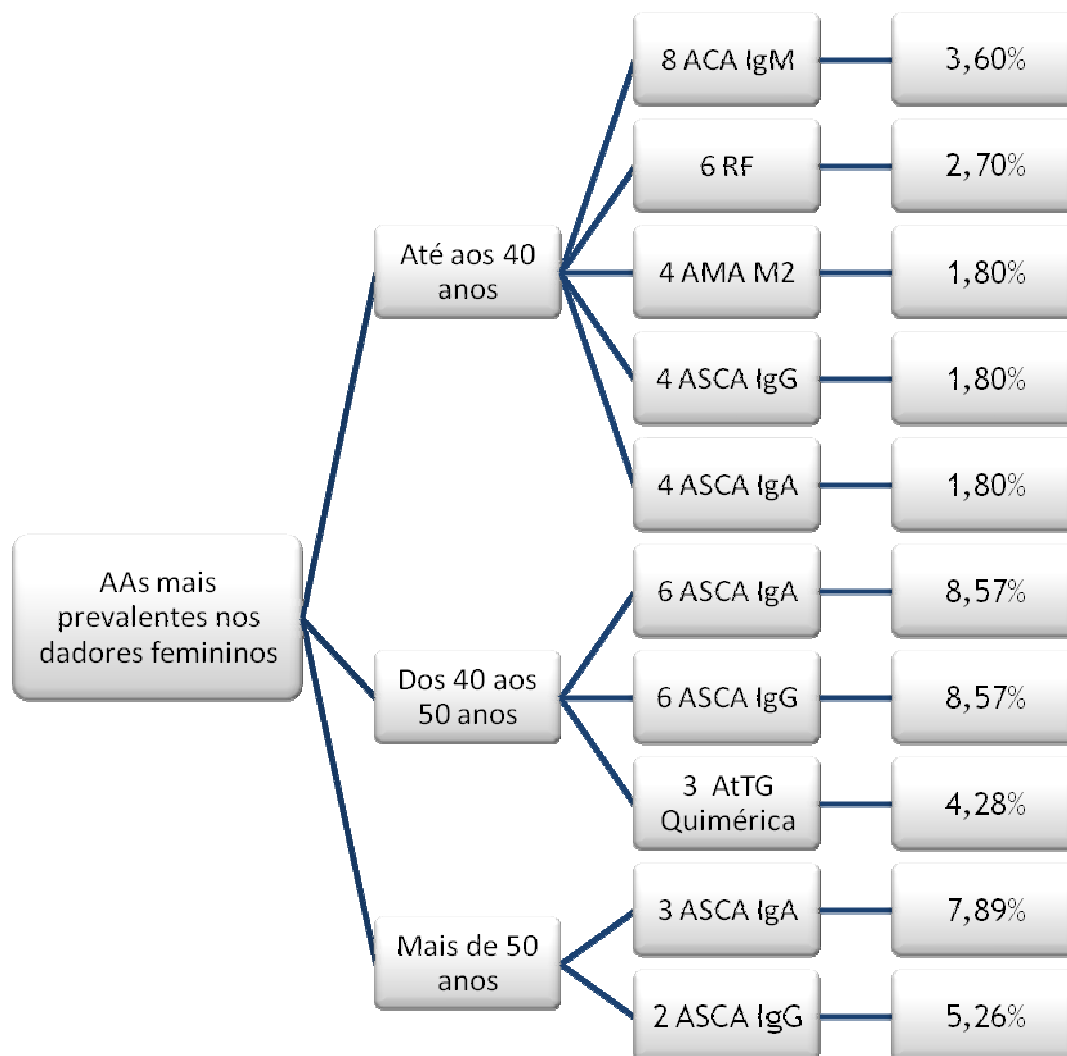


**Figura 7** - Distribuição dos auto-anticorpos mais prevalentes nos dadores do sexo masculino segundo a faixa etária.

Os dadores masculinos apresentaram uma grande prevalência de RF IgM na faixa etária que compreende as idades dos 18 aos 40 anos, sendo esta tão elevada como a dos ASCA IgA presente nos dadores partir dos 50 anos. Na faixa etária onde se inserem os dadores com mais de 50 anos só foram esquematizados os 2 AAs mais prevalentes uma vez que os restantes AAs que se encontraram neste grupo de dadores apresentaram uma prevalência de 1,54% (ACA IgM, ACCp, ASCA IgG, AtTG IgA e AGA IgA). Na totalidade foram detectados 53 AAs nos dadores com idades até aos 40 anos, 9 AAs nos dadores dos 41 aos 50 e 10 AAs nos restantes dadores masculinos.

A distribuição e a prevalência dos AAs nos dadores do sexo feminino exibiu divergências nas suas distintas faixas etárias, como se pode observar no esquema abaixo

(Figura 8) onde estão expressas as prevalências dos AAs mais comuns nas diferentes faixas etárias.

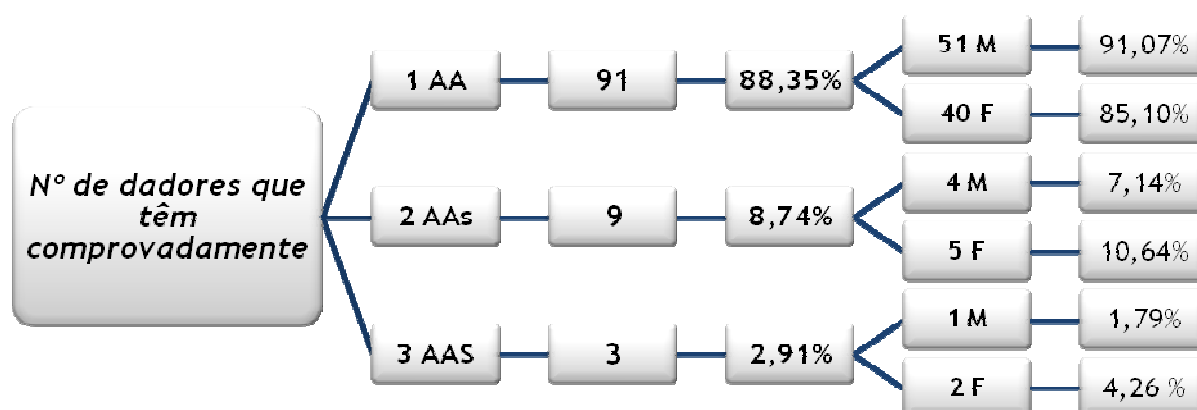


**Figura 8** - Distribuição dos autoanticorpos mais prevalentes nos dadores do sexo feminino, segundo a faixa etária.

Analisando os dadores do sexo feminino verificou-se que os ASCA se apresentaram como os AAs mais prevalentes nas diversas classes presentes. Nos dadores com mais de 50 anos só se esquematizaram os 2 AAs mais prevalentes, pois os restantes AAs (EMA, SS-A/Ro, ANA IFI, Acs ACCp, AMA M2 e AMA M3) que se encontraram nesta faixa etária apresentaram todos a mesma prevalência (2,63%).

### 3.2.3 Número de AAs por dador

Depois de se fazer a análise dos AAs e se realizarem as respectivas confirmações, pôde auferir-se que a distribuição dos resultados positivos foi distinta de dadores para dadores e que existiram dadores que só reagiram a um método enquanto outros apresentaram positividade para 2, 3 ou mais AAs, facto que se pode ver seguinte esquema (Figura 9).



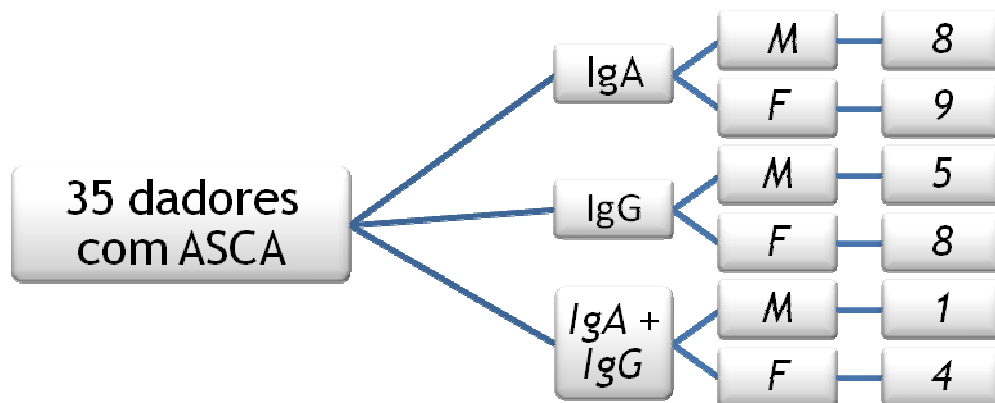
**Figura 9** - Número de dadores que têm comprovadamente 1, 2 ou autoanticorpos (com as respectivas percentagens) em relação à totalidade das amostra e distribuição e prevalências nos dadores de ambos os sexos.

No esquema da Figura 9 pode verificar-se que a grande maioria dos dadores masculinos (91,07%) apenas apresentaram um AA, o mesmo se passa em relação aos dadores do sexo feminino, apresentando no entanto uma prevalência de 85,10%. Quando se trata de dadores que apresentam 2 ou 3 AAs, verifica-se que existe sempre uma maior prevalência nos dadores do sexo feminino (embora essas prevalências sejam bastante mais reduzidas quando comparadas com a dos dadores que apresentam apenas 1 AAs).

### 3.2.4 Distribuição dos AAs por género

Nem só o número de AAs foi distinto de dador para dador, mas antes, cada AA apresentou um número diferente de casos positivos. Os esquemas abaixo apresentados pretendem esclarecer a distribuição dos AAs positivos (apenas para os métodos confirmatórios) em relação aos métodos executados para a confirmação desses mesmos AAs e em relação ao género dos dadores.

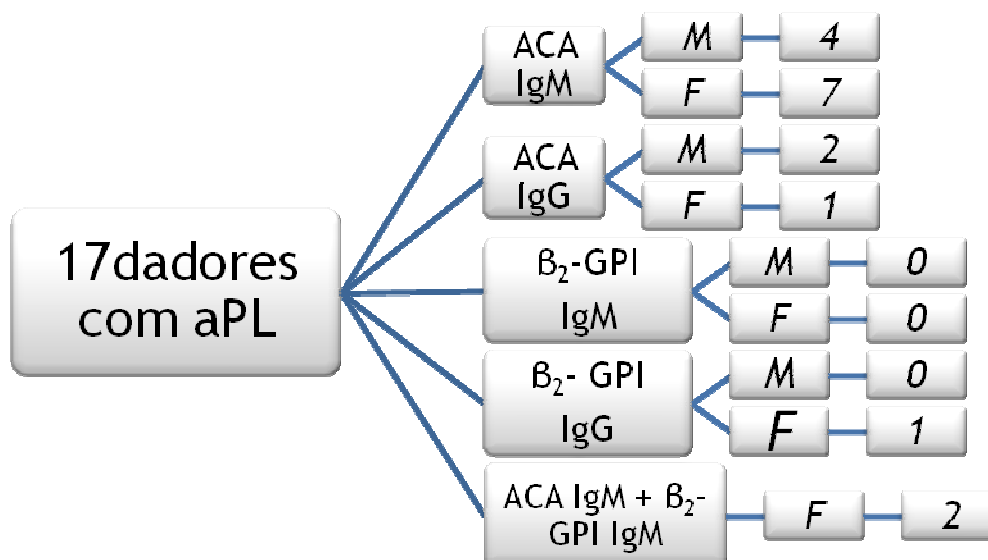
- Dos 35 dadores que apresentaram positividade para um dos métodos feitos para verificar presença de ASCA, 22 apresentaram positividade para o ASCA IgA e 18 para o ASCA IgG apresentando distribuições distintas entre géneros (Figura 10).



**Figura 10** - Distribuição das amostras que apresentaram positividade confirmada para os anticorpos anti-*Saccharomyces cerevisiae* e a sua distribuição quanto ao tipo de imunoglobulinas (IgA e IgG) e ao género.

Como se pode verificar, encontraram-se mais dadores do sexo feminino com AAs ASCA, pode também percepcionar-se que existiram 5 dadores de sangue que apresentaram positividade para os ASCA IgA e ASCA IgG simultaneamente, dos quais 4 eram do sexo masculino e 1 do sexo feminino.

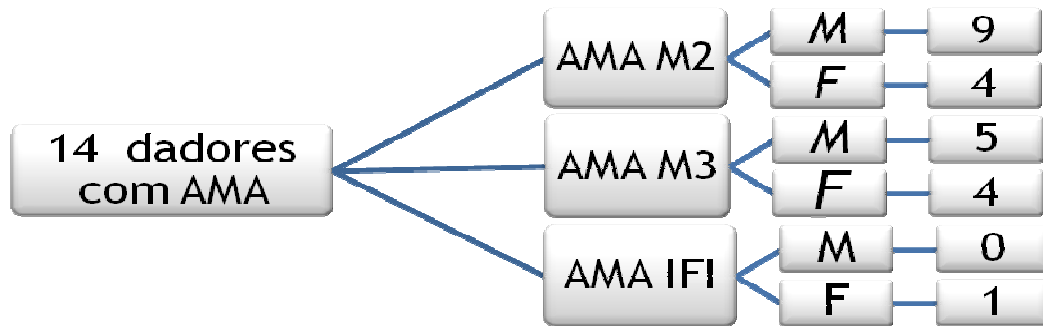
Dos 17 dadores que apresentaram positividade para um dos métodos feitos para verificar a presença de aPL, 13 apresentaram positividade para o ACA IgA e 3 para o ACA IgG, 2 para  $\beta$ 2-GPI IgA e 1  $\beta$ 2-GPI IgG apresentando distribuições distintas entre géneros (Figura 11).



**Figura 11** - Distribuição dos dadores do sexo masculino e feminino que comprovadamente apresentaram positividade de para os ACA IgM e ACA IgG assim como para as B<sub>2</sub>.GPI IgM e B<sub>2</sub>.GPI IgG.

Com exceção dos ACA IgG verificou-se maior incidência de AAs aPL em dadores femininos. É ainda de ressaltar que dois dadores do sexo feminino apresentaram positividade conjunta para os ACA IgM e para as B<sub>2</sub>.GPI IgM, sendo os únicos dadores do sexo feminino a apresentar positividade para os B<sub>2</sub>.GPI IgM. Não foram observados dadores que simultaneamente apresentassem ACA IgM e ACA IgG em ACA IgG com B<sub>2</sub>.GPI IgG.

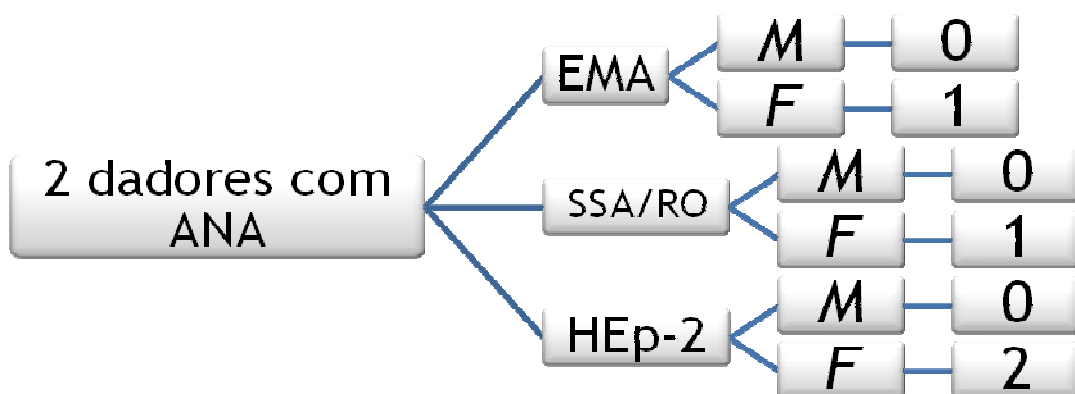
Dos 14 dadores que apresentaram positividade para um dos métodos feitos para verificar a presença de AMA, 13 apresentaram positividade para o AMA M2, 9 para AMA M3 e 1 para AMA IFI apresentando distribuições distintas entre géneros (Figura 12).



**Figura 12** - Distribuição das amostras que comprovadamente apresentaram positividade para algum dos parâmetros analisados para o estudo dos anticorpos anti-mitochondriais em função do género das amostras.

Dos 9 dadores masculinos que apresentaram positividade para os AAs AMA M2 apenas 5 apresentaram para os AMA M3, no entanto, a totalidade dos dadores que apresentou positividade para os AMA M3 também apresentou para os AMA M2. Um dos dadores do sexo feminino (que havia apresentado AMA M2 e AMA M3) apresentou também positividade para os AMA IFI apresentando um padrão mitocondrial na diluição 1/360.

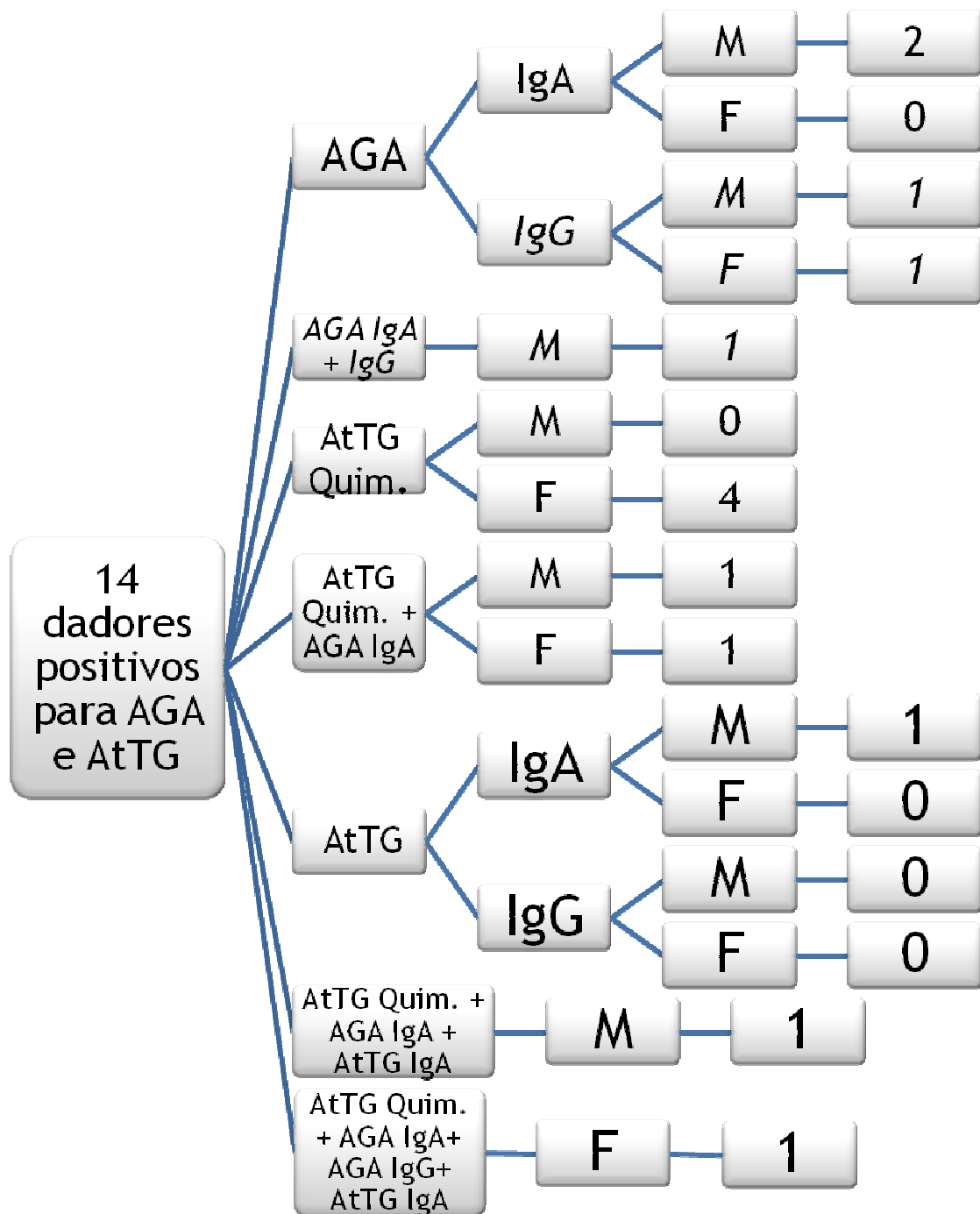
Dos 4 dadores que apresentaram positividade para um dos métodos feitos para verificar a presença de ANA, 13 apresentaram positividade para o AMA M2, 9 para AMA M3 e 1 para AMA IFI apresentando distribuições distintas entre géneros (Figura 13).



**Figura 13** - Distribuição das amostras positivas para os anticorpos anti-nucleares relativamente ao género.

Um dador feminino apresentou positividade nos 3 métodos executados e com a observação ao microscópio de um padrão mosqueado fino sem mitoses numa diluição de 1/160. Um dador do sexo feminino apenas foi positivo para a análise dos HEp-2 mas sem apresentar qualquer especificidade.

Catorze dadores apresentaram AGA, Acs AtTG IgA, Acs AtTG IgG e Acs tTG quimérica. A seguir mostra-se a distribuição dos AAs por géneros e mencionando as associações encontradas neste grupo de AAs (Figura 14).



**Figura 14** - Distribuição dos autoanticorpos anti-gliadina IgG e IgA, auto-anticorpos anti-transglutaminase tecidual IgG e IgA e autoanticorpos anti-transglutaminase tecidual quimérica nos dadores do sexo masculino e feminino.

Dos 14 dadores que apresentaram um ou mais AA positivo, verificou-se que 7 eram do sexo feminino e 7 do sexo masculino, no entanto fazendo a comparação por géneros verificou-se que em quase todos os casos o número de dadores do sexo masculino é maior, com excepção para a AtTG quimérica.

Dos 23 dadores que apresentaram positividade para um dos métodos feitos para verificar a presença de RF, 2 dadores apresentaram positividade para a detecção conjunta dos IgA, IgG e IgM e 23 dadores apresentaram positividade o método de nefelometria que pretendia analisar os AAs RF IgM (Figura 15).

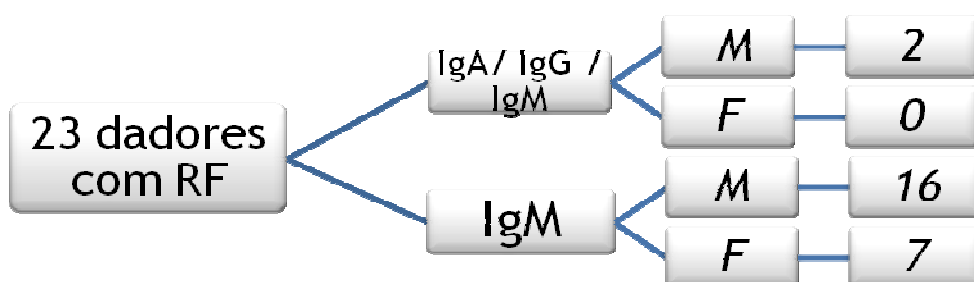


Figura 15 - Os dadores que apresentaram factor reumatóide.

Ao contrário do que está documentado, estes AAs apresentaram-se, na sua maioria, em dadores do sexo masculino. Não foram detectados em dadores do sexo feminino RF (IgA, IgG e IgM).

Dos 8 dadores que apresentaram positividade para um dos métodos feitos para verificar a presença de Acs ACCp, 8 apresentaram positividade para o método de detecção de Acs ACCP IgA, IgG e IgM conjunta e 1 dador apresentou positividade para o método de avaliação dos Acs ACCP IgG (Figura 16).

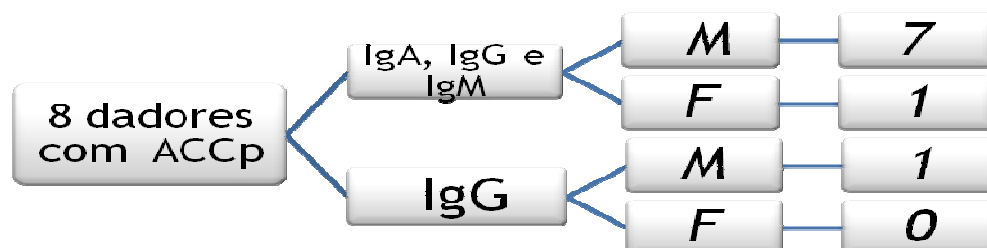


Figura 16 - Distribuição dos auto-anticorpos anti-péptidos cíclicos citrulinados em relação aos dois métodos usados para a sua confirmação - ELISA e FEIA e em relação ao género dos dadores.

Pode observar-se que, em ambos os métodos, se obtiveram maior número de dadores do sexo masculino a apresentar positividade para estes AAs. Não se observaram dadores do sexo feminino positivos para Acs ACCp IgG.

### 3.2.5 Prevalência de AAs na população em estudo

Nos esquemas abaixo estão discriminados os AAs mais prevalentes, por ordem decrescente e em função do género dos dadores (Figura 17 à Figura 19). No primeiro esquema pode ver-se a prevalência dos AAs na totalidade da população de dadores de sangue (Figura 17).

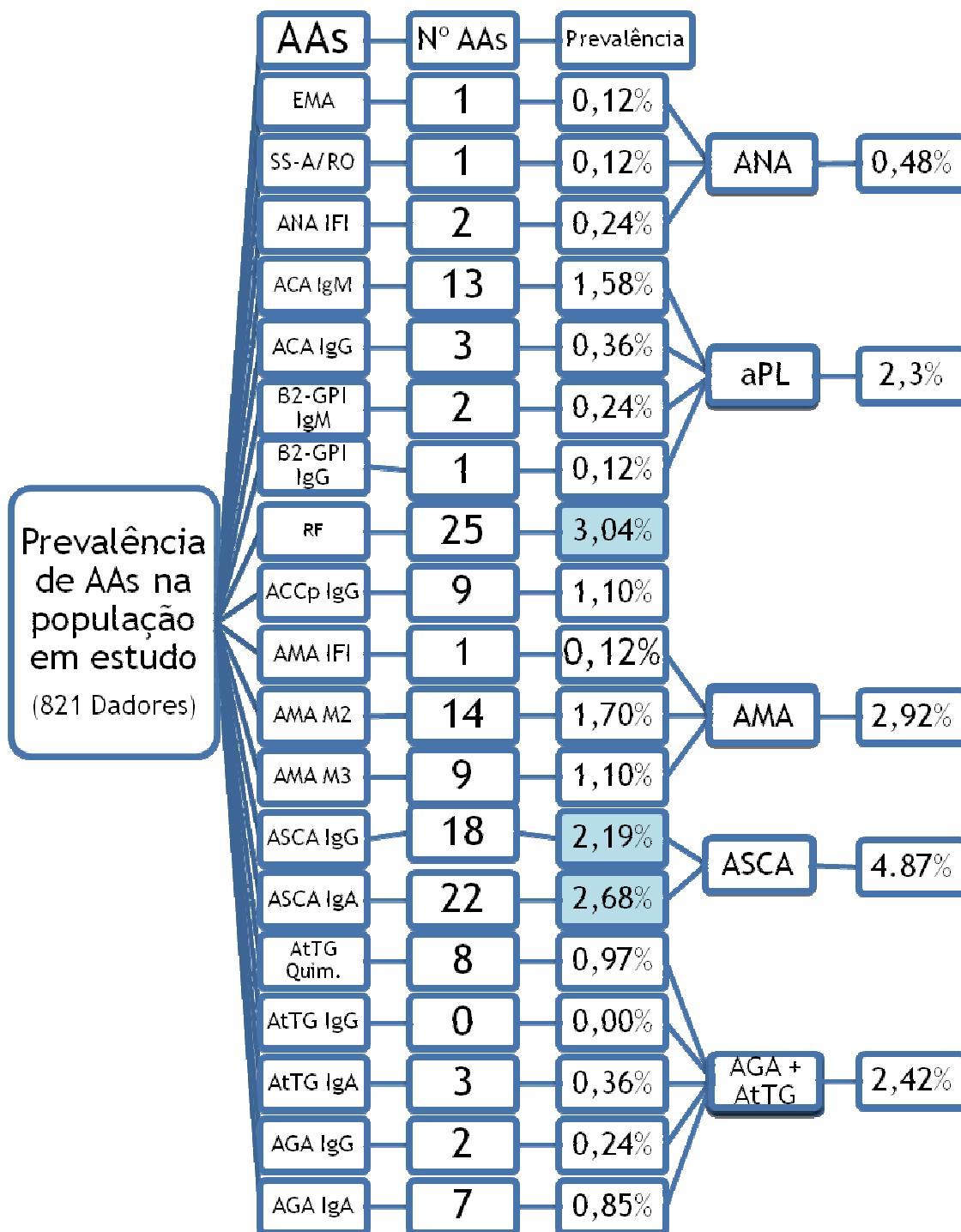


Figura 17 - Prevalências dos autoanticorpos no total da população em estudo.

No total da população, os AAs mais prevalentes foram, por ordem decrescente, os RF, os ASCA IgA, e os ASCA IgG, sendo que na totalidade os ASCA foram os AAs mais prevalentes. Os menos prevalentes foram os AtTG IgG, os Acs ACCp, os B2-GPI IgG, os AMA IFI, os SS-A/Ro e os EMA, dos quais os primeiros (AtTG IgG) não foram detectados em nenhum dador e os seguintes apresentaram apenas um único dador.

No esquema Figura 18 pode observar-se a prevalência dos AAs estudados nos dadores de sangue masculinos

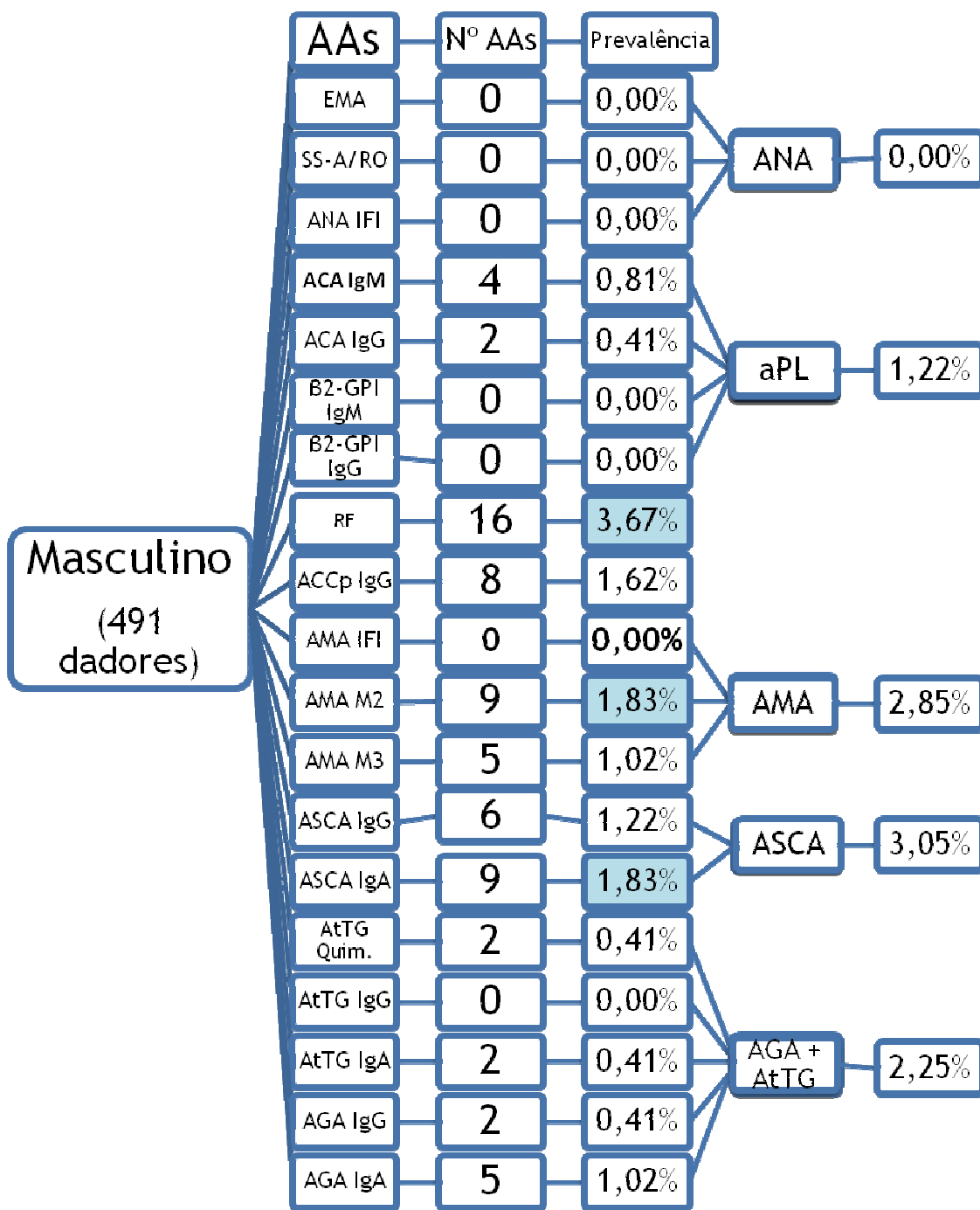


Figura 18 - Prevalência dos autoanticorpos nos dadores do sexo masculino. Os números correspondem à quantidade de dadores com resultados positivos para o respectivo autoanticorpo.

Na totalidade da população masculina, os AAs mais prevalentes foram por ordem decrescentes os RF, os ASCA IgA, e AMA M2, sendo que os dois últimos apresentam a mesma prevalência. Não foram detectados os seguintes AAs (tTG IgG, Hep-2, os B2-GPI IgG, B2-GPI IgG os AMA IFI, os SS-A/Ro e os ENA) em dadores do sexo masculino.

No esquema Figura 19 apresentado pode observar-se a prevalência dos AAs estudados nos dadores de sangue do sexo feminino.

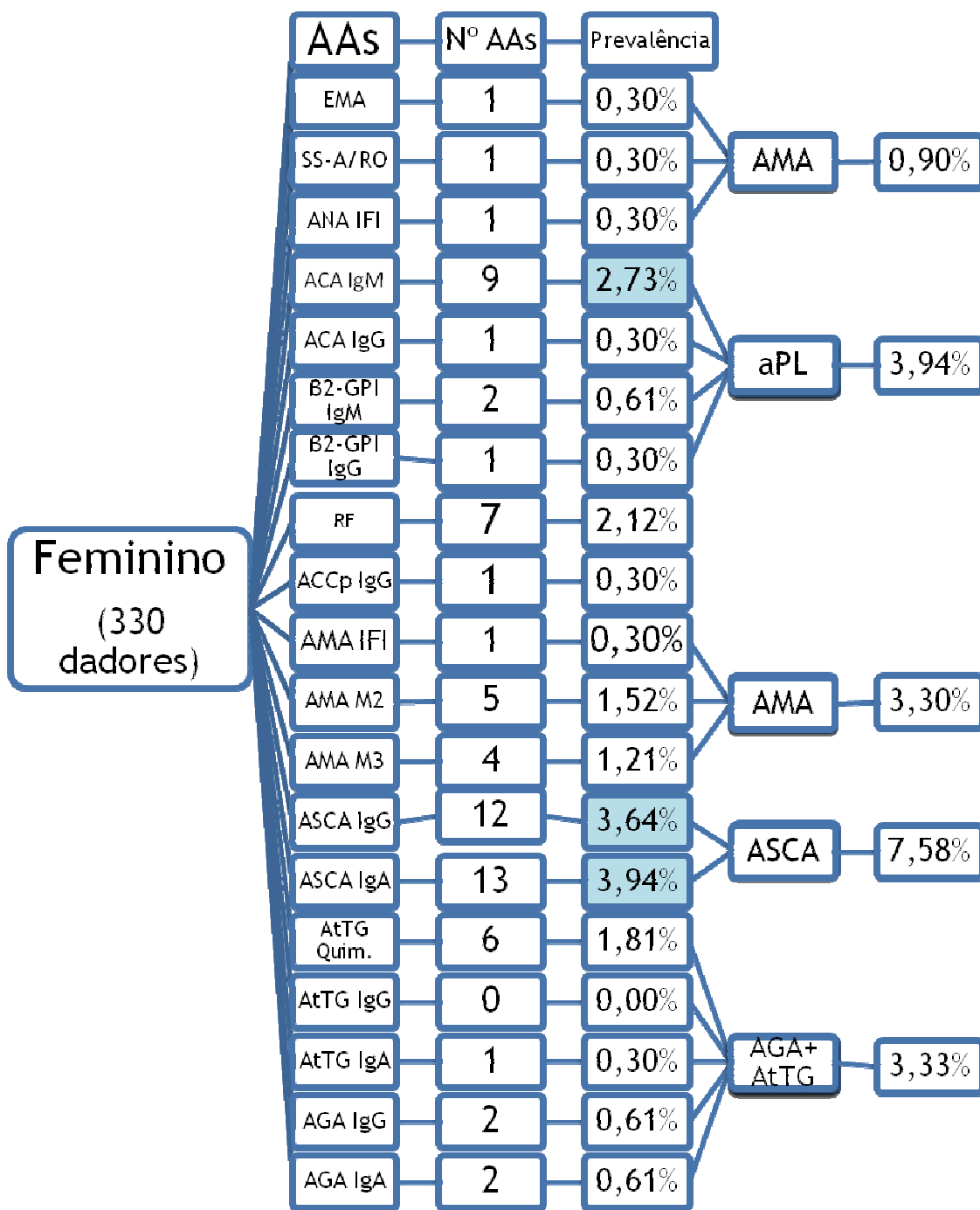


Figura 19 - Prevalência de autoanticorpos nos dadores do sexo feminino. Os números correspondem à quantidade de dadores com resultados positivos para o respectivo autoanticorpo.

Na totalidade da população feminina, os AAs mais prevalentes foram, por ordem decrescente, os ASCA IgA, os ASCA IgG e ACA IgM e os menos prevalentes (0%) foram os AtTG IgG e os AAs ACCp pois estes não se encontraram em dadores do sexo feminino.

### 3.2.6 Perfis dos AAs dos dadores de sangue

Como cada dador apresenta um perfil de AAs distinto, com valores diferentes, fizeram-se gráficos onde se pode observar o perfil de cada dador que apresentou resultados comprovadamente positivos, só estando mostrados os métodos confirmatórios. Pode ainda verificar-se que a altura das respectivas barras não representa os valores obtidos em cada método mas sim a proporção destes valores em relação ao valor mínimo que foi estipulado para o método ser considerado positivo. Os dadores que apresentam as proporções dos AAs positivos com os números a branco são dadores do sexo masculino. Por seu lado, os que se encontram a preto são do sexo feminino (Gráfico 4 ao Gráfico 10).

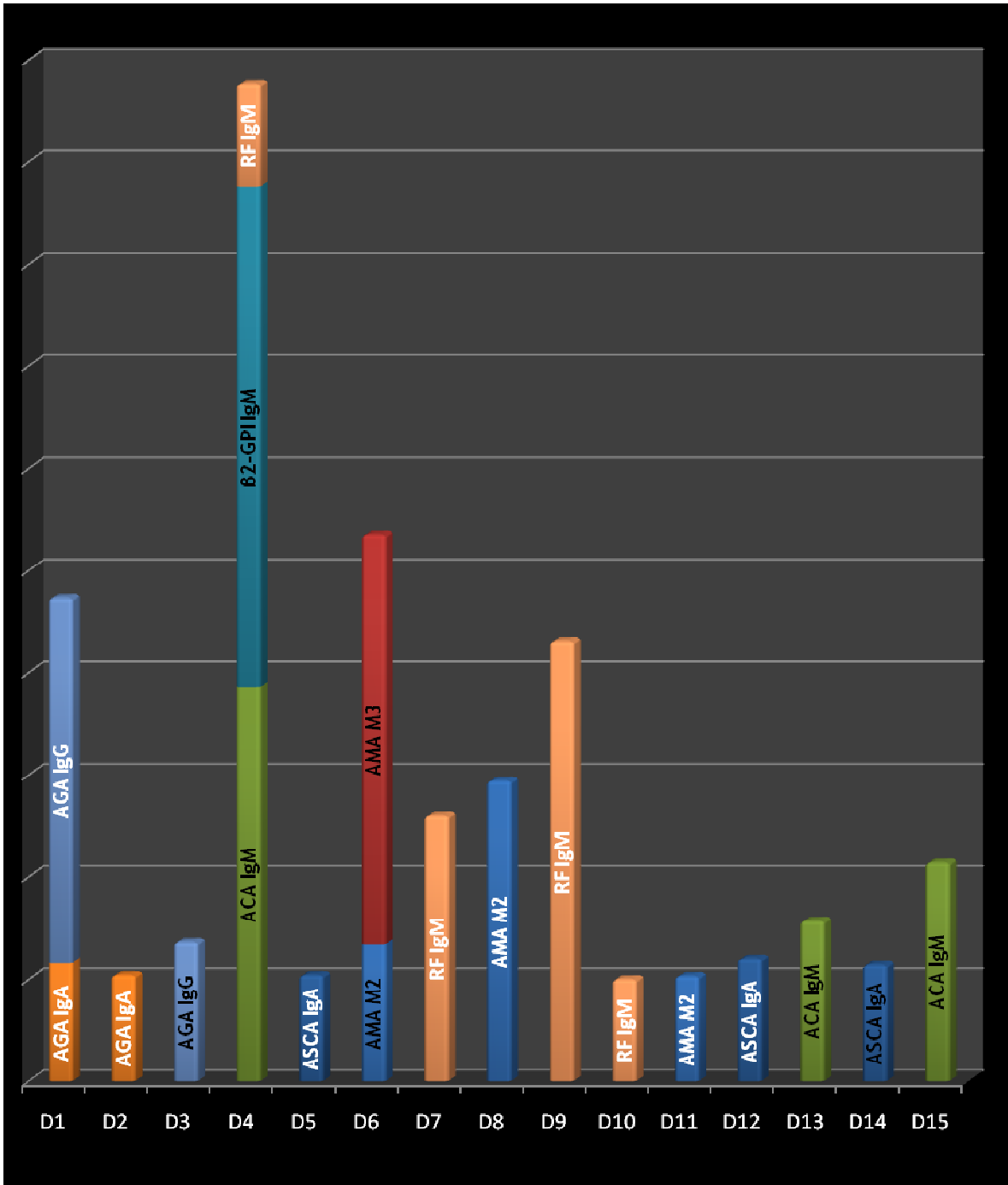


Gráfico 4 - Perfil de autoanticorpos dos dadores 1 a 15.



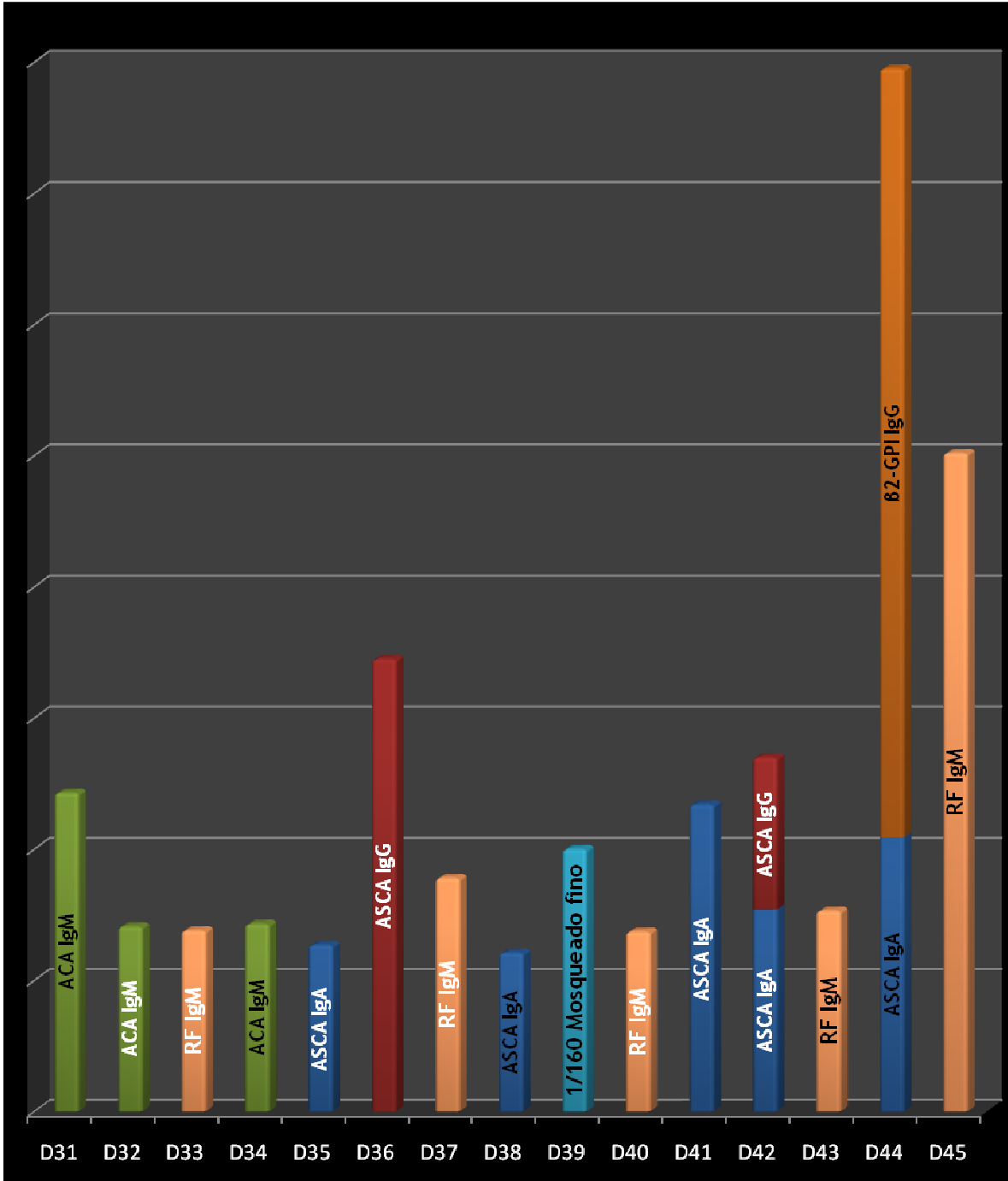


Gráfico 6 - Perfil de autoanticorpos dos dadores 31 ao 45.

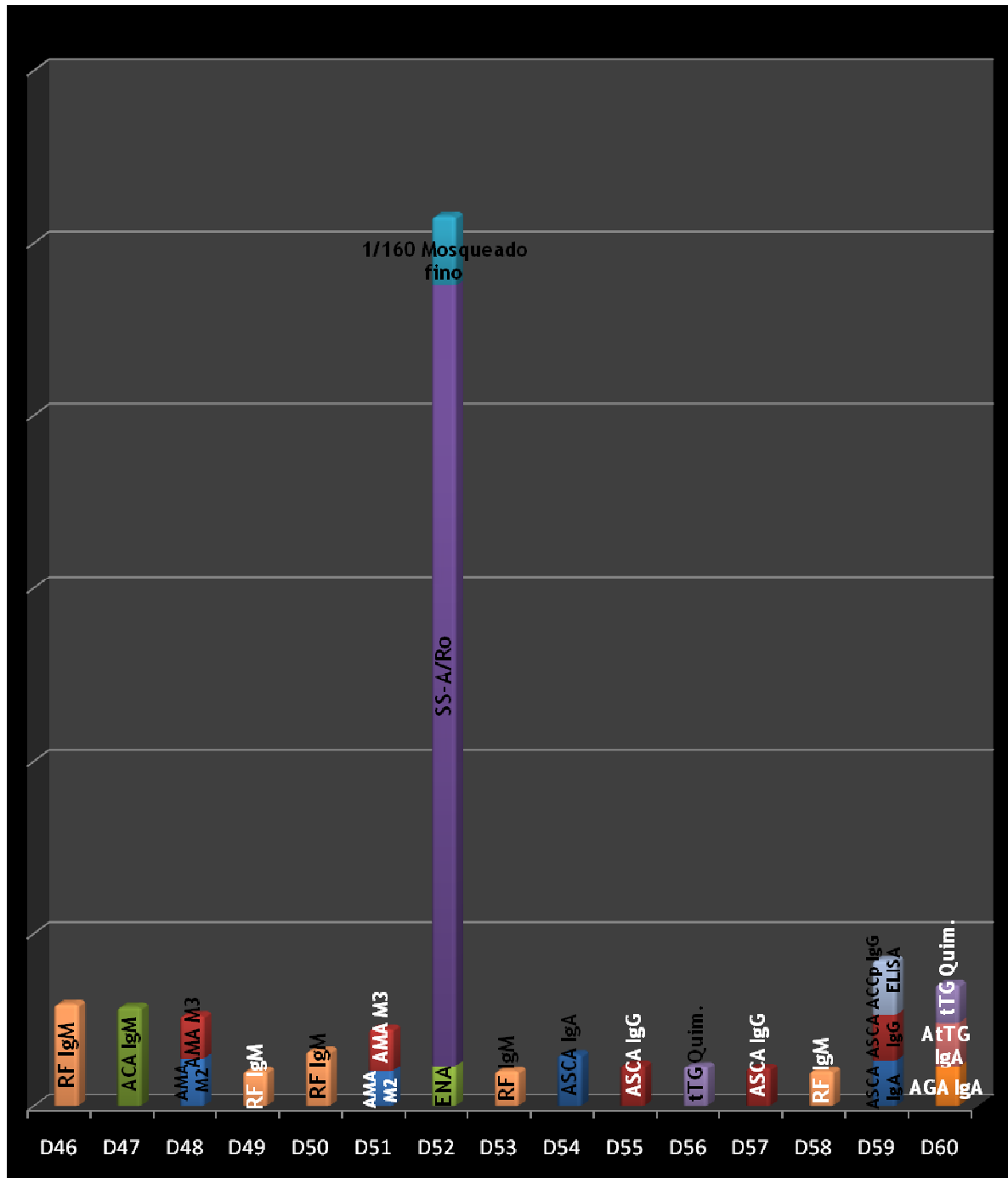


Gráfico 7 - Perfil de autoanticorpos dos dadores 46 a 60.

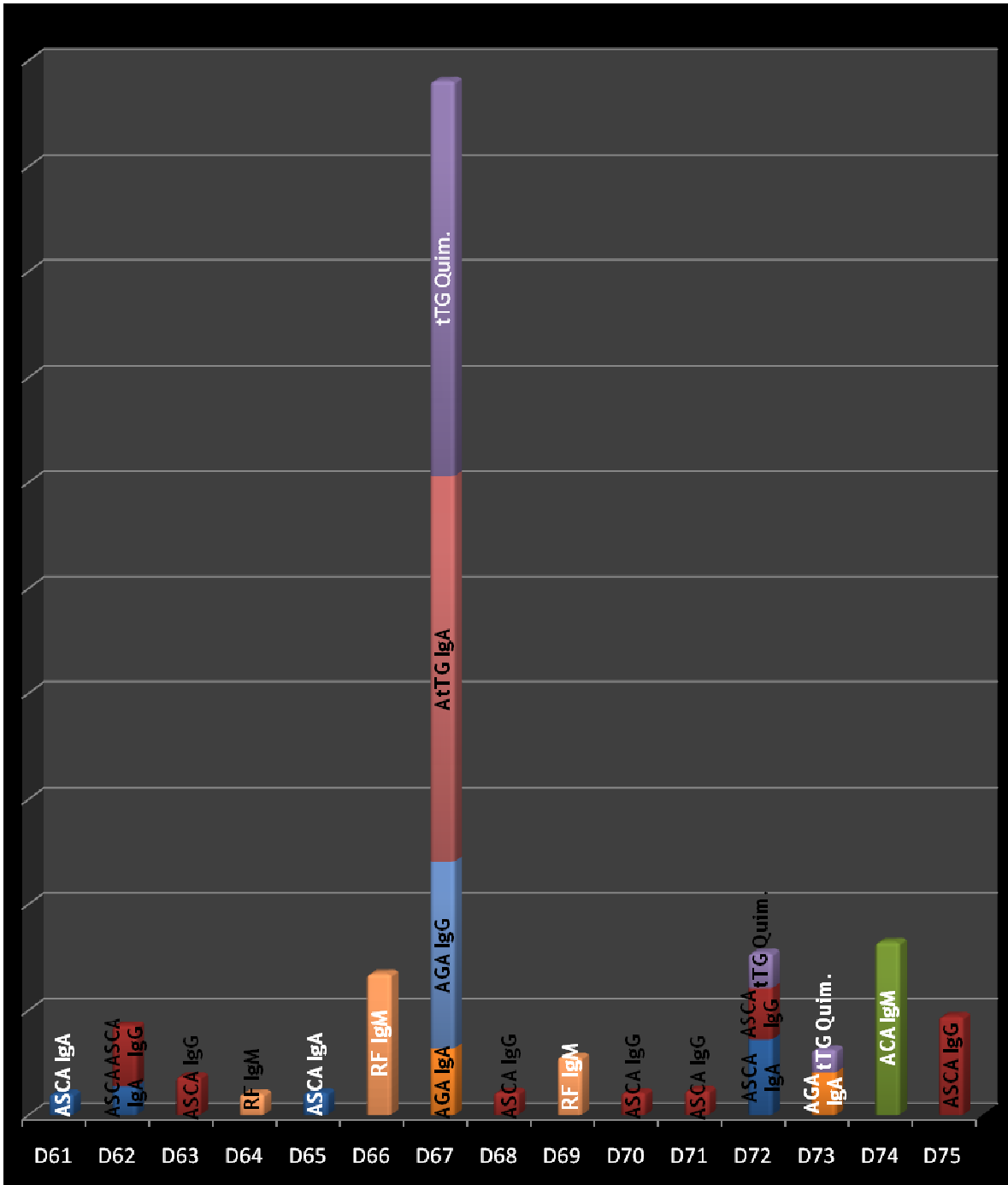


Gráfico 8 - Perfil dos autoanticorpos dos dadores 61 ao 75 .

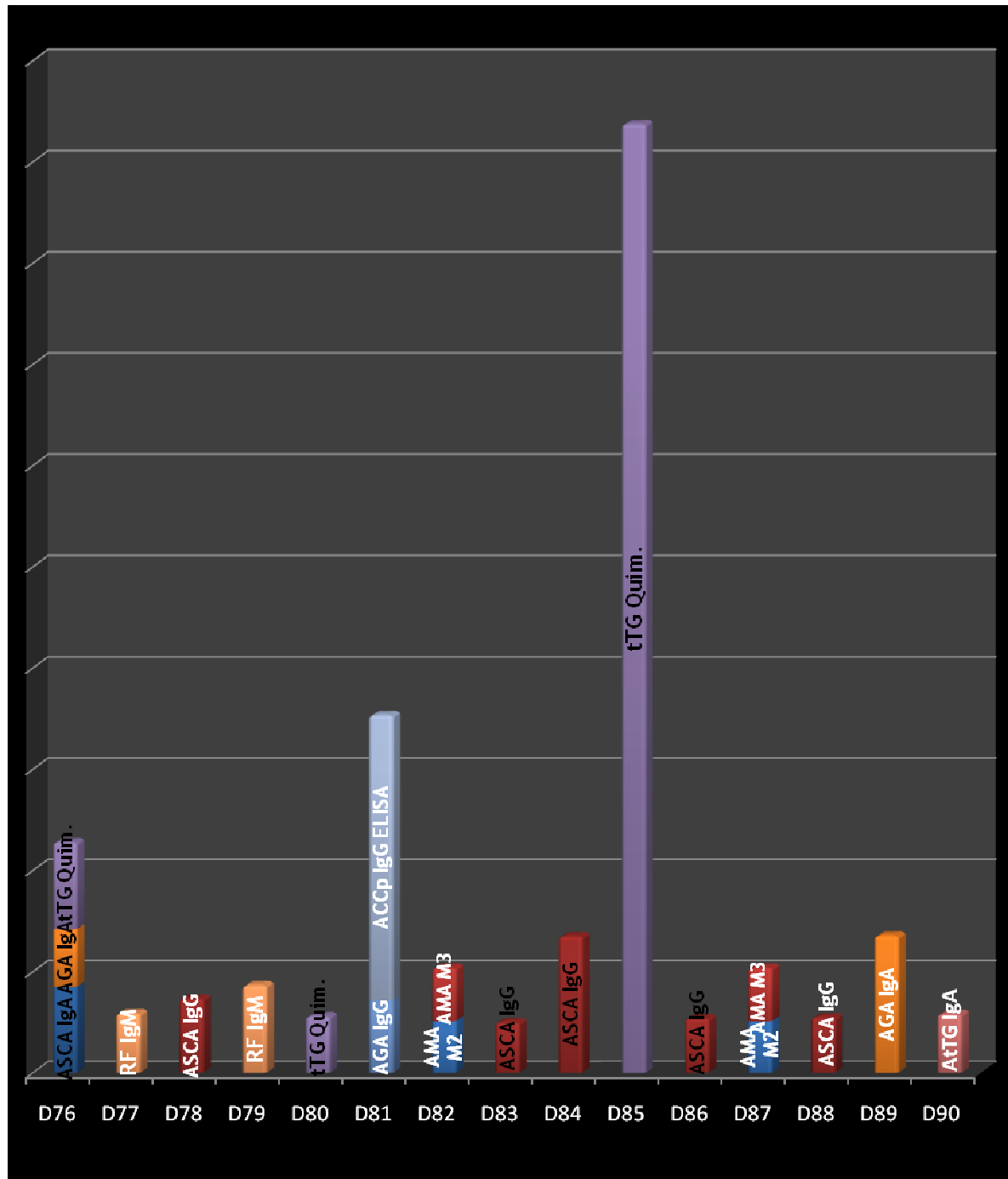


Gráfico 9 - Perfil dos autoanticorpos dos dadores 76 ao 90.

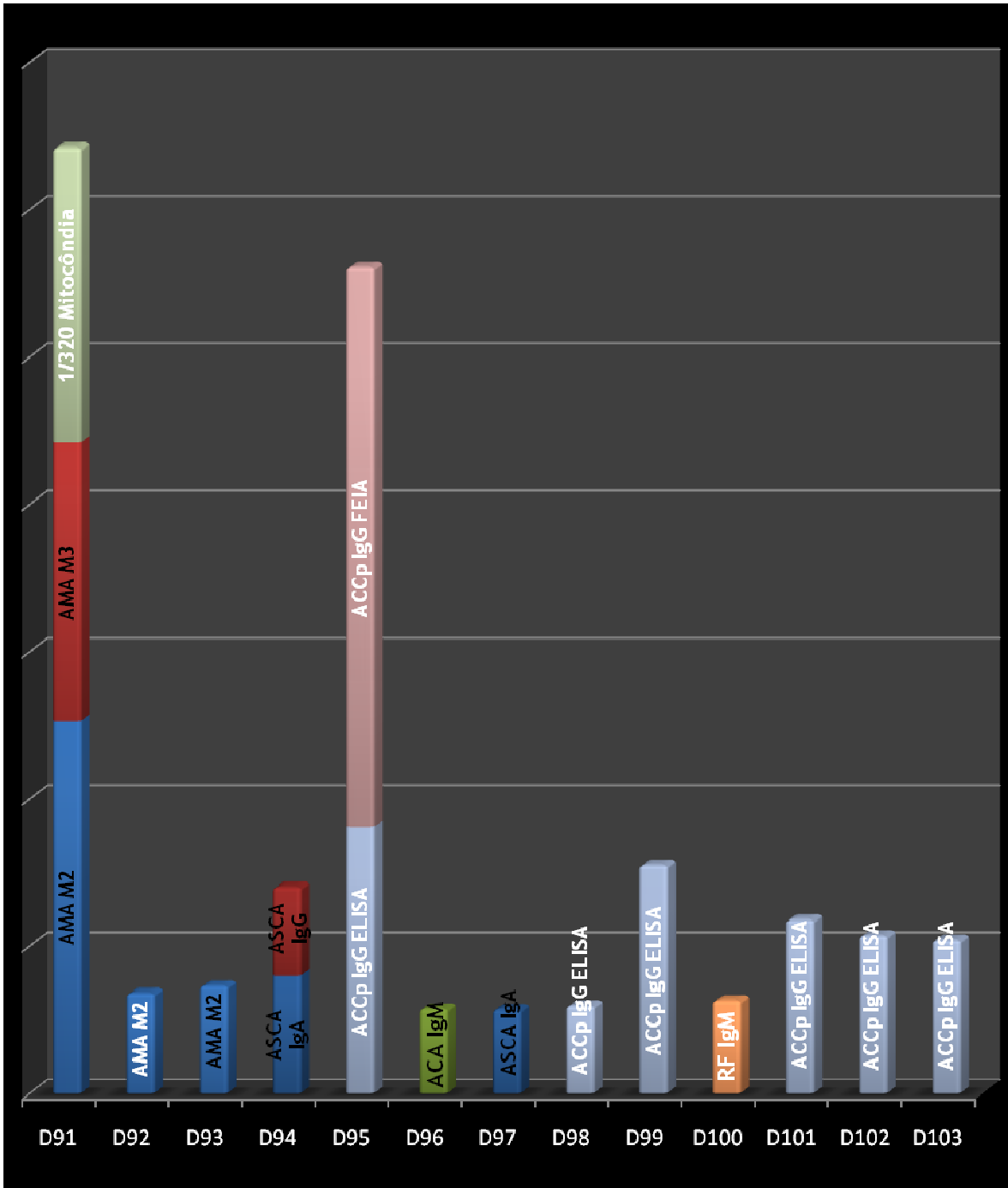


Gráfico 10 - perfil de AAs dos dadores 91 ao 103.

Na análise dos gráficos pode observar-se que a maioria dos AAs aparecem isolados, ou seja, não apresentam um número elevado de associações entre AAs distintos. No entanto, em todos os dadores, os únicos AAs que aparecem efectivamente isolados, dos restantes são os ANA. Seguidamente ir-se-ão mostrar as associações existentes entre os diversos AAs.

- **ACA-** além da associação com as  $\beta$ 2-GPI (ACA IgM +  $\beta$ 2-GPI IgM) em 2 dadores existiram 4 dadores, D4, D21, D22 e D44, com associações distintas com outros AAs.
- **RF-** A quase totalidade dos dadores que apresentou RF não apresentou mais nenhum AA, com excepção do D4 que revelou associações com outros AAs.
- **AAs ACCp-** da totalidade dos dadores que apresentaram estes AAs, 2 dadores (D59 e D81) apresentaram reactividade a Ag distintos dos péptidos citrulinados.
- **AMA-** surgem sempre isolados sem associações com outros AAs com excepção do D21.
- **ASCA-** Da totalidade dos dadores com ASCA 6 apresentaram outros AAs (D21, D22, D44, D59, D72 e D76).
- **AGA e AAs AtTG-** dos 14 dadores com qualquer tipo destes AAs, 3 apresentaram também outros AAs (D72, D76, D81).

Como se pode constatar, existem 8 dadores que apresentam associação de AAs não muito comum, são eles:

- D4- ACA IgM +  $\beta$ 2 GPI IgM + RF IgM
- D21- ACA IgM +  $\beta$ 2 GPI IgM + AMA M2+ AMA M3+ ASCA IgA
- D22- ACA IgM + ASCA IgA
- D44-  $\beta$ 2 GPI IgG + ASCA IgA
- D59- AAs ACCp + ASCA IgA + ASCA IgG
- D72- ASCA IgA + ASCA IgG+ tTG quim.
- D76- ASCA IgA + tTG quim. + AGA IgA
- D81- AAs ACCp + AGA IgG

### 3.2.7 Cálculo do *score* de risco de DAI

O cálculo do *score* de risco foi feito elaborando somando os pontos correspondentes ao sexo, ao número de AAs e a idade, sendo que quando mais o número de pontos somados, mais alto foi o *score* e consequentemente mais elevado é o risco para a ocorrência futura de doença AI (Tabela 9).

Tabela 9 - *Score* de risco para o desenvolvimento de doença para cada dador.

<i>Dadores</i>	<i>Pontos</i>	<i>Score</i>	<i>Risco para Doença A.I.</i>	<i>Dadores</i>	<i>Pontos</i>	<i>Score</i>	<i>Risco para Doença A.I.</i>
D1	7	1	Moderado	D53	6	1	Moderado
D2	7	1	Moderado	D54	6	1	Moderado
D3	6	1	Moderado	D55	4	1	Moderado
D4	6	1	Moderado	D56	6	1	Moderado
D5	4	1	Moderado	D57	4	1	Moderado
D6	6	1	Moderado	D58	7	1	Moderado
D7	7	1	Moderado	D59	9	2	Elevado
D8	4	1	Moderado	D60	6	1	Moderado
D9	4	1	Moderado	D61	7	1	Moderado
D10	7	1	Moderado	D62	9	2	Elevado
D11	7	1	Moderado	D63	9	1	Moderado
D12	7	1	Moderado	D64	6	1	Moderado
D13	6	1	Moderado	D65	4	1	Moderado
D14	9	2	Elevado	D66	4	1	Moderado
D15	9	2	Elevado	D67	9	2	Elevado
D16	4	1	Moderado	D68	6	1	Moderado
D17	5	1	Moderado	D69	4	1	Moderado
D18	7	1	Moderado	D70	6	1	Moderado
D19	4	1	Moderado	D71	9	2	Elevado
D20	6	1	Moderado	D72	10	2	Elevado
D21	7	1	Moderado	D73	4	1	Moderado
D22	8	2	Elevado	D74	4	1	Moderado
D23	4	1	Moderado	D75	9	2	Elevado
D24	3	1	Moderado	D76	9	2	Elevado
D25	4	1	Moderado	D77	4	1	Moderado
D26	4	1	Moderado	D78	3	1	Moderado
D27	9	2	Elevado	D79	4	1	Moderado

<i>Dadores</i>	<i>Pontos</i>	<i>Score</i>	<i>Risco para Doença A.I.</i>	<i>Dadores</i>	<i>Pontos</i>	<i>Score</i>	<i>Risco para Doença A.I.</i>
D28	3	1	Moderado	D80	9	2	Elevado
D29	4	1	Moderado	D81	5	1	Moderado
D30	9	2	Elevado	D82	4	1	Moderado
D31	6	1	Moderado	D83	9	2	Elevado
D32	4	1	Moderado	D84	5	1	Moderado
D33	3	1	Moderado	D85	9	2	Elevado
D34	5	1	Moderado	D86	6	1	Moderado
D35	3	1	Moderado	D87	4	1	Moderado
D36	4	1	Moderado	D88	7	1	Moderado
D37	4	1	Moderado	D89	7	1	Moderado
D38	4	1	Moderado	D90	7	1	Moderado
D39	6	1	Moderado	D91	6	1	Moderado
D40	4	1	Moderado	D92	4	1	Moderado
D41	6	1	Moderado	D93	6	1	Moderado
D42	5	1	Moderado	D94	9	2	Elevado
D43	5	1	Moderado	D95	4	1	Moderado
D44	9	2	Elevado	D96	5	1	Moderado
D45	9	2	Elevado	D97	9	2	Elevado
D46	6	1	Moderado	D98	4	1	Moderado
D47	6	1	Moderado	D99	3	1	Moderado
D48	9	2	Elevado	D100	4	1	Moderado
D49	4	1	Moderado	D101	8	2	Elevado
D50	6	1	Moderado	D102	4	1	Moderado
D51	7	1	Moderado	D103	4	1	Moderado
D52	9	2	Elevado				

O cálculo de risco de ocorrência de DAI foi determinado tendo em conta que:

- Existe maior prevalência de DAI nos indivíduos do sexo feminino;
- As DAI aumentam com a idade,
- Um maior número de AAs implica uma maior probabilidade de se vir a sofrer de uma DAI.

Assim sendo, dos 103 dadores que haviam apresentado AAs, 22 apresentaram um *score* igual ou superior a 9 o que equivale a um risco elevado de vir a sofrer de uma patologia auto-imune. Dos dadores que apresentaram risco elevado para vir a sofrer de DAI, apenas 2 (D22 e D101) são do sexo masculino (apresentaram 2 AAs). Dos 22 dadores, 21 apresentavam mais de 40 anos, apenas um dador (D67) não se apresentava na faixa etária dos 26-39.

## **IV. DISCUSSÃO DE RESULTADOS**



Como já foi referenciado ao longo deste trabalho, as DAI apresentam uma incidência e prevalência significativa na população em geral. Os AAs fornecem classificações e critérios de diagnóstico e prognóstico para certas DAI, sabendo-se que a sua maioria aparece anos antes do início dos sintomas da doença. No entanto, são escassos os estudos que visam a determinação de AAs na população saudável (dadores de sangue).

Os resultados obtidos permitiram observar uma prevalência geral de AAs em ambos os sexos de 12,54% (103 dos 821 dadores com pelo menos um AA). No entanto, estudos anteriores demonstraram uma prevalência (na população em geral) um pouco mais baixa (entre 5 a 10%) (Lleo *et al*, 2010), o que pode significar que ou o número de pessoas que apresentam AAs se encontra em ascensão, como referido por Metskula *et al*, 2006, ou estes AAs se encontram associados a inúmeras DAI não diagnosticadas. A prevalência de AAs na população masculina foi de 11,50% enquanto na população feminina foi um pouco mais elevada (14, 24%) o que pode estar relacionado com o facto de as mulheres apresentarem uma prevalência superior de DAI, não se tendo no entanto encontrado estudos em que se determinaram as prevalências destes AAs segundo o género dos indivíduos.

A média de idades dos dadores com AAs foi de 36,17±11,01 anos, o que parece ser o intervalo de idades mais comum para o aparecimento destas doenças pois segundo Invernizzi *et al*, 2009, a maioria das DAI aparecem entre os 30 e os 40 anos. Alguns estudos demonstraram que a prevalência de AAs aumenta com a idade, sendo encontrados valores elevados em doentes com mais idade. (Hornig *et al*, 1999) (Nilsson *et al*, 2006). A média das idades dos dadores do sexo masculino foi superior à do sexo feminino, o que leva a crer que as DAI aparecem mais cedo nos indivíduos do sexo feminino. Um estudo que confirma este facto foi o realizado por Cooper *et al*, 2003, em que se concluiu que o SLE surge 5-10 anos mais cedo entre as mulheres do que em homens.

No nosso estudo, verificou-se que os dadores do sexo feminino apresentam uma maior prevalência de AAs quando comparados com dadores masculinos com a mesma idade. Um acontecimento que apresenta algum realce é o facto de 25% das mulheres dos 46/50 anos e dos 51/55 anos apresentarem pelo menos um AA. Assim, talvez fosse útil, e principalmente no caso das mulheres, realizarem-se rastreios aos AAs mais prevalentes, de modo a averiguar a presença de uma possível DAI, mesmo antes do aparecimento dos sintomas. Assim só em caso de se verificar a presença de AAs, se partiria para a execução de biopsia.

Verificou-se que a distribuição e a prevalência de AAs é distinta nas diversas idades (Figura 6). Fez-se a mesma análise separando os dadores femininos (Figura 8) dos masculinos (Figura 7) e obtiveram-se, como era de esperar, prevalências distintas entre os diferentes grupos etários. O AA mais prevalente até aos 40 anos nos dadores masculinos foi o RF IgM por oposição aos ACA IgM nos dadores femininos. Os dadores masculinos com idades entre os 40 e os 50 anos os AAs mostraram como mais prevalentes os AMA M2, os AGA IgA e os ASCA IgA

(todos com a mesma prevalência), enquanto os dadores femininos apresentaram como mais prevalentes os ASCA IgA e os ASCA IgG (com a mesma prevalência). Na faixa etária dos dadores com mais de 50, o sexo masculino mostrou uma prevalência de 4,62% para os ASCA IgA. Por seu lado, os dadores do sexo feminino também tiveram como mais prevalentes os mesmos AAs, embora com uma prevalência superior. Como não se encontraram estudos científicos que mostrassem a prevalência de AAs em função da idade, não foi possível fazer a comparação com o nosso estudo.

Embora os AAs possam aparecer como consequência da DAI, a sua ocorrência pode preceder o início da doença clínica por vários anos (Nilsson, 2006). No entanto, estes não têm sido utilizados para determinar o risco de desenvolvimento da doença ou mesmo usados em estudos pré-clínicos (Fritzler, 2008). Muitos estudos têm mostrado que é possível a detecção de AAs específicos na fase pré-clínica e que estes funcionam como biomarcadores de risco aumentado para desenvolver uma DAI (Fritzler, 2008). Assim pode dizer-se que quanto maior o número de AAs presentes, maior é a probabilidade de ocorrer DAI. Então, ao observar a Figura 9, pode reputar-se que os dadores que apresentam apenas 1 AA são os que provavelmente apresentarão menor probabilidade de sofrer de doença, pelo contrário, os 3 dadores que apresentaram 3 AAs são os que apresentam maior probabilidade.

A distribuição dos ASCA mostrou que os dadores do sexo feminino apresentaram uma maior incidência destes AAs (para as duas classes de imunoglobulinas) (Figura 10). O facto de haver 1 dador masculino e 4 femininos que possuíam IgG e IgA veio aumentar a probabilidade destes 5 dadores poderem vir a sofrer de DCr que é a DAI que mais se associa a estes AAs. Estes AAs apresentam uma elevada sensibilidade (cerca de 60%) e especificidade (até 80% dependendo dos métodos) para a DCr, apresentando-se esta última mais elevada para os AA IgA (Beltrão *et al*, 2010). Não se encontraram estudos de prevalência em dadores ou pessoas saudáveis para os ASCA. Para um estudo mais aprofundado, seria útil o conhecimento da história clínica destes dadores (assim como a dos familiares directos) e se possível a realização de biopsia intestinal.

A maioria das teorias propõe que os ACA possam actuar contra domínio I das B2-GPI e mostrar positividade nos ensaios que se relacionam com diversos mecanismos patológicos, o que implica que a trombose (relacionada com a presença de anticorpos anti-domínio I) na APS é causada por diferentes mecanismos patológicos (Laat *et al*, 2007). Os aPI apresentam uma prevalência de 95-100% nos doentes com APS contribuindo para: Trombose e morbidade na gravidez (D´Cruz, 2002) Assim sendo, os dois dadores com ACA IgM e B2-GPI IgM devem apresentar uma maior probabilidade de vir a sofrer de APS. No entanto, é de salientar que os ACA IgG e os ACA IgA parecerem estar mais estritamente associados a esta síndrome do que os ACA IgM (Figura 11). Para um melhor estudo destes dadores, seria crucial avaliar a presença de eventos trombóticos em parentes chegados. Para os dadores do sexo feminino seria útil a informação da ocorrência ou não de abortos espontâneos.

Os AMA encontram-se presentes com uma prevalência de 90-95% dos doentes com CBP, sendo originalmente a sua detecção feita pelo método de IFI (Oertelt *et al*, 2007 e D´Cruz, 2002). Tradicionalmente os AMA estudados são os M2, no entanto os AMA M3 têm maior sensibilidade. O dador (sexo feminino) que apresentou positividade em ambos os métodos ELISA e que ainda apresentou fluorescência 1/360 com padrão nuclear o que teria maior probabilidade de vir a sofrer de CBP. Para este facto se tornar mais confiável, seria necessário a análise da história clínica deste e dos outros dadores positivos para os AMA. Caso a história clínica, ou familiar, pudesse levar à possibilidade de ocorrer CBP, seria útil, a realização de uma biopsia hepática.

Os ANA estão presentes em diversas doenças auto-imunes assim como noutras condições não auto-imunes. Nas DAI, a análise dos ANA é considerada um método útil devido a sua alta sensibilidade e baixa especificidade Nomeadamente no caso do SLE. Um método positivo com títulos superiores a 1/80 levanta a suspeita para o surgimento desta doença. (Fernandez *et al*, 2003). Os ANA estão presentes em 95% dos doentes com LES. (D´Cruz, 2002) O facto de um dador (feminino) ter apresentado EMA, SS-A/RO e um padrão 1/160 mosqueado fino sem mitoses (Figura 13) direcciona-nos no sentido deste dador poder vir a sofrer uma DAI sistémica como SS, SLE ou AR (Metskula *et al*,2006). No caso do outro dador do sexo feminino que apresentou fluorescência na diluição de 1/160 com padrão mosqueado fino sem mitoses apenas sugere que se poderá estar a antever uma DAI, mas sem se poder especificar qual, pois não se encontrou qualquer especificidade. Seria útil, mais uma vez, requerer o historial clínico e familiar destes dadores.

A produção de IgA específica para as transglutaminases tecidulares está fortemente associada à CD (Marietta *et al*, 2009). Os níveis de AGA IgA sérica e os níveis de AGA IgG são frequentemente elevados em casos não tratados, não obstante este AA apenas apresenta moderada sensibilidade e especificidade. Por seu lado, os métodos que pretendem avaliar a presença de AAs AtTG (principalmente os IgA) apresentam uma elevada especificidade e sensibilidade. (Vermeersch *et al*, 2010). Assim os dadores que apresentam ambos os AAs (Acs ATG e AGA) apresentam uma elevada probabilidade de vir a sofrer de CD (Figura 14), o mesmo se pode dizer para todos os dadores que apresentaram positividade para o método da tTG quimérica pois este método pretende determinar anticorpos IgA e IgG contra neo-epítomos de transglutaminases tecidulares. Desta forma, obtém-se um aumento significativo da sensibilidade e especificidade para a CD, pelo que todos os 4 dadores que tenham apresentado positividade para este método têm grande probabilidade de vir a sofrer desta doença. Comparando a prevalência CD na população portuguesa (Antunes *et al*, 2006) com a prevalência de Acs AtTG e AGA (supondo-se que todos os dadores com estes AAs iriam a sofrer de CD) verifica-se que estes apresentam uma maior prevalência (2,42%) quando comparados com o estudo já realizado (0,75%). Como é sabido, a confirmação de um doente celíaco, só é feita após análise da degradação da mucosa intestinal, observada numa biopsia e só depois se poderia, com toda a certeza, verificar se todos os dadores sofriam de CD.

O RF é o mais antigo e mais conhecido anticorpo ligado a AR sendo a sua acção exercida na fracção Fc das moléculas de IgG. O RF pode ser detectado em cerca 80% dos pacientes com AR, mas esses Acs são encontrados também em diversas outras doenças, especialmente em idosos (10-30%), o que reduz a sua especificidade (Mewar *et al*, 2006). O conjunto de AAs com maior potencial para o diagnóstico da RA são os Acs dirigidos a epitopos contendo citrulina. Os Acs ACCp, principalmente os de segunda geração, são bons marcadores para a RA, com elevada sensibilidade e especificidade, sendo que em indivíduos saudáveis, a ocorrência de anticorpos ACCp é inferior a 1% (Pruijn *et al*, 2005). Então e segundo o que foi publicado, os dadores que apresentaram positividade para os Acs ACCp (Figura 16) têm uma maior probabilidade de desenvolver AR do que os que apresentaram RF (Figura 15). Ao contrário do esperado, não foram encontrados dadores que apresentassem simultaneamente Rf e Acs ACCp. Para uma maior clarificação destes resultados, seria útil o acesso à história clínica do doente e dos familiares mais próximos, assim como a execução de um inquérito para averiguar a presença de dor ou rigidez articular, mesmo que ligeira. Outra circunstância que importa referenciar é que nas análises feitas a estes AAs, e ao contrário do que se encontra mencionado na bibliografia, obtiveram-se maior número de casos nos dadores do sexo masculino.

Não existem muitos estudos que tenham como objectivo a determinação da prevalência de AAs em dadores de sangue ou simplesmente na população saudável. No entanto, seguidamente, ir-se-ão comparar os resultados das prevalências de DAI obtidas com alguns estudos que tiveram com alvo dadores de sangue.

Comparando a prevalência de AAs na população em estudo com outros trabalhos verifica-se que *McIntyre et al* (2003) encontrou uma prevalência de 8,1% para uma ou mais aPl estudadas (ACA, aPS, aPE, aPC). Embora o estudo não especifique a prevalência dos ACA isolados menciona que a prevalência destes AAs é mais elevada nos homens que nas mulheres, o que não se verificou neste trabalho uma vez que a prevalência encontrada (ACA IgM e ACA IgG) nos dadores masculinos foi de 1,22% contra 3,03% nos dadores femininos (Figura 18 e Figura 19). Contabilizando os ACA com as B2-GPI a prevalência de aPL no total da população foi de 2,3% (Figura 17).

Comparando a prevalência dos AAs que se associam à CD verifica-se que a prevalência conjunta dos Acs ATG IgA mais os AGA IgA se apresenta mais elevada (1,21%) (Figura 17) em comparação com o estudo em dadores feito por *Novo et al* (2007) que apresenta uma prevalência destes dois AAs de 0,27%. Noutro estudo (*Tatar et al*, 2004) obteve-se uma prevalência de 1,15% para os Acs AtTG IgA e 0,15% nos tTG IgG. No nosso estudo obteve-se uma prevalência de 0,36% para os Acs AtTG IgA e não foram detectados Acs AtTG IgG (Figura 17). No entanto, no estudo de *Tatar et al*, a população era quase só constituída por dadores do sexo masculino (95,7%), pelo que se se fizer a comparação apenas com os dadores masculinos, a prevalência observada aumenta para 0,41% mas continua abaixo da do estudo

realizado por *Tatar et al.* Outro estudo (*Oliveira et al, 2007*) também revela uma maior prevalência de Acs AtTG IgA (1,5%) que a que foi estimada neste trabalho (0,36%) (Figura 17). Num último estudo (*Shamir et al, 2002*) observou-se que 0,1% dos dadores apresentaram AGA, o que comparado com este trabalho (1,09%) é uma prevalência bastante baixa (Figura 17). Para o cálculo das prevalências dos AGA e dos AAs AtTG não se entrou com a prevalência obtida no estudos das AtTG quimérica, uma vez que neste método se obtivera dadores que podiam ser positivos, ou não, para os AGA IgA e AGA IgG assim como para os Acs AtTG.

No caso da prevalência de ANA e comparando com o estudo feito por *Fernandez et al (2003)* pode dizer-se que no nosso trabalho se observou uma prevalência muito baixa (0,48%) (Figura 17) em comparação com 22,6%. Existe ainda outro estudo, apenas realizado em dadores do sexo feminino, (*Fritler et al,1985*) e que se irá comparar apenas com a prevalência obtida na população feminina em estudo. Assim, a prevalência de AAs SS-A/Ro foi de 0,44% no total da população mas com uma maior prevalência (0,72%) nos dadores com idades compreendidas entre os 45-50 anos. No nosso estudo obteve-se uma prevalência para estes AAs de 0,30% (um dador positivo) nos dadores do sexo feminino (Figura 19), no entanto há que realçar que o dador se encontra na faixa etária acima indicada. Comparando ainda a prevalência de ANA IFI (Hep-2) pode mais uma vez observar-se uma prevalência mais baixa (0,60%) no nosso estudo (Figura 19) em comparação com 1,1% obtido no trabalho referido e para títulos iguais ou superiores a 1/80.

*Fernandez et al (2003)* também estudou a prevalência de AMA IFI obtendo um valor se 2,5%, o que é visivelmente mais elevada do que a observada neste trabalho (0,30%) (Figura 19).

Após a análise de um último estudo (*Nielen et al, 2004*) pretendeu-se comparar a prevalência obtida nos AAs associados à AR. No estudo mencionado obteve-se uma prevalência de 1,1% para o RF IgM e 0,6% para os Acs ACCp. No presente estudo obteve-se uma prevalência de 3,67% e de 1,62% para os Acs ACCp (Figura 17) ou seja obtiveram-se prevalências mais elevadas.

Presumindo que todos os dadores que apresentaram AAs viriam sofrer de DAI e comparando a prevalência dos AAs estudados com a das DAI que mais comumente a eles se associam verifica-se que a nossa prevalência obtida seria muito superior á já referida na literatura ( *Cooper et al, 2003; Tozzoli, 22008 e Rewers, 2005*) Assim será provável que nem todos os dadores que apresentaram AAs possam vir a sofrer de DAI.

Desde a existência dos primeiros relatos de DAI que se observou que a prevalência deste tipo de doenças em pessoas do sexo feminino era bastante mais elevada que no sexo masculino. Tornou-se então evidente que para a maioria das DAI, 10:1 doentes são do sexo feminino. (*Invernizzi et al, 2009*). Assim sendo, neste trabalho também se esperaria encontrar

o mesmo, no entanto, e comparando a Figura 18 com a Figura 19, verifica-se que para os ACA IgG, RF, Acs ACCp, AMA M2, Acs AtTG IgA e AGA IgA tal não aconteceu. Todos estes AAs estão associados a DAI que apresentam maior prevalência em mulheres que em homens. Os Acs AtTG IgG não foram encontrados em quaisquer dos géneros. Também em nenhum dos outros AAs, em que a prevalência foi superior no sexo feminino, se verificou uma prevalência 10 vezes maior à que foi obtida no sexo masculino.

Passando à análise dos perfis serológicos dos dadores,

Gráfico 4 ao Gráfico 10, pode dizer-se que a grande maioria dos dadores apenas apresenta um AA, ou então quando apresenta mais que um AA estes apresentam a mesma especificidade. Assim:

- Os dadores D5, D12, D14, D21, D30, D35, D36, D38, D41, D42, D54, D55, D57, D61, D62, D63, D65, D68, D70, D71, D75, D78, D83, D84, D86, D88, D94 e D97 apresentam um perfil de ASCA IgG e ou ASCA IgA, estes dadores apresentam um maior risco de vir sofrer de DCr ou ainda possivelmente de UC do que os dadores que não apresentaram estes AAs.
- Os dadores D13, D15, D17, D19, D20, D24, D28, D31, D32, D34, D47, D74 e D96 apresentam um perfil de ACA IgM e/ou ACA IgG, que poderá indicar que estes dadores terão um maior risco de vir a sofrer de APS do que os dadores que não apresentaram estes AAs.
- Os dadores D6, D8, D11, D18, D23, D26, D29, D48, D51, D82, D87, D91, D92 e D93 apresentam um perfil de AMA M2 e/ou AMA M3 (e padrão 1/160 anti-mitocondrial num dador) que poderá indicar que estes dadores terão um maior risco de vir a sofrer de CBP do que os dadores que não apresentaram estes AAs.
- Os dadores D39 e D52 positivos para ANA terão maior probabilidade de vir a sofrer de LES, síndrome de Sjögren ou outras doenças sistémicas.
- Os dadores D1, D2, D3, D56, D67, D60, D73, D80, D85, D89 e D90 apresentam um perfil de AGA e/ou Acs AtTG o que poderá indicar que estes dadores possam apresentar um maior risco de vir a sofrer de CD comparativamente aos que não apresentaram estes AAs.
- Os dadores D7, D9, D10, D16, D25, D33, D37, D40, D43, D45, D46, D49, D50, D53, D58, D64, D66, D69, D77, D79, D92 e D100 apresentam -RF e os dadores D95, D98, D99, D101, D102 e D103 Acs ACCp. Todos estes dadores, principalmente os que apresentaram Acs ACCp, pois estes têm um elevado valor preditivo, apresentam um maior risco de vir a sofrer de AR.

De modo a tornar esta análise mais precisa seria útil comparar estes resultados com a história clínica do próprio dador assim como a de familiares de primeiro grau. E quando assim fosse aplicável, a execução de biopsias e métodos complementares.

Dos 103 dadores que apresentaram AAs, 8 tinham perfis de AAs mistos

Embora os AAs que o D72 e o D76 apresentaram fossem distintos e associados a patologias, ambas as reacções auto-imunes ocorrem no mesmo órgão (intestino). Mais uma vez, a execução de uma biopsia intestinal iria ser útil para esclarecer estes dois casos. Os restantes dadores teriam que ser estudados e acompanhados de modo a tentar perceber se apresentavam ou viriam a apresentar alguma DAI.

Na análise da avaliação do *score* para o cálculo da ocorrência de DAI verificou-se que os dadores D14, D15, D22, D27, D30, D45, D48, D52, D59, D62, D67, D71, D72, D75, D76, D80, D83, D85, D94, D97, D101, apresentaram um risco elevado de desenvolver DAI. Reflectindo nos resultados verificou-se que estes dadores são na sua maioria mulheres, com idades superiores a 40 que são dois dos factores que se associam as DAI. Os dois dadores masculinos que apresentaram risco elevado, além de se encontrarem na faixa etária dos dadores com 40 anos ou mais, apresentam 2 AAs, factor que também se associa ao aparecimento de DAI.

É de referir que, no cálculo deste *score* apenas o número de AAs foi contabilizado não se tendo feito distinção entre os títulos desses mesmos AAs e que para o cálculo do risco não se teve em conta o historial clínico do dador ou da sua família directa. Estes dois parâmetros iriam enriquecer (e talvez alterar) o cálculo do risco de DAI. Outro facto importante é que o risco de desenvolvimento de doença é distinto em diferentes grupos étnicos.

Pode afirmar-se que ainda só se avista a ponta do “iceberg” quando se fala em associar inequivocamente um AA a uma certa DAI, pois existem muitos factores a ter em conta e carece-se de estudos que relacionem os AAs a pessoas que ainda não tenham apresentado características de nenhuma DAI.



## **V. CONCLUSÕES**



Sabe-se que a presença de certos AAs se encontra associada a determinadas DAI. Assim, a análise dos AAs com valor preditivo pode ser efectuada de modo a rastrear uma DAI, principalmente quando se trata de doentes de risco (doentes com familiares que tenham DAI) ou que apresentem sintomas específicos de uma dessas doenças.

Cento e três dadores apresentaram pelo menos um AAs o que corresponde a uma prevalência de 12,54% que se enquadra na bibliografia analisada.

Ao consultar bibliografia verificou-se que existe um diminuto número de estudos que têm como objectivo avaliar a prevalência de AAs em populações saudáveis, o que dificultou a comparação dos resultados obtidos. Mesmo assim, puderam-se constatar factos que já anteriormente haviam sido afirmados, como a existência de maior número de dadores femininos com AAs e o aumento da prevalência de AAs à medida que se vai avançando na idade.

Um facto também constatado foi que os AAs apresentavam prevalências distintas entre sexos. Avaliando a totalidade dos dadores verificou-se que os AAs mais prevalentes foram os ASCA (IgA e IgG) seguidos do FR, tendo-se obtido como mais prevalentes os mesmos AAs quando se analisam apenas os dadores masculinos. A prevalência nos dadores femininos foi distinta, apresentando como AAs mais prevalente os ASCA (IgA e IgG), seguindo-se os anticorpos anti-fosfolípidos. Não foi encontrada na bibliografia referenciada nenhum estudo que se debruçasse sobre as diferenças das prevalências dos AAs entre géneros.

Ao contrário do que se observou noutra estudo realizado, neste trabalho obteve-se um prevalência de aPI superior nos dadores femininos.

Comparando as prevalências de AGA e AtTG, verificou-se que em alguns casos estas se apresentavam superiores, enquanto outros casos os resultados foram inferiores. Esta diferença pode dever-se a diferenças de sensibilidade e especificidade dos métodos usados em cada estudo.

Em relação aos AMA e aos ANA, os estudos já existentes apontam para uma maior prevalência destes AAs quando comparada com o nosso estudo. Seriam necessários mais estudos para verificar se na realidade a população portuguesa apresenta mesmo uma prevalência abaixo da existente na bibliografia. Não se encontraram estudos que apresentassem a prevalência de ASCA.

Embora a maioria dos dadores tivessem AAs, apresentassem apenas um perfil para um único AA, existiram dadores com AAs que convencionalmente não se associam às mesmas doenças.

Dos 103 dadores que apresentaram AAs, e após o cálculo do *score* de risco para a ocorrência de DAI, verificou-se que 22 dadores têm risco elevado de sofrer de uma DAI.

Para todos os dadores, mas principalmente os que apresentaram risco elevado de vir a sofrer de DAI e os que mostraram associações atípicas de AAs, aconselha-se uma visita ao médico assistente, de modo a realizarem inquéritos e métodos clínicos que possam esclarecer a presença de uma possível DAI.

Após a análise deste estudo fica a ideia da necessidade de se efectuarem mais estudos deste género e que venham a complementar o estudo efectuado.

## **VI. PERSPECTIVAS FUTURAS**



Sabe-se que os AAs podem encontra-se presentes no soro de futuros doentes com DAI, até 10 anos antes do aparecimento dos primeiros sintomas. Pretende-se, então, fazer o acompanhamento destes dadores nos próximos 10 anos. O objectivo é que a cada ano se repitam as análises aos AAs que apresentaram positividade neste estudo, assim como a realização de exames de diagnóstico (por exemplo biopsias). Assim, ao fim desses 10 anos poder-se-á verificar se os dadores apresentaram ou não DAI ou se estes AAs seriam AAs exotéricos (estavam presentes mas não significaram a existência e doença) e não estariam associados a nenhuma DAI.



## **VII. BIBLIOGRAFIA**



Antunes, H.; Abreu, I.; Nogueiras, A.; Sá, C.; Gonçalves, C.; Cleto, P.; Garcia, F.; Alves, A.; Lemos, D.; **“Primeira determinação de prevalência de doença celíaca numa população portuguesa.”**, *Acta Médica Portuguesa*, Nº 19, 2006, pág.15-120.

Barabas, A. Z.; Cole, C. D.; Graeff, R. M.; Lafreniere, R.; Weir, D. M.; **“The role of autoimmunologists in investigating and treating autoimmune disorders.”**, *Autoimmunity Reviews*, Vol. 10, 2011, pág 166-170.

Beltrão, M.; Bodas, A.; Azevedo, F., Nunes, A.; Santos, C.; Delgado, L.; **“Avaliação de anticorpos anti-Saccharomyces cerevisiae e autoanticorpos em Doentes com Doença Inflamatória Intestinal.”**, *Acta Medica Portuguesa*, Vol. 23,2010; pág 829-836.

Bizzaro, N.; **“Autoantibodies as predictors of disease: The clinical and experimental evidence.”**, *Autoimmunity Reviews*, Vol. 6, 2007, pág 325-333.

Cooper, G.; Stroehla, B. C.; **“The epidemiology of autoimmune diseases.”**, *Autoimmunity Reviews*, Vol. 2, 2003, pág 119-125.

D´Cruz, D.; **“Testing for autoimmunity in humans.”**, *Toxicology Letters*, Vol. 127, 2002, pág. 93-100.

Fernandez, S. A. V.; Lobo, A. Z. C.; Oliveira, Z. N. P.; Fukumori, L. M. I.; Périgo, A. M.; Rivitti, E. A.; **“Prevalence of antinuclear autoantibodies in the serum of normal blood donors.”**, *Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina S. Paulo*, Vol. 58, Nº 6, 2003, pág 315-319.

Fritzler, M. J.; Pauls, J. D.; Kinsella, T. D.; Bowen, T. J.; **“Antinuclear, anticytoplasmic, and anti-Sjogren's Syndrome antigen A (SS-A/Ro) antibodies in female blood donors.”**, *Clinical Immunology and Immunopathology*, Vol. 36, Nº 1, 1985, pág. 120-128.

Fritzler, M.; **“Challenges to the use of autoantibodies as predictors of disease onset, diagnosis and outcomes.”**, *Autoimmunity Reviews*, Vol. 7, 2008, pág 616-620.

Horning, m.; Amsterdam, J. D.; Kamoun, M.; Goodman, D. B. P; **“Autoantibody disturbances in affective disorders: a function of age and gender?”**, *Journal of Effective Disorders*, Vol. 55, 1999, pág 29-37.

Invernizzi, P.; Mackay, I.R.; “**Etiopathogenesis of primary biliary cirrhosis**”, *World Journal of Gastroenterology*, Vol 14, Nº21, 2008 , pág 3328-3337.

Invernizzi, P.; Pasini, S.; Selmi, C.; Gershwin, M. E.; Podda, M.; “**Female predominance and X chromosome defects in autoimmune diseases.**”, *Journal of Autoimmunity*, Vol. 33, 2009, pág 12-16.

Laat, B.; Mertens, K.; e Groot, P. G.; “**Mechanisms of Disease: antiphospholipid antibodies—from clinical association to pathologic mechanism.**”, *Nature Clinical Practice RHEUMATOLOGY*, Vol 4, Nº4, 2008, pág 192-199.

Lleo, A.; Invernizzi, P.; Gao, B.; Podda, M, Gershwin, M. E.; “**Definition of human autoimmunity – autoantibodies versus autoimmune disease.**”, *Autoimmunity Reviews*, Vol. 9, 2010, pág A259-A266.

Marietta, E. V.; Rashtak, S.; Murray, J. A.; “**Correlation analysis of celiac sprue tissue transglutaminase and deamidated gliadin IgG/IgA.**” *World Journal of Gastroenterology*, 2009, Vol 15, Nº 7, pág 845-848.

McIntyre, J. A.; Wangenkecht, D. R.; Waxman, D. W.; “**Frequency and specificities of antiphospholipid antibodies (aPL) in volunteer blood donors.**”, *Immunobiol.*, Vol. 207, 2003, pág. 59-63.

Meroni, P. L.; Shoenfeld, Y.; “**Predictive, protective, orphan autoantibodies: The example of anti-phospholipid antibodies.**”, *Autoimmunity Reviews*, Vol. 7, 2008, pág 585-587.

Metskula, K.; Salur, L.; Mandel, M.; Uibo, R.; “**Demonstration of high prevalence of SS-A antibodies in a general population: Association with HLA-DR and enterovirus antibodies.**” *Immunology Letters*, Vol. 106, 2006, pág 14-18.

Mewar, D.; Wilson, A.G.; “**Autoantibodies in rheumatoid arthritis: a review.**”, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, Vol. 60, 2006, pág 648-655.

Munoz, L. E.; Gaipl, U. S.; Herrmann, M.; “**Predictive value of anti-dsDNA autoantibodies: Importance of the assay**”, *Autoimmunity Reviews*, Vol. 7, 2008, pág 594-597.

Nielen, M. M. J.; Schaardenburg, D. van; Reezink, H. W.; Stadt, R. J. van de; Horst-Bruinsma, I. E. van der; Koning, M. H. T. de; Habibuw, M. R.; Vandenbrouche, J. P.; Dijkmans, B. A. C.; **“Specific Autoantibodies Precede the Symptoms of Rheumatoid Arthritis. A Study of Serial Measurements in Blood Donors.”**, *ARTHRITIS & RHEUMATISM*, Vol. 50, Nº 2, 2004, pág. 380-386.

Nilsson, B. O., Skogh, T.; Ernerudh, J.; Johansson, B.; Lofgren, S.; Wikby, S.; Dahle, D.; **“Antinuclear antibodies in the oldest-old women and men.”** *Journal of Autoimmunity*, Vol.27, 2006, pág 281-288.

Novo, M. D. G.; Garfia, C.; Quirós, M. D. A.; Asensio, J.; Zancada, G.; Gutierrez, S. B.; Manzanares, J.; Solís-Herruzo, J. A.; **“ Prevalence of celiac disease in apparently healthy blood donors in the Autonomous Community of Madrid.”**, *Revista Espanola de Enfermedades*, Vol. 99, Nº 6, 2007, pág. 337-342.

Oertelt, S.; Rieger, R.; Selmi, C.; Invernizzi, P.; Ansari, A. A.; Coppel, R. I.; Podda, M.; Leung, P. S.C.; Gershwin, M. E.; **“A Sensitive Bead Assay for Antimitochondrial Antibodies: Chipping Away at AMA Negative Primary Biliary Cirrhosis.”**, *Hepatology*, 2007, pág 659-665.

Oliveira, R. P.; Sdepanian, V. L.; Barreto, J. A.; Cortez, A. J.P.; Carvalho, F. O.; Bordin, J. O.; Soares, M. A. C.; Patricio, F. R. S.; Kawakami, E.; Morais, M. B.; Fagundes-Neto, U.; **“High prevalence of celiac disease in Brazilian blood donor volunteers based on screening by IgA antitissue transglutaminase antibody.”**, *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, Vol. 19, Nº 1, 2007, 43-49.

Pruijn, E. R. V.; Drijfhout, J. W.; Venrooij, W. J. van;. Zendman, A. J.W.; **“Anti-CCP Antibody Detection Facilitates Early Diagnosis and Prognosis of Rheumatoid Arthritis.”**, *Current Rheumatology Reviews*, Vol. 1, 2005, pág 1-7.

Rewers, M.; **“Epidemiology of Celiac Disease: What Are the Prevalence, Incidence, and Progression of Celiac Disease?”**, *Gastroenterology*, Vol. 128, 2005, pág. s47-s51.

Russell, R.K.; Aldhous, M.C.; MacDougall, M.; Drummond, H. E.; Arnott, I.D.R.; Gillett, P.M.; McGrogan, P; Weaver, L.T.; Bisset, W.M.; Mahdi, G.; Wilson, D.C.; Satsangi, J.; **“Anti-Saccharomyces cerevisiae Antibodies Status Is Associated with Oral Involvement and Disease Severity in Crohn Disease”**, *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, Vol 48, 2009, pág 161-167.

Selmi, C.; “**The X in sex: how autoimmune diseases revolve around sex chromosomes.**”, *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, Vol. 22, Nº 5, 2008, pág. 913-922.

Shamir, R.; Lerner, A.; Shinar, E.; Lahat, N.; Sobel, E.; Bar-or, R.; Kerner, H.; Eliakim, R.; “**The use of a single serological marker underestimates the prevalence of celiac disease in Israel: a study of blood donors.**”, *The American journal of gastroenterology*, Vol. 97, Nº 10, 2002, pág. 2589-2594.

Takasu N, Yoshimura N. J.; “**Hashimoto's thyroiditis: TGA, TPOAb, TRAb and recovery from hypothyroidism.**”, *Expert Review of Clinical Immunology*, Vol. 4, Nº2, 2008, pág 221-237.

Tatar, C.; Elsurer, R.; Simsek, H.; Balaban, Y. H.; Hascelik, G.; Ozcebe, O. I.; Buyukasik, Y.; Sokmensuer, C.; “**Screening of Tissue Transglutaminase Antibody in Healthy Blood Donors for Celiac Disease Screening in the Turkish Population.**”, *Digestive Diseases and Sciences*, Vol. 49, Nº 9, 2004, pág. 1479-1484.

Tozzoli, R.; “**The diagnostic role of autoantibodies in the prediction of organ-specific autoimmune diseases.**”, *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, Vol. 46, Nº 5, 2008, pág 577-587.

Venrooij, W. J. van; Zendman, A. J. W.; Pruijn, G. J. M.; “**Autoantibodies to citrullinated antigens in (early) rheumatoid arthritis.**”, *Autoimmunity Reviews*, Vol. 6, 2006, pág 37-41.

Vermeersc, P.; Coenen, D.; Geboes, K.; Mariën, G.; Hiele, M.; Bossuyt, X.; “**Use of likelihood ratios improves clinical interpretation of IgA AtTG antibody testing for celiac disease.**” *Clinica Chimica Acta*, Vol. 411, 2010, pág 13-17.

Watts, R. A.; “**Autoantibodies in Autoimmune Diseases.**”, *The Medicine Publishing Company Ltd*, 2002, pág 2-6.

## **VIII. ANEXOS**



N.º Dador	Idade	Sexo	Auto-anticorpos confirmados																							
			ANA			Cardiolipinas			FR		Citrulina		AMA		ASCA		tTG AESKU	tTG		Gliadina						
			Sy	SSA	IFI	IgM	IgG	IgM	IgG	B2-GPI IgM	B2-GPI IgG	IgG/IgM/IgA	IgM	ELISA	FEIA	M2	M3	IFI	IgG	IgA	IgG	IgA	IgG	IgA	IgG	
D1	45	M																							25	8,1
D2	54	M																								7,3
D3	33	F																							9,5	
D4	21	F				27		49				50														
D5	30	M																							20,9	
D6	30	F											130			26,9	80,2									
D7	55	M																								
D8	32	M																								
D9	31	M											215													
D10	47	M											50													
D11	42	M																								
D12	52	M																							23,9	
D13	38	F											11													
D14	48	F																							20,8	
D15	49	F																								
D16	30	M											55,8													
D17	22	F																								
D18	28	M																								
D19	28	M																								
D20	33	F																								
D21	32	F																							20,6	
D22	51	M																							31,8	

N.º Dador		Idade	Sexo	Auto-anticorpos confirmados																						
				ANA			Cardiolipinas			FR		Citruilina		AMA			ASCA		tTG AESKU		tTG		Gliadina			
				Sy	SSA	IFI	IgM	IgG	B2-GPI IgM	B2-GPI IgG	IgG/IgM / IgA	IgM	ELISA	FEIA	M2	M3	IFI	IgG	IgA	tTG	IgG	IgA	IgG	IgG	IgA	
D23	31	M						52			50	119														
D24	22	M									70,3	99,9														
D25	38	M													21,9											
D26	32	M																								
D27	53	F																								
D28	22	M						204																		
D29	33	M																								
D30	45	F																								
D31	31	F					17																			
D32	29	M					9,9																			
D33	23	M										68,8														
D34	25	F					10																			
D35	23	M																								
D36	36	M																								
D37	31	M																								
D38	21	F																								
D39	33	F																								
D40	38	M																								
D41	50	M																								
D42	35	M																								
D43	21	F																								





N.º Dador	Idade	Sexo	Auto-anticorpos confirmados																					
			ANA		Cardiolipinas		FR		Citrulina		AMA			ASCA		tTG AESKU		tTG		Gliadina				
			Sy	SSA	IFI	IgM	IgG	B2-GPI IgM	B2-GPI IgG	IgM/IgG/IgA	IgM	ELISA	FEIA	M2	M3	IFI	IgG	IgA	IgG	IgA	IgG	IgA	IgG	
D87	28	M																						
D88	59	M																22						
D89	45	M																					19	
D90	52	M																				8,2		
D91	36	F																						
D92	33	M																						
D93	27	F																						
D94	41	F																						
D95	26	M																						
D96	23	F																						
D97	49	F																						
D98	36	M																						
D99	19	M																						
D100	34	M																						
D101	51	M																						
D102	27	M																						
D103	39	M																						
Total			1	1	2	13	3	2	1	2	23	8	1	14	9	1	18	22	8	0	3	4	7	

