

[RETRATAÇÃO]: Ahlin E, Elshafei A, Nur M, El Safi SH, Johan R, Elghazali G. Anticorpos antipeptídeos citrulinados e fator reumatoide em pacientes sudaneses com infecção por *Leishmania donovani*. *Rev. Bras. Reumatol.* [online]. 2011, vol.51, n.6, pp. 579-586. ISSN 0482-5004. <http://dx.doi.org/10.1590/S0482-50042011000600005>.

RESUMO: A Revista Brasileira de Reumatologia decidiu retratar o artigo intitulado Ahlin E, Elshafei A, Nur M, El Safi SH, Johan R, Elghazali G. Anticorpos antipeptídeos citrulinados e fator reumatoide em pacientes sudaneses com infecção por *Leishmania donovani*. *Rev. Bras. Reumatol.* [online]. 2011, vol.51, n.6, pp. 579-586. ISSN 0482-5004. <http://dx.doi.org/10.1590/S0482-50042011000600005>.

As razões que determinaram foram:

- (1) O autor Elghazali G não tomou parte na produção dos dados do manuscrito e não foi co-autor de qualquer outra versão do manuscrito
- (2) Um manuscrito com conteúdo muito semelhante, que faz parte da tese de doutoramento do autor Ahlin E (primeiro autor), foi aceito por outra revista
- (3) As figuras publicadas na nossa revista eram idênticas às figuras da tese do autor E. Ahlin .
- (4) O nome do autor Johan Ronnelid foi invertido no manuscrito publicado na RBR.

Os autores E Ahlin, A Elshafei, M Nur and J Ronnelid concordaram com a retratação de acordo com as razões 1, 2, 3 e 4. G Elghazali não concordou e SH El Safi não respondeu às nossas solicitações.

A retratação foi formalmente aprovada pelos editores da Revista Brasileira de Reumatologia

São Paulo, 8 de abril de 2014

Editores da Revista Brasileira de Reumatologia

Anticorpos antipeptídeos citrulinados e fator reumatoide em pacientes sudaneses com infecção por *Leishmania donovani*

Erik Ahlin, PhD¹, Amir Elshafei², Musa Nur³,
Sayda Hassan El Safi⁴, Ronnelid Johan⁵, Gehad Elghazali⁶

RESUMO

Objetivo: Este estudo avaliou a presença de anticorpos antipeptídeos citrulinados cíclicos (anti-CCP), fator reumatoide (FR) e imunocomplexos circulantes (ICC) em pacientes sudaneses infectados por *Leishmania donovani*. **Pacientes e métodos:** Os soros foram coletados de pacientes infectados por *Leishmania* (n = 116) e de sudaneses saudáveis (n = 93). Dezenove pacientes sudaneses com artrite reumatoide (AR) e anti-CCP+ foram incluídos como controles positivos. Os níveis de ICC e anti-CCP foram medidos por ELISA. Para avaliar a reatividade citrulina-específica foi usada a placa-controle com peptídeos-controle cíclicos contendo arginina em vez de citrulina. **Resultados:** Entre os pacientes infectados por *Leishmania* e os pacientes com AR e anti-CCP+, a maioria (86%) era positiva para FR, enquanto a frequência de positividade para ICC foi maior entre pacientes com leishmaniose visceral (LV) (LV 38%; AR e anti-CCP+ 24%). Quando foi analisada a reatividade anti-CCP, 12% dos pacientes com LV foram positivos. Os níveis de anti-CCP entre os pacientes com LV correlacionaram-se bem com os níveis de ICC encontrados ($r = 0,65$; $P < 0,0001$). No grupo de AR não foi encontrada associação entre ICC e anti-CCP. A possibilidade de que a positividade para anti-CCP se deva a reações cruzadas com ICC foi descartada experimentalmente. Ao contrário do que foi visto no soro dos sudaneses com AR, a reatividade anti-CCP não se restringiu à citrulina, mas houve reação igual com os peptídeos-controle com arginina. **Conclusão:** O fato de a reatividade CCP não se ter restringido à citrulina comprova tratar-se mais de um efeito de inflamação extensa e ativação imune do que de um sinal de características patogênicas compartilhadas com artrite anti-CCP. Nossos achados ressaltam a importância de se interpretar um teste CCP positivo com cuidado ao se avaliar condições não reumáticas ou em áreas onde tais infecções predominam.

Palavras-chave: fator reumatoide, *Leishmania donovani*, complexo antígeno-anticorpo.

© 2011 Elsevier Editora Ltda. Todos os direitos reservados.

INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença parasitária causada pelo parasita *Leishmania* e tem diferentes tipos: leishmaniose visceral (LV), leishmaniose cutânea pós-calazar (LCPC), leishmaniose cutânea, leishmaniose mucocutânea e leishmaniose viscerotrópica. A LV ou calazar é causada pelo parasita *Leishmania donovani* e está associada à imunopatologia caracterizada por forte resposta imune humoral com alta produção de anticorpos

antileishmânia, imunocomplexos circulantes (ICC) e ativação policlonal de linfócitos B.

A LCPC é uma complicação da LV, caracterizada por erupções cutâneas graves principalmente em pacientes jovens que se recuperaram de LV e que, exceto por isso, estão bem. A artrite reumatoide (AR) é uma doença sistêmica autoimune comum que afeta principalmente mulheres entre 40 e 60 anos. O sintoma mais importante é a inflamação articular crônica, embora manifestações extra-articulares também estejam presentes.

Recebido em 09/04/2011. Aprovado, após revisão, em 30/08/2011. Os autores declaram a inexistência de conflito de interesses. Suporte financeiro: Institucional (Universidade).

1. Mestre em Imunobiologia pela Unidade de Imunologia Clínica, Uppsala University, Uppsala, Suécia

2. Médico Hematologista, Laboratório de Patologia e Microbiologia, Alribat Hospital, Cartum, Sudão

3. Consultor, Reumatologista da Unidade de Reumatologia, Alribat University Hospital, Cartum, Sudão

4. Consultor, Professor de Imunologia, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Faculdade de Medicina, University of Khartoum, Sudão

5. Consultor, Professor-Associado de Imunologia, Unidade de Imunologia Clínica, Uppsala University, Uppsala, Suécia

6. Consultor Sênior, Professor de Imunologia, University of Shendi, Shendi, Sudão; e King Fahad Medical City, Riyadh, Arábia Saudita

Correspondência para: Gehad Elghazali. King Fahad Medical City, Riyadh 11525, Arábia Saudita. E-mail: gelghazali@gmail.com

O fator reumatoide (FR) é um anticorpo que reage com a porção Fc da IgG. O FR clássico é um anticorpo IgM que reage contra IgG-Fc, mas também podem ser encontrados FRs IgA e IgG. Os FRs são detectados no soro da maioria dos pacientes com AR.¹ Embora a presença de FR em pacientes com AR esteja correlacionada a maior atividade da doença, o FR tem baixa especificidade como marcador de AR quando comparado a controles com outras doenças reumáticas e infecciosas.²⁻⁵

Os imunocomplexos (IC) desempenham funções centrais na inflamação da AR por meio da estimulação da produção de citocinas mediada por monócitos/macrófagos nas doenças reumáticas, estando também envolvidos na indução de FR na AR.⁶ A associação entre IC e FR também foi demonstrada em outras doenças reumáticas e infecciosas.^{7,8} A produção de FR na LV foi relatada alguns anos atrás,⁹ e a elevação nos níveis de ICC também foi observada na leishmaniose crônica e em muitas outras doenças parasitárias tropicais.¹⁰⁻¹⁵ Já demonstramos anteriormente que IC isolados de pacientes infectados com *Leishmania* induzem citocinas tanto pró-inflamatórias quanto imunossupressoras. Além disso, os níveis séricos de IC que se ligam a C1q correlacionaram-se a níveis de citocina induzida por IC.¹⁶

Os anticorpos anti-peptídeos citrulinados (ACPA) mostraram-se marcadores sorológicos específicos para AR, com maior especificidade diagnóstica para AR, mas com sensibilidade semelhante à do FR, tendo a dosagem do primeiro sido claramente superior em cenários específicos. A citrulinização de proteínas e peptídeos ocorre naturalmente durante a inflamação, e é uma modificação pós-translacional da arginina por desaminação.¹⁷ Anticorpos contra várias proteínas citrulinadas diferentes foram associados a AR, e pacientes com AR positivos para anti-CCP desenvolvem manifestações clínicas mais graves que pacientes negativos para anti-CCP.^{18,19} A reatividade anti-CCP em pacientes com AR foi associada a vários fatores genéticos predisponentes, em especial alelos HLA do “epítipo compartilhado”, mas também a fatores ambientais, como tabagismo.²⁰ A presença de anti-CCP também foi demonstrada em várias doenças infecciosas, como tuberculose pulmonar, hepatite C e hepatite autoimune tipo 1.²¹⁻²⁵ Importante ressaltar que a positividade anti-CCP vista em soros de doença não AR parece nem sempre ser dependente de citrulina, como demonstrado por Vannini *et al.*²⁴ Devido ao nosso interesse na resposta ACPA na AR^{18,26,27} e aos nossos estudos prévios sobre inflamação mediada por IC em pacientes infectados por *Leishmania*,¹⁶ este estudo teve por objetivo investigar a presença de ACPA, FR e ICC em pacientes africanos também infectados por *L. donovani*.

PACIENTES E MÉTODOS

Pacientes e amostra

Amostras de soro foram coletadas de 74 pacientes com LV (idade média 23 anos, variação 3–73, razão feminino/masculino 25/48), 42 pacientes com LCPC (idade média 11 anos, variação 4–27, razão feminino/masculino 14/25) e 93 controles sudaneses saudáveis (idade média 23 anos, variação 3–54, razão feminino/masculino 26/67). Os pacientes com LV e LCPC eram originários do hospital rural Tabarakalla, no estado de Gadarif, ao longo do baixo rio Atbara, na província de Gallab, Sudão Oriental. Essa área está localizada 70 km a sudeste da cidade de Gadarif, e é endêmica para *L. donovani*, cujo principal vetor é o *Phlebotomus orientalis*.²⁸ Os pacientes arrolados no estudo vieram principalmente dos povoados de Tabarakalla e Barbar Elfogara, áreas endêmicas com alta prevalência tanto de LV quanto de LCPC. Foi obtida história clínica detalhada, que incluiu tribo, residência, ocupação, estado civil, tratamento medicamentoso, dor abdominal, vômitos, náusea, história prévia de tendência a sangramento, infecção do trato urinário e de picadas de insetos e história familiar de LV, hipertensão arterial ou *diabetes mellitus*. Deu-se ênfase especial a qualquer forma prévia de leishmaniose. A origem étnica e geográfica dos sujeitos foi investigada, e os mesmos foram examinados à procura de manifestações clínicas de LV. Nenhum paciente relatou história familiar ou qualquer histórico de doença que se saiba associada à AR ou a outras doenças autoimunes sistêmicas. Realizou-se exame clínico geral, com atenção especial à hepatosplenomegalia, adenomegalia e febre recorrente por mais de um mês. O tamanho do fígado foi medido na linha hemiclavicular a partir da margem costal. O tamanho do baço foi avaliado pela medida da distância entre a margem costal na linha axilar anterior e a ponta do baço. A linfadenopatia foi classificada em “localizada” se encontrada em apenas um local, e “generalizada” se presente em dois ou mais locais. As membranas mucosas oral e nasal foram examinadas em busca de evidência de leishmaniose mucosa. Examinaram-se o esfregaço sanguíneo fino e a gota espessa para detecção de *Plasmodium* em todos os indivíduos com febre ou esplenomegalia ou que pareciam doentes, tendo-se excluído aqueles com esfregaços sanguíneos positivos para malária. Realizou-se aspiração de linfonodo inguinal naqueles com suspeita clínica de LV (isto é, todos os indivíduos com febre por mais de dois meses, dor no quadrante superior esquerdo, linfadenopatia, esplenomegalia ou definhamento). Aqueles com resultado negativo foram submetidos à aspiração de medula óssea da crista ilíaca superior posterior. Os esfregaços foram fixados em metanol, corados por Giemsa e examinados com lentes de imersão em óleo. A

LCPC foi diagnosticada em bases clínicas, de acordo com o aparecimento e a distribuição de erupção cutânea após o tratamento em pacientes com diagnóstico prévio de LV. Não há testes laboratoriais para o diagnóstico de LCPC.

Dezenove pacientes com AR (idade média 45 anos, variação 22–60, razão feminino/masculino 17/2) foram extraídos de uma coorte de AR da Unidade de Reumatologia do Alribat University Hospital, onde foram diagnosticados por um reumatologista de acordo com os critérios do *American College of Rheumatology* (ACR) de 1987.²⁹ Os pacientes com AR foram escolhidos primeiramente como controles positivos na investigação da especificidade de anti-CCP – logo, foram incluídos apenas pacientes anti-CCP+. Controles sudaneses saudáveis foram obtidos tanto da área rural de Tabarakalla quanto do Alribat University Hospital. Para as análises de anti-CCP e FR, 100 controles suecos saudáveis foram usados para validar os valores de referência definidos pelo fabricante, enquanto um grupo-controle sueco menor (n = 20) foi utilizado para verificar o ponto de corte para o ELISA de ICC que se liga a C1q. Os soros foram separados por centrifugação em até duas horas após a coleta. As amostras foram separadas e congeladas em nitrogênio líquido (interior) ou em congelador a -70°C (Cartum, capital) em até duas horas após a amostragem, armazenadas congeladas a -70°C e transportadas em gelo seco para Uppsala, na Suécia. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Alribat University Hospital, pela Faculdade de Medicina da University of Khartoum, pelo Ministério da Saúde de Gadarif e pelo Comitê de Ética da Uppsala University. Todos os adultos que participaram deste estudo assinaram o consentimento livre e informado. No caso de crianças pequenas, o documento foi fornecido pelos pais.

Medida dos níveis de ICC, anti-CCP e FR

Ensaio de ligação a C1q para ICC

Os níveis de ICC foram medidos pelo ensaio de C1q em fase sólida (Bindazyme C1q *binding kit*; Binding Site, Birmingham, Reino Unido). De acordo com o fabricante, níveis superiores a 10,8 Eq/mL são considerados positivos. A variação do ensaio é de 1,23–100 Eq/mL.

Anti-CCP

O anticorpo anti-CCP foi medido por ensaio Immunoscan RA Mark 2 (Euro-Diagnostica, Malmö, Suécia). A positividade para anti-CCP foi determinada de acordo com as instruções do fabricante, com 25 U/mL usados como ponto de corte. O ensaio não fornece dados quantitativos abaixo do ponto de corte definido pelo fabricante. Assim, estendemos a curva-padrão para

obter também valores abaixo de 25 U/mL (variação estendida 3,126–1600 U/mL). Aos valores que excederam a variação da curva-padrão foi atribuído o valor de 1600 U/mL.

Uma placa-controle de ELISA com peptídeos cíclicos contendo arginina em vez de citrulina nas posições de peptídeos relevantes foi gentilmente cedida por Jörgen Wieslander, da Euro-Diagnostica, e utilizada para avaliar reatividade específica para citrulina. O valor de corte para o controle de arginina foi determinado arbitrariamente pela absorbância correspondente a 25 U/mL na curva-padrão para a variante de citrulina (CCP). Os resultados foram então calculados como índice de *cut-off* (COI): arginina OD₄₅₀ observada/citrulina OD₄₅₀ de corte, de acordo com Vannini *et al.*³⁰

A fim de testar se os ICC presentes nas amostras investigadas influenciavam a reatividade anti-CCP, adsorveram-se IC que se ligam a C1q do soro e avaliou-se a reatividade anti-CCP. Foram testados pacientes positivos para anti-CCP, a saber: oito com LV, quatro com LCPC e seis com AR. Os soros foram diluídos a 1:50 e incubados por duas horas em placas revestidas por C1q (Bindazyme C1q *binding kit*; Binding Site). Logo após a incubação, as amostras foram transferidas para a placa CCP e realizou-se a pesquisa para anti-CCP, de acordo com o fabricante do *kit* de teste anti-CCP.

Fator reumatoide

O FR foi medido por nefelometria (Image, Beckman Coulter) e expresso em unidades internacionais/mL (UI/mL); valores > 20 UI/mL foram considerados positivos. A análise foi padronizada utilizando-se o soro de referência NIBSC 64/002. O nefelômetro não expressa dados quantitativos inferiores a 20 UI/mL, e às amostras negativas para FR atribuiu-se o valor 0 UI/mL na comparação entre os diferentes grupos.

Análise estatística

O teste de Mann-Whitney foi usado para comparar os grupos. Para correlações entre grupos utilizou-se o teste de correlação de Pearson. Foram considerados significativos P < 0,05.

RESULTADOS

Fator reumatoide

Entre os pacientes com LV, 86% (64/74) foram positivos para o FR, com média de 71 UI/mL entre os sujeitos positivos e variação de 20–1440 UI/mL. Entre os pacientes com LCPC, 69% (29/42) foram positivos para o FR (média 34 UI/mL, variação 20–165 UI/mL). No grupo de AR positivo para anti-CCP, 84% (16/19) foram positivos para FR (média 239 UI/mL, variação

69–3470 UI/mL). Entre os controles sudaneses, 11% (10/93) apresentavam níveis de FR superiores a 20 UI/mL (média 23 UI/mL, variação 20–96 UI/mL). Em uma coorte de 100 controles suecos saudáveis, dois mostraram positividade fraca para FR (20,4 e 21,6 UI/mL).

O grupo com LV apresentou níveis mais elevados de FR quando comparado a pacientes com LCPC ($P < 0,0001$). Não houve diferença significativa entre pacientes com AR e anti-CCP+ e pacientes com LV. Entretanto, pacientes com AR tinham níveis mais elevados quando comparados a pacientes com LCPC ($P = 0,0004$). Todos os três grupos de doença apresentaram níveis de FR significativamente maiores que os controles sudaneses saudáveis. Tais resultados são mostrados na Figura 1.

Imunocomplexos circulantes

Os níveis de ICC foram determinados em pacientes com LV, LCPC e AR positivos para anti-CCP, indivíduos sudaneses saudáveis e em uma coorte-controle sueca (Figura 2). Entre os pacientes com LV, 23/74 (31%) tinham níveis elevados de IC (média 7 Eq/mL, variação 0,0–100,6 Eq/mL), enquanto entre os pacientes com LCPC, apenas 2/42 (7%) apresentavam níveis elevados de IC (média 2,0 Eq/mL, variação 0–21 Eq/mL). Um de 20 pacientes com AR e positivos para anti-CCP tinha nível de IC acima de 10,8 Eq/mL (média 1,5 Eq/mL, variação 0–10,8). No grupo-controle sudanes, 2/93 foram positivos para ICC. No grupo-controle sueco, todos os indivíduos foram negativos para ICC. Os pacientes com LV apresentaram níveis significativamente mais altos de IC que os outros grupos investigados ($P < 0,0001$ para todas as comparações).

Reatividade anti-CCP

Entre os pacientes com LV, 12% (9/74) apresentaram positividade para anti-CCP (média 30,86 U/mL, variação 25–148). A reatividade anti-CCP também foi encontrada em 4,2% dos pacientes com LCPC (2/42; 34 e 95 U/mL). Entre os pacientes sudaneses com AR e anti-CCP+, os níveis de anti-CCP foram muito mais elevados (média 1265 U/mL, variação 50–>1600 U/mL). No grupo-controle sudanês saudável foi encontrado um indivíduo positivo para anti-CCP (51 U/mL). No grupo-controle sueco, 3/100 foram positivos, dois dos quais na região limite (30, 42 e 1643 U/mL). Observamos que os pacientes com LV e LCPC exibiram reatividade anti-CCP em níveis entre o limite inferior de detecção do ensaio (3,126 U/mL) e o ponto de corte de 25 U/mL. Para os pacientes com LV e negativos para anti-CCP o nível mediano foi 6,7 U/mL, enquanto para os pacientes com LCPC e negativos para anti-CCP o nível mediano foi 7,9 U/mL. Esses resultados divergiram

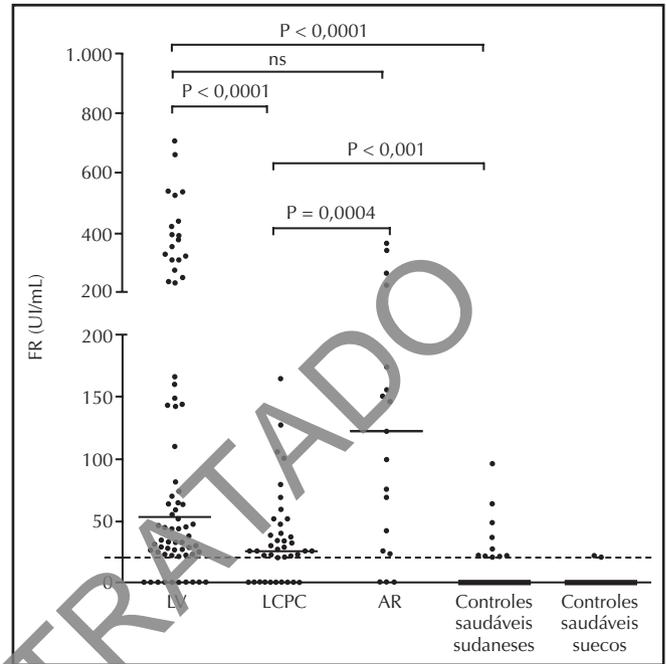


Figura 1 Níveis de FR nos diferentes grupos. A linha tracejada representa o valor de corte (20 UI/mL) para o nefelômetro. Linhas contínuas mostram a média em cada grupo.

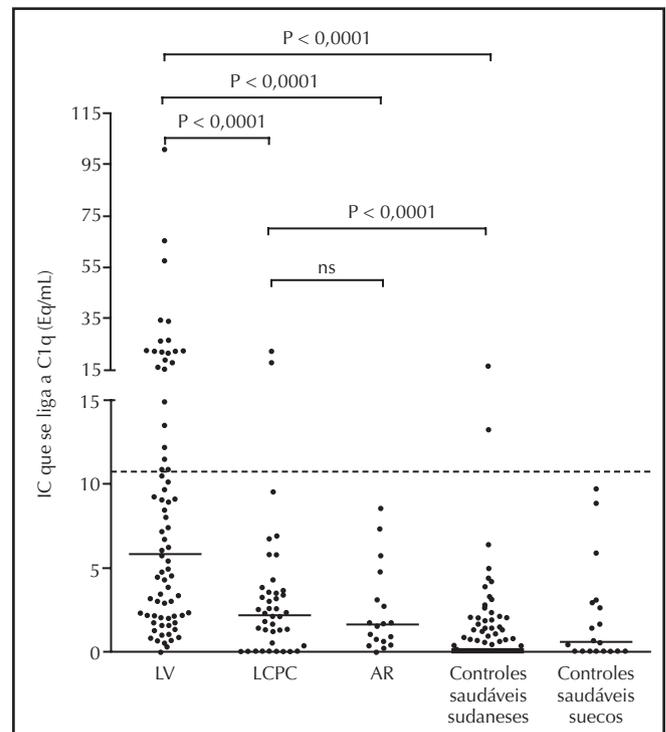


Figura 2 Níveis de ICC nos diferentes grupos. A linha tracejada representa o valor de corte (10,8 Eq/mL), como recomendado pelo fabricante. Linhas contínuas mostram a média em cada grupo.

daqueles do grupo-controle sudanês saudável, cujas amostras foram mais claramente ou positivas ou negativas, como visto na Figura 3, em que a média para os sujeitos negativos para anti-CCP foi 5,1 U/mL.

Os níveis de anti-CCP entre pacientes com LV apresentaram boa correlação com os níveis de IC ($r = 0,6586$; $P < 0,0001$ – Tabela 1). No grupo de AR com positividade para anti-CCP não se observou associação entre os níveis de IC e os de anti-CCP. Para descartar a possibilidade de que a positividade para anti-CCP se devesse a reações cruzadas com IC, ou que a reatividade anti-CCP pudesse estar primariamente ligada ao IC, realizou-se a adsorção de IC que se ligam a C1q de soros e avaliou-se a

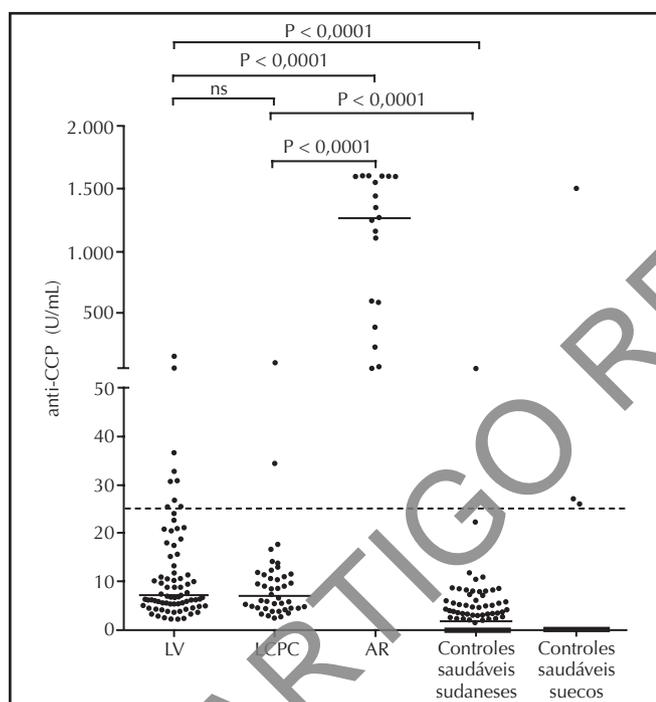


Figura 3
Níveis de anti-CCP nos diferentes grupos. As linhas tracejadas representam o valor de corte (25 U/mL) conforme descrito pelo fabricante. Linhas contínuas mostram a média em cada grupo.

reatividade anti-CCP. Esse procedimento não diminuiu a reatividade anti-CCP no grupo com LV nem nos pacientes com AR e positivos para anti-CCP. A média da reatividade anti-CCP que restou após a adsorção ao IC foi de 97% em todos os grupos [variação: LV 61%–175%, AR 77%–107%, LCPC 85%–102% (dados não mostrados)].

Analisou-se então a especificidade da citrulina entre os pacientes positivos para anti-CCP por meio de uma placa-controle contendo peptídeos cíclicos não citrulinados como antígenos-alvo (Figura 4). Entre as amostras positivas para

anti-CCP no grupo com LV não houve diferença quanto à reatividade anti-CCP e ao peptídeo-controle não citrulinado (Figura 4A). Foi encontrado o mesmo padrão para os dois pacientes com LCPC positivos para anti-CCP (Figura 4B). Essa reatividade não citrulina-específica contrastou com a dos pacientes sudaneses com AR e positivos para anti-CCP, que apresentaram reatividade anti-CCP específica para CCP e muito baixa reatividade com os peptídeos-controle contendo arginina ($P < 0,0001$; Figura 4C).

DISCUSSÃO

Neste estudo, descobrimos que os soros de pacientes infectados por *Leishmania* foram frequentemente positivos para FR e tinham níveis elevados de ICC, e que uma substancial quantidade (11,4%) mostrou reatividade anti-CCP. Entretanto, ao contrário do observado nos soros de sudaneses com AR, a reatividade anti-CCP não estava restrita aos peptídeos que continham citrulina, pois houve igual reatividade contra os peptídeos-controle contendo arginina cíclica tanto nos pacientes com a forma aguda de LV quanto naqueles com a forma de LCPC após tratamento.

Um pequeno estudo demonstrou reatividade anti-CCP2 em um grupo de 10 brasileiros infectados com o parasita *Leishmania major*.³⁰ Entretanto, a dependência de citrulina dos soros com reatividade anti-CCP não foi avaliada nesse estudo. Agora ampliamos tais estudos para englobar uma coorte maior de pacientes sudaneses infectados com *L. donovani*, tanto na

Tabela 1

Correlações entre os níveis de FR, anti-CCP e ICC nos diferentes grupos investigados

	FR vs. IC	FR vs. anti-CCP	IC vs. anti-CCP
LV + LCPC (n = 116)	0,1985 ($P = 0,0327$)	-0,0087 ($P = 0,9260$)	0,5598 ($P < 0,0001$)
LV (n = 74)	0,1225 ($P = 0,2983$)	-0,0394 ($P = 0,7388$)	0,6586 ($P < 0,0001$)
LCPC (n = 42)	0,1055 ($P = 0,5061$)	0,0133 ($P = 0,9334$)	0,0687 ($P = 0,6655$)
Pacientes com AR CCP-positivos (n = 19)	0,6398 ($P = 0,0032$)	0,2638 ($P = 0,2751$)	0,3395 ($P = 0,1550$)
Controles sudaneses saudáveis (n = 93)	-0,0735 ($P = 0,4836$)	-0,0031 ($P = 0,9766$)	-0,0204 ($P = 0,9766$)
Todos os grupos (n = 228)	0,1966 ($P = 0,0029$)	0,3008 ($P < 0,0001$)	-0,0153 ($P = 0,8183$)

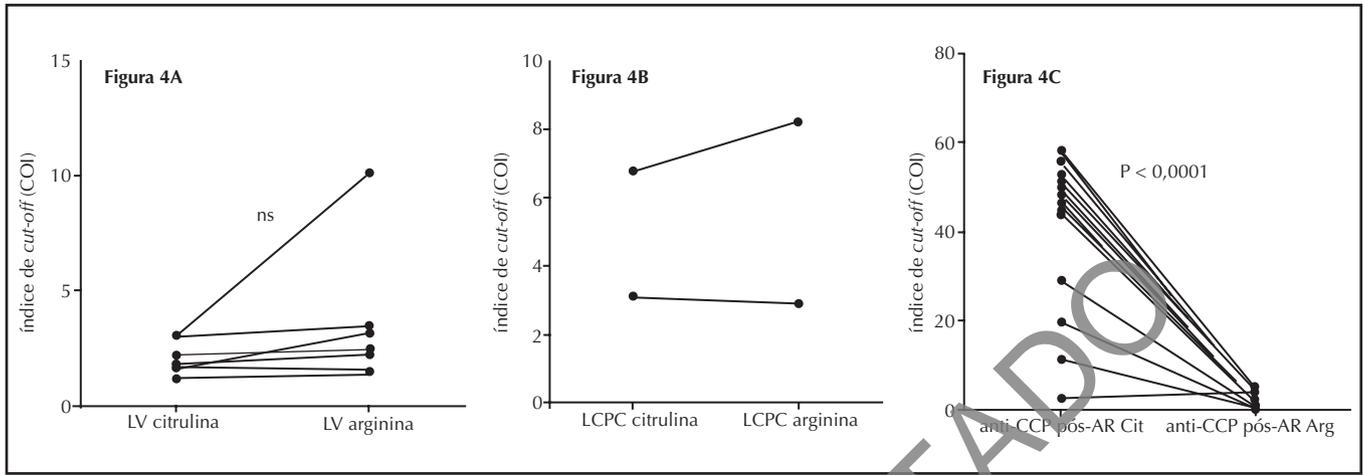


Figura 4

Especificidade pela citrulina entre pacientes positivos para anti-CCP: (A) LV; (B) LCPC; e (C) pacientes sudaneses com AR. Os resultados foram calculados como o índice de *cut-off* (COI): $\text{arginina OD}_{450} / \text{citrulina OD}_{450}$ de corte.

forma de LV aguda quanto na forma de LCPC após tratamento, que não têm ocorrência na América do Sul. Demonstramos que pacientes com ambos diagnósticos podem apresentar reatividade contra CCP2, que é direcionada à espinha dorsal peptídica cíclica sem necessidade de citrulinização de resíduos de arginina. Isso contrasta com os pacientes sudaneses com AR, que apresentam dependência estrita de citrulinização dos resíduos de arginina para fornecer alta reatividade anti-CCP2.

Além do nosso estudo, apenas dois relatos de reatividade ACPA em condições não reumáticas investigaram o soro usando poços ELISA de controle contendo arginina. O estudo de Vannini *et al.*²⁴ sobre pacientes com hepatite autoimune tipo I usou controles adequados tanto para ensaios de CCP2 comercial e patenteado, que não teve a composição do peptídeo divulgada para a comunidade científica, quanto para o peptídeo CCP1, descrito publicamente.⁵ Esses autores mostraram que, embora a maioria (87%) dos soros positivos para CCP de pacientes reumáticos com diagnósticos outros que não AR fosse citrulina-específica, isso acontecia apenas com metade dos soros investigados para hepatite. No estudo de Kakumanu *et al.*²¹ sobre tuberculose, a reatividade contra o peptídeo CCP1 mostrou-se citrulina-específica em 94% dos soros de AR e em 22% dos soros de pacientes com tuberculose pulmonar. Os autores também mostraram que o peptídeo solúvel CCP1 inibiu a reatividade com soros de AR, mas não de tuberculose. Tal investigação não pôde ser reproduzida com os agentes CCP2 patenteados.

Embora o teste CCP2 seja o mais comumente usado para diagnóstico clínico, a natureza de propriedade particular e

protegida do antígeno CCP2 representa um óbvio obstáculo em estudos de condições não reumáticas, tais como hepatite autoimune²⁴ e tuberculose,²¹ nas quais o uso de controles adequados mostrou que as reatividades contra CCP são muito menos citrulina-dependentes que em estudos paralelos de pacientes com AR. A dependência de citrulina da reatividade ACPA foi inequivocamente comprovada em numerosos estudos de pacientes com AR. O fato de que apenas uma pequena minoria de testes ACPA comerciais é projetada com poços-controle adequados com antígenos não citrulinados não é, portanto, um grande problema na prática clínica. Quando se demonstra a presença de ACPA em condições não reumáticas, deve-se investigar a citrulina-dependência da reatividade.

Nosso achado de que a reatividade CCP em pacientes LV não ficou restrita à citrulina favorece o argumento de que a reatividade anti-CCP seja mais um efeito da inflamação extensa e ativação imune do que um sinal de características patogênicas compartilhadas com a artrite positiva para anti-CCP. Na AR, a reatividade anti-CCP apresenta uma distribuição bimodal com níveis ou totalmente negativos ou positivos muito altos, em que o grupo de pacientes positivos para anti-CCP é definido por certas características genéticas e impacto de gatilhos ambientais, em especial o tabagismo.³¹ No presente estudo, a reatividade média anti-CCP entre sujeitos positivos foi 49 U/mL, representando 1,96 vez o valor de corte, dados sobre a baixa reatividade anti-CCP condizentes com os achados em leishmaniose brasileira.³⁰ Isso contrasta com os pacientes suecos com AR e positivos para anti-CCP, que apresentam um nível médio de 1128 U/mL (45,1 vezes o valor de corte)

usando-se o mesmo teste anti-CCP.¹⁸ Tal hipótese acha-se também fundamentada pelo fato de que a reatividade CCP2 em pacientes com LV e LCPC mostrou um *continuum* entre soro positivo para anti-CCP2 e o intervalo “negativo” abaixo do valor de corte, enquanto controles sudaneses negativos para anti-CCP apresentaram menor reatividade (Figura 3). Isso está também de acordo com nossa experiência de pacientes suecos com AR, entre os quais os sujeitos negativos para anti-CCP apresentam, em sua maioria, reatividade muito baixa dentro da área negativa (observações não publicadas). Embora pareça que algumas infecções possam apresentar resultados falsamente positivos para anti-CCP, é possível que elas realmente estejam associadas ao aparecimento de ACPA, e que a especificidade pela citrulina da resposta ACPA possa se desenvolver com o tempo. Um exemplo é a imunidade à bactéria *Porphyromonas gingivalis*, associada à periodontite. A *P. gingivalis* mostrou-se capaz de citrulinar proteínas, sugerindo que a citrulinização mediada por ela fornece um mecanismo molecular para gerar antígenos que direcionam a resposta autoimune contra ACPA na AR.^{32,33}

Um achado intrigante foi que dois grupos de infecções, em que se relatou resposta ACPA não citrulina-específica e não associada à artrite, representam agentes localizados intracelularmente em macrófagos dos tecidos. Tanto os parasitas *Leishmania*²⁰ quanto a tuberculose^{21,25} representam infecções intracelulares em macrófagos tissulares. Os achados de respostas ACPA na hepatite C,^{22,23,34} em que a infecção reside primariamente nos hepatócitos, podem não parecer concordar com tal hipótese. No entanto, deve-se lembrar do atual debate sobre se os macrófagos, além dos hepatócitos, são infectados pelo vírus da hepatite C, como revisado por Heydtmann.³⁵ Além disso, a hepatite autoimune tipo 1, em que se demonstrou reatividade ACPA artrite-independente,³⁴ associa-se à ativação de macrófagos tanto no estágio precoce quanto no fibrótico mais tardio.³⁷

Este estudo mostrou que pacientes sudaneses infectados com *L. donovani* apresentam semelhanças sorológicas com pacientes com AR do Sudão e de outros locais. Além de níveis elevados de ICC e FR, pela primeira vez demonstramos reatividade para o alvo ACPA CCP2, um achado comumente considerado altamente específico de AR. Essa reatividade ACPA, ao contrário do que ocorre com pacientes com AR, não depende de citrulinização do antígeno-alvo, e pode estar associada à intensa ativação do sistema macrofágico. Nossos resultados, assim como os resultados prévios,^{21,24} reforçam a importância da inclusão apropriada de ensaios-controle quando da definição de reatividades ACPA em novos grupos de pacientes, especialmente em coortes de pacientes não reumáticos.

REFERENCES

REFERÊNCIAS

- Winchester RJ, Agnello V, Kunkel HG. Gamma globulin complexes in synovial fluids of patients with rheumatoid arthritis. Partial characterization and relationship to lowered complement levels. *Clin Exp Immunol* 1970; 6(5):689–706.
- Estes D, Christian CL. The natural history of systemic lupus erythematosus by prospective analysis. *Medicine (Baltimore)* 1971; 50(2):85–95.
- Bunim JJ, Buchanan WW, Wertke PT, Sokoloff L, Bloch KJ, Beck JS *et al*. Clinical, pathologic, and serologic studies in Sjogren's syndrome; Combined Clinical Staff Conference at the National Institutes of Health. *Ann Intern Med* 1964; 61:509–30.
- Dresner E, Trombly P. The latex-fixation reaction in nonrheumatic diseases. *N Engl J Med* 1959; 201:981–8.
- Schellekens GA, Visser H, de Jong BA, van den Hoogen FH, Hazes JM, Breedveld FC *et al*. The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. *Arthritis Rheum* 2000; 43(1):155–63.
- Mathsson Lampa J, Mullazehi M, Rönnelid J. Immune complexes from rheumatoid arthritis synovial fluid induce FcγRIIa dependent and rheumatoid factor correlated production of tumour necrosis factor-α by peripheral blood mononuclear cells. *Arthritis Res Ther* 2006; 8(3):R64.
- Newkirk MM. Rheumatoid factors: host resistance or autoimmunity? *Clin Immunol* 2002; 104(1):1–13.
- Dörner T, Egerer K, Feist E, Burmester GR. Rheumatoid factor revisited. *Curr Opin Rheumatol* 2004; 16(3):246–53.
- Carvalho EM, Andrew BS, Martinelli R, Dutra M, Rocha H. Circulating immune complexes and rheumatoid factor in schistosomiasis and visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 1983; 32(1):61–8.
- Galvão-Castro B, Sá Ferreira JA, Marzochi KF, Marzochi MC, Coutinho SG, Lambert PH. Polyclonal B cell activation, circulating immune complexes and autoimmunity in human American visceral leishmaniasis. *Clin Exp Immunol* 1984; 56(1):58–66.
- Kager PA, Hack CE, Hannema AJ, Rees PH, von dem Borne AE. High C1q levels, low C1s/C1q ratios, and high levels of circulating immune complexes in kala-azar. *Clin Immunol Immunopathol* 1982; 23(1):86–93.
- Kharazmi A, Rezai HR, Fani M, Behforouz NC. Evidence for the presence of circulating immune complexes in serum and C3b and C3d on red cells of kala-azar patients. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1982; 76(6):793–6.
- Makni S, Ayed K, Ben Said M, Ben Rachid MS. Study of circulating immune complexes during the evolution of visceral Mediterranean leishmaniasis. *Ann Trop Med Parasitol* 1989; 83(4):349–55.
- Pearson RD, de Alencar JE, Romito R, Naidu TG, Young AC, Davis JS 4th. Circulating immune complexes and rheumatoid factors in visceral leishmaniasis. *J Infect Dis* 1983; 147(6):1102.
- Sehgal S, Aikat BK, Pathania AG. Immune complexes in Indian kala-azar. *Bull World Health Organ* 1982; 60(6):945–50.
- Elshafie A, Ahlin E, Mathsson L, Elghazali G, Rönnelid J. Circulating immune complexes (IC) and IC-induced levels of GM-CSF are increased in Sudanese patients with acute visceral *Leishmania donovani* infection undergoing sodium stibogluconate treatment: implications for disease pathogenesis. *J Immunol* 2007; 178(8):5383–9.

17. Makrygiannakis D, af Klint E, Lundberg IE, Löfberg R, Ulfgrén AK, Klareskog L *et al.* Citrullination is an inflammation-dependent process. *Ann Rheum Dis* 2006; 65(9):1219–22.
18. Rönnelid J, Wick MC, Lampa J, Lindblad S, Nordmark B, Klareskog L *et al.* Longitudinal analysis of anti-citrullinated protein/peptide antibodies (anti-CP) during 5-year follow-up in early rheumatoid arthritis: anti-CP status is a stable phenotype that predicts worse disease activity and greater radiological progression. *Ann Rheum Dis* 2005; 64(12):1744–9.
19. Kroot EJ, de Jong BA, van Leeuwen MA, Swinkels H, van den Hoogen FH, van't Hof M *et al.* The prognostic value of anti-cyclic citrullinated peptide antibody in patients with recent-onset rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000; 43(8):1831–5.
20. Kallberg H, Padyukov L, Plenge RM, Rönnelid J, Gregersen PK, van der Helm-van Mil AH *et al.* Gene-gene and gene-environment interactions involving HLA-DRB1, PTPN22, and smoking in two subsets of rheumatoid arthritis. *Am J Hum Genet* 2007; 80(5):867–75.
21. Kakumanu P, Yamagata H, Sobel ES, Reeves WH, Chan EK, Satoh M. Patients with pulmonary tuberculosis are frequently positive for anti-cyclic citrullinated peptide antibodies, but their sera also react with unmodified arginine-containing peptide. *Arthritis Rheum* 2008; 58(6):1576–81.
22. Bassyouni IH, Ezzat Y, Hamdy S, Talaat RM. Clinical significance of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in Egyptian patients with chronic hepatitis C virus genotype IV infection. *Clin Chem Lab Med* 2009; 47(7):842–7.
23. Orge E, Cefle A, Yazici A, Gurel-Polat N, Hulagu S. The positivity of rheumatoid factor and anti-cyclic citrullinated peptide antibody in non-arthritis patients with chronic hepatitis C infection. *Rheumatol Int* 2010; 30(4):485–8.
24. Vannini A, Cheung K, Fusconi M, Stammen-Vogelzangs J, Drenth JP, Dall'Aglio AC *et al.* Anti-cyclic citrullinated peptide positivity in non-rheumatoid arthritis disease samples: citrulline-dependent or not? *Ann Rheum Dis* 2007; 66(4):511–6.
25. Elkayam O, Segal R, Lidgi M, Caspi D. Positive anti-cyclic citrullinated proteins and rheumatoid factor during active lung tuberculosis. *Ann Rheum Dis* 2005; 65(8):1110–2.
26. Mathsson L, Mullazehi M, Wick MC, Sjoberg O, van Vollenhoven R, Klareskog L *et al.* Antibodies against citrullinated vimentin in rheumatoid arthritis: higher sensitivity and extended prognostic value concerning future radiographic progression as compared with antibodies against cyclic citrullinated peptides. *Arthritis Rheum* 2008; 58(1):36–45.
27. Mahdi H, Fisher BA, Kallberg H, Plant D, Malmström V, Rönnelid J *et al.* Specific interaction between genotype, smoking and autoimmunity to citrullinated alpha-enolase in the etiology of rheumatoid arthritis. *Nat Genet* 2009; 41(12):1319–24.
28. Hoogstra H, Heyneman D. Leishmaniasis in Sudan Republic. Final epidemiologic report. *Am J Trop Med Hyg* 1969; 18:1091–7.
29. Arnett FC, Edworthy SM, Block DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS *et al.* The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988; 31(3):315–24.
30. Atta AM, Carvalho EM, Jerônimo SM, Sousa Atta ML. Serum markers of rheumatoid arthritis in visceral leishmaniasis: rheumatoid factor and anti-cyclic citrullinated peptide antibody. *J Autoimmun* 2007; 28(1):55–8.
31. Klareskog L, Stolt P, Lundberg K, Källberg H, Bengtsson C, Grunewald J *et al.* A new model for an etiology of rheumatoid arthritis: smoking may trigger HLA-DR (shared epitope)-restricted immune reactions to auto-antigens modified by citrullination. *Arthritis Rheum* 2006; 54(1):38–46.
32. Lundberg K, Kallberg H, Fisher BA, Wegner N, Wait R, Charles P *et al.* Antibodies to citrullinated alpha-enolase peptide 1 are specific for rheumatoid arthritis and cross-react with bacterial enolase. *Arthritis Rheum* 2008; 58(10):3009–19.
33. Wegner N, Wait R, Sroka A, Eick S, Nguyen KA, Lundberg K *et al.* Peptidylarginine deiminase from *Porphyromonas gingivalis* citrullinates human fibrinogen and alpha-enolase: Implications for autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2010; 62(9):2662–72.
34. Wener MH, Hutchinson K, Morishima C, Gretsch DR. Absence of antibodies to cyclic citrullinated peptide in sera of patients with hepatitis C virus infection and cryoglobulinemia. *Arthritis Rheum* 2004; 50(7):2305–8.
35. Heydtmann M. Macrophages in hepatitis B and hepatitis C virus infections. *J Virol* 2009; 83(7):2796–802.
36. Tsirikoni A, Kyriakou DS, Rigopoulou EI, Alexandrakis MG, Zachou K, Passam F *et al.* Markers of cell activation and apoptosis in bone marrow mononuclear cells of patients with autoimmune hepatitis type 1 and primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 2005; 42(3):393–9.
37. Heymann F, Trautwein C, Tacke F. Monocytes and macrophages as cellular targets in liver fibrosis. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2009; 8(4):307–18.

Editorial nota de preocupação

Na edição de dezembro de 2011, a Revista Brasileira de Reumatologia (RBR) publicou o artigo: "Anticorpos anti- peptídeo citrulinado e fator reumatóide em pacientes sudaneses com infecção por *Leishmania donovani*" por E. Ahlin, A. Elshafie, Nur M., SH El Safi, R. Johan, e G. Elghazali. [Revista Brasileira de Reumatologia 51, 6 (2011)]. Em Janeiro de 2012, a RBR recebeu uma reclamação de um dos autores, questionando a autoria do autor correspondente, e informado de que o artigo estava sob a submissão a outro periódico, por E. Ahlin, Al Elshafie, M.A.M. Nur, e J. Ronnelid. Esta submissão está em espera, sendo que todos os autores foram informados sobre a reclamação e que o caso foi submetido ao Comitê de Ética de Publicação (COPE), que sugeriram algumas recomendações. A investigação ainda não chegou a uma conclusão final. Enquanto se aguardam os resultados das investigações, a RBR está publicando este editorial de nota de preocupação com intuito de alertar os nossos leitores para o fato de que questões sérias foram levantadas sobre a autoria do artigo de autoria de Ahlin E et al.

Paulo Louzada-Junior Max Victor Carioca Freitas

Editores da Revista Brasileira de Reumatologia

ARTIGO RETRATADO