

Ausência de anticorpos antilipoproteína lipase na doença de Behçet

Jozélio Freire de Carvalho¹, Vilma Santos Trindade Viana¹, Cleonice Bueno², Célio Roberto Gonçalves³, Eloísa Bonfá⁴

RESUMO

Objetivo: A recente descrição de anticorpos antilipoproteína lipase (anti-LPL) associados à dislipoproteinemia levou-nos a analisar sua presença e possível associação com achados clínicos e laboratoriais em pacientes com doença de Behçet. **Pacientes e Métodos:** Trinta e oito pacientes consecutivos com doença de Behçet [critérios do Grupo de Estudos Internacional em Doença de Behçet (*International Study Group on Behçet's Disease - ISGBD*)] foram testados para a presença de anticorpos anti-LPL através da técnica de ELISA. Foi realizada avaliação clínica e laboratorial, incluindo perfil lipídico de jejum, pesquisa de autoanticorpos e marcadores inflamatórios (PCR, VHS) na inclusão dos pacientes. Os critérios de exclusão foram quaisquer condição que afetassem o perfil lipídico. **Resultados:** A média de idade foi de 42 ± 9 anos, sendo 68% do sexo feminino e 68% da cor branca. O tempo médio de duração da doença foi de $9,8 \pm 7,5$ anos. Vinte e nove por cento dos pacientes apresentaram história de trombose. Os níveis de PCR estavam elevados em 31% dos pacientes e VHS aumentada foi detectada em 31%, com níveis médios de $5,95 \pm 10,3$ mcg/mL e $14,5 \pm 13,2$ mm/1ª hora, respectivamente. Cerca de 47% dos pacientes estavam tomando prednisona, com dose média de $7,6 \pm 10,8$ mg/dia. Quanto aos níveis de risco cardiovascular da NCEP/ATPIII, colesterol elevado foi verificado em 26%, triglicerídeos em 18%, HDL baixo em 15% e elevado LDL em 25% dos pacientes com Behçet. Os níveis médios de CT foram 198 ± 48 mg/dL, de triglicerídeos 121 ± 61 mg/dL, HDL $52,4 \pm 14,7$ mg/dL e LDL 119 ± 35 mg/dL. Anticorpos anti-LPL do subtipo IgG foram detectados em 0/30 pacientes com Behçet. **Conclusão:** Esses dados aqui apresentados corroboram uma ausência de ligação entre inflamação, resposta imunológica e dislipoproteinemia nos pacientes com doença de Behçet e sugerem que outros mecanismos estão associados à dislipidemia vista nestes pacientes.

Palavras-chaves: doença de Behçet, vasculites, lipoproteína lipase, autoanticorpos, aterosclerose, lipoproteínas, inflamação.

INTRODUÇÃO

A lipoproteína lipase (LPL) é um componente da família de lipases com função conhecida de hidrolisar moléculas de triglicerídeos encontradas nas partículas das lipoproteínas.¹ Os seus reguladores fisiológicos incluem os próprios triglicerídeos e a apolipoproteína apo C-II que aumentam a atividade enzimática da LPL e a apo C-III que a inibe.¹

A descrição da importante redução da atividade da LPL em pacientes com LES² levou à hipótese de que essa inibição foi uma consequência de uma condição inflamatória inibitória ou mesmo de um efeito de modulação por um autoanticorpo.

De fato, essa última condição foi reforçada por uma recente descrição de uma elevada frequência de anticorpos contra a lipoproteína lipase no LES, apresentando uma correlação positiva com os níveis de triglicerídeos.^{2,3} Esses anticorpos têm sido descritos também em outras doenças reumatológicas, incluindo artrite reumatoide e esclerose sistêmica (ES).⁴

É razoável especular que os mesmos fatores de risco observados em pacientes com LES podem também estar presentes nos indivíduos com doença de Behçet. O presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a presença de anticorpos contra LPL e sua possível associação clínica com variáveis clínicas e laboratoriais dessa doença.

Recebido em 28/02/2009. Aprovado, após revisão, em 19/05/2009. Os autores declaram ter recebido suporte financeiro dos fundos remanescentes da Sociedade Brasileira de Reumatologia, da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP # 02/03867-0, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq # 304756/2003-2 (para Eloísa Bonfá) e Federico Foundation (para Jozélio Freire de Carvalho e Eloísa Bonfá).

1. Chefe do Laboratório de Imunologia Humoral-LIM17-FMUSP

2. Pesquisadora do LIM17-FMUSP

3. Médico Assistente

4. Professora Titular

Endereço para correspondência: Dr. Jozélio F. Carvalho. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Disciplina de Reumatologia. Av. Dr. Arnaldo 455, 3º andar, Sala 3133. São Paulo – SP – Brasil. CEP: 01246-903. Fax: (11) 3066-7490. E-mail: jotafc@gmail.com

PACIENTES E MÉTODOS

Pacientes: Trinta e oito pacientes com doença de Behçet (DB) foram selecionados entre aqueles atendidos no Ambulatório de Doença de Behçet do Serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo no período de junho de 2001 a dezembro de 2003. Todos os pacientes preenchem os critérios do *International Study Group for Behçet Disease* (ISGBD).⁵ Os pacientes foram clinicamente avaliados e seus prontuários médicos foram extensivamente revisados. Os critérios de exclusão foram a presença de evidências clínicas e/ou bioquímicas de diabetes melito, doenças do fígado e da tireoide, insuficiência renal, síndrome nefrótica, história prévia ou atual de uso de álcool, hipolipemiantes e menopausa. Todos os pacientes tinham idade abaixo dos 50 anos, creatinina sérica < 1,5 mg/dL e menos do que 1,0 g/L/dia de proteinúria.⁶⁻⁸ Os indivíduos que estivessem em uso de medicações que pudessem interferir com o perfil lipídico, tal como estatinas e fibratos, foram também excluídos. Nenhuma paciente estava grávida ou menopausada na ocasião do estudo. As amostras de soro foram obtidas na inclusão do estudo. O Comitê de Ética local aprovou o estudo sob o nº 814/01 e todos os participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

Avaliação laboratorial: Análise imunológica e bioquímica foi realizada nas amostras de soros obtidos depois de um período de jejum de 12 horas. Todos os pacientes encontravam-se sob sua dieta regular.

Ensaio para a detecção dos anticorpos contra a lipoproteína lipase (LPL): A reatividade do isotipo IgG anti-LPL foi mensurada por ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*). Brevemente, os poços das placas de polistireno da marca *Costar*[®] foram sensibilizados *overnight* com LPL comercialmente disponível originada de leite bovino (5 mg/mL) (Sigma Chem Co. St Louis, MO, USA). Os ensaios foram realizados com amostras de soros diluídos 1/100 em salina tamponada com Tris contendo soro bovino adulto. Anticorpos anti-LPL do isotipo IgG foram detectados com anticorpos de cabra anti-IgG humana conjugados com fosfatase alcalina (Sigma Chem Co. St Louis, MO, USA). A reação foi desenvolvida com p-nitrofenil fosfato e a densidade óptica (DO) foi lida em um comprimento de onda de 405 nm através do espectrofotômetro Labsystems Multiskan MS (Helsinki, Finland). Os resultados positivos foram definidos se os valores da amostra fossem > 3 desvios-padrão (DP) acima da média da DO de 20 amostras de soros de controles saudáveis incluídas em cada ensaio.²

Perfil lipídico: O colesterol total (CT) e os triglicerídeos (TG) das amostras de soro foram medidos enzimaticamente

(Boehringer-Mannheim, Argentina e Merck, Alemanha, respectivamente) em um aparelho RA 1000 Analyser (Technicon Instruments Corp).^{9,10} O colesterol da lipoproteína de alta densidade (HDL-c) foi obtido após precipitação do colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL-c) do soro e do colesterol da lipoproteína de baixa densidade (LDL-c) através do ácido fosfotúngstico e cloreto de magnésio.¹¹ VLDL-c e LDL-c foram estimados desde que todas as amostras tinham níveis de triglicerídeos menores do que 400 mg/dL.¹² Os níveis de VLDL-c foram calculados usando a relação níveis de triglicerídeos/5 (TG/5) (34) e os níveis de LDL-c foram estimados usando a seguinte equação:¹² $CT = HDL-c + TG/5 + LDL-c$. Os níveis de risco cardiovascular foram determinados de acordo com o National Cholesterol Education Program - Adult Treatment Panel III (NCEP/ATPIII), sendo assim considerados: CT maior que 200 mg/dL, TG maior que 150 mg/dL, HDL-c menor que 40 mg/dL e LDL-c maior do que 130 mg/dL.¹³

Marcadores inflamatórios: A proteína C-reativa (PCR) e os níveis séricos totais de gamaglobulina de todos os pacientes foram determinados através da nefelometria e do perfil de eletroforese das proteínas do soro, respectivamente. A velocidade de hemossedimentação (VHS) foi avaliada usando o método de Westergren.

Análise estatística: a estatística descritiva foi utilizada na realização deste estudo. Os resultados são apresentados como média ± DP e porcentagem.

RESULTADOS

Os pacientes com DB (n = 38) tiveram uma média de idade de 42 ± 9 anos, sendo 68% do sexo feminino e 68% da cor branca. A duração média da doença foi de $9,8 \pm 7,5$ anos. Cerca de 47% estavam em uso de prednisona, mas com uma dose baixa diária ($7,6 \pm 10,8$ mg/dia) (Tabela 1).

Os níveis médios de colesterol total foram de 198 ± 48 mg/dL, de triglicerídeos 121 ± 61 mg/dL, HDL $52,4 \pm 14,7$ mg/dL e LDL 119 ± 35 mg/dL. Níveis de moderado/alto risco cardiovascular de acordo com NCEP/ATPIII foram observados nesses pacientes devido a alto colesterol total em 26% (n = 14), baixo HDL-c em 15% (n = 5), alto LDL-c em 25% (n = 16) e elevados níveis de triglicerídeos em 18% (n = 13) (Tabela 2).

Não foram detectados anticorpos anti-LPL mensurados pela técnica de ELISA nos pacientes com doença de Behçet.

Pacientes com DB exibiram alteração dos marcadores inflamatórios e tiveram uma média de PCR de $5,95 \pm 10,3$ mcg/m e VHS dentro da normalidade, com níveis médios de $14,5 \pm 13,2$ mm/1^a hora. Adicionalmente, aumento dos níveis de PCR foi observado em 31% dos pacientes e VHS aumentada também foi detectada em 31% (Tabela 3).

DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo mostraram que pacientes com doença de Behçet não apresentam anticorpos contra a lipoproteína lipase, apesar de uma parte desses indivíduos ter pelo menos um lipídio como nível de risco de doença cardiovascular.

Neste estudo temos apenas selecionado pacientes que preenchiam os critérios internacionais para o diagnóstico de DB.⁵ De forma bastante importante, em nosso estudo, os rigorosos critérios de inclusão e exclusão utilizados para selecionar os pacientes com DB forneceram uma oportunidade única para definir mais acuradamente que a alteração do perfil lipídico deva-se de fato à própria DB. Então, drogas e comorbidades tais como diabetes, obesidade, doenças da tireoide, menopausa, insuficiência renal, síndrome nefrótica foram critérios de exclusão desde que estes são fatores conhecidos capazes de interferir no metabolismo lipídico.⁶⁻⁸

A análise do perfil lipídico mostrou que nos pacientes com doença de Behçet, os lipídios apresentavam níveis de risco de doenças cardiovasculares, devido à total elevado colesterol, LDL-c elevado e triglicerídeos elevados e baixo HDL-c. Estes achados foram semelhantes aos encontrados em doenças inflamatórias crônicas associadas com aterosclerose,^{14,15} como o lúpus eritematoso sistêmico. Nesse contexto, a lipoproteína lipase (LPL), o antígeno alvo para o anticorpo aqui estudado, é sabido facilitar o metabolismo de lipoproteínas plasmáticas e é a principal enzima responsável pela hidrólise dos triglicerídeos circulantes.¹ A sua atividade enzimática prejudicada está diretamente envolvida no desenvolvimento de hipertrigliceridemia e esta tem um papel reconhecido no processo aterosclerótico.¹

Os autoanticorpos contra a LPL têm sido implicados nos mecanismos de aterosclerose no LES e outras doenças inflamatórias autoimunes, tais como a artrite reumatoide e esclerose sistêmica.²⁻⁴ Estes anticorpos foram estreitamente associados à elevação dos níveis de triglicerídeos no LES e esclerodermia e um putativo papel funcional de anti-LPL nestas doenças provinha da observação de que a fração de IgG anti-LPL da paciente esclerodérmica positiva e com triglicerídeos elevados de soro foi capaz de inibir significativamente *in vitro* a atividade enzimática.⁴ Além disso, os estudos anteriores têm demonstrado que pacientes lúpicos ativos apresentam uma forte correlação entre anti-LPL circulantes e marcadores inflamatórios, principalmente a PCR.²

Apesar da presença de elevados níveis dos marcadores inflamatórios, bem como de perfil lipídico alterado nos pacientes com DB, a ausência de reatividade à LPL sugere que os anticorpos anti-LPL não estão implicados no ativo permanente complexo processo de inflamação vascular causando danos em

Tabela 1. Achados demográficos e uso de corticoide dos 38 pacientes com doença de Behçet

	BEHÇET (n = 38)
Média de idade (anos)	42 ± 9
Sexo feminino (%)	68%
Cor branca (%)	68%
Duração de doença (anos)	9,8 ± 7,5
Uso de prednisona (%)	47%
Dose média de prednisona (mg/dia)	7,6 ± 10,8

Os valores são expressos em média ± DP ou percentagem (%).

Tabela 2. Valores de lipoproteínas e níveis de risco (de acordo com NCEP/ATPIII) nos 38 pacientes com doença de Behçet

	BEHÇET (n = 38)
CT (mg/dL)	198 ± 48
HDL-c (mg/dL)	52,4 ± 14,7
LDL-c (mg/dL)	119 ± 35
TG (mg/dL)	121 ± 61
CT > 200 mg/dL (%)	26,3
HDL-c < 40 mg/dL (%)	15,8
LDL-c > 130 mg/dL (%)	23,6
TG > 150 mg/dL (%)	18,4

Os valores são expressos em média ± DP ou percentagem (%). CT = colesterol total; HDL-c = *high density lipoprotein cholesterol* (lipoproteína do colesterol de alta densidade); LDL-c = *low density lipoprotein cholesterol* (lipoproteína do colesterol de baixa densidade); TG = triglicerídeos.

Tabela 3. Marcadores inflamatórios nos 38 pacientes com doença de Behçet

	BEHÇET (n = 38)
PCR (mcg/mL)	5,95 ± 10,3
VHS (mm/1ª hora)	14,5 ± 13,2
CRP > 5 mcg/mL (%)	31,6
VHS > 25 mm/1ª hora (%)	31,5

Os valores são expressos em média ± DP ou percentagem (%). PCR = proteína C-reativa; VHS = velocidade de hemossedimentação.

pacientes com esta doença. Neste aspecto, é razoável especular que os processos inflamatórios e a dislipidemia que ocorrem na DB e nas doenças sistêmicas do tecido conjuntivo (LES e ES) podem refletir diversos mecanismos patogênicos.¹⁶ De fato, vasculites sistêmicas são bem conhecidas por serem condições pauci-imunes.

Os dados do presente estudo são conclusivos em demonstrar que os anticorpos anti-LPL parecem não estar implicados na fisiopatologia do processo inflamatório aterosclerótico da doença de Behçet.

REFERÊNCIAS

REFERENCES

1. Korn ED. Clearing factor, a heparin-activated lipoprotein lipase. I. Isolation and characterization of the enzyme from normal rat heart. *J Biol Chem* 1955; 215:1-14.
2. de Carvalho JF, Borba EF, Viana VS *et al.* Antilipoprotein lipase antibodies: a new player in the complex atherosclerotic process in systemic lupus erythematosus? *Arthritis Rheum* 2004; 50:3610-15.
3. Reichlin M, Fesmire J, Quintero-Del-Rio AI, Wolfson-Reichlin M. Autoantibodies to lipoprotein lipase and dyslipidemia in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2002; 46:2957-63.
4. Kodera M, Hayakawa I, Komura K *et al.* Anti-lipoprotein lipase antibody in systemic sclerosis: association with elevated serum triglyceride concentrations. *J Rheumatol* 2005; 32:629-36.

5. Criteria for diagnosis of Behçet's disease. International Study Group for Behçet's Disease. *Lancet* 1990; 335:1078-80.
6. Attman PO, Alaupovic P. Lipid and apolipoprotein profiles of uremic dyslipoproteinemia – relation to renal function and dialysis. *Nephron* 1991; 57:401-10.
7. Brown WV. Lipoprotein disorders in diabetes mellitus. *Med Clin North Am* 1994; 78:143-61.
8. Thompson GR, Soutar AK, Spengel FA *et al.* Defects of receptor-mediated low density lipoprotein catabolism in homozygous familial hypercholesterolemia and hypothyroidism in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78:2591–5.
9. Siedel J, Hägele EO, Zielgenhorn J, Wahlefeld AW. Reagent for the enzymatic determination of serum total cholesterol with improved lipolytic efficiency. *Clin Chem* 1983; 29:1075-80.
10. Fossati P, Prencipe L. Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. *Clin Chem* 1982; 28:2077-80.
11. Warnick GR, Cheung NC, Albers JJ. Comparison of current methods for high density lipoprotein cholesterol quantification. *Clin Chem* 1979; 25:596-604.
12. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972; 18:499-502.
13. Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001; 285:2486-96.
14. Zinger H, Sherer Y, Shoenfeld Y. Atherosclerosis in Autoimmune Rheumatic Diseases-Mechanisms and Clinical Findings. *Clin Rev Allergy Immunol* 2008; 8[Epub ahead of print].
15. Salmon JE, Roman MJ. Subclinical atherosclerosis in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Am J Med* 2008; 121:S3-8.
16. Kao AH, Sabatine JM, Manzi S. Update on vascular disease in systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol* 2003; 15:519-27