

INFECÇÃO PELO VÍRUS EPSTEIN-BARR EM PACIENTES COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO

SAMUEL KOSMINSKY*, RENATA CARNEIRO DE MENEZES; MARIA ROSÂNGELA CUNHA DUARTE COELHO

Trabalho realizado no ambulatório de Reumatologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco e no Setor de Virologia do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Recife, PE

RESUMO

OBJETIVO. Verificar a associação entre a atividade do lúpus eritematoso sistêmico (LES) e a avides das imunoglobulinas IgG anti-EBV.

MÉTODOS Analisou-se o sangue periférico de 66 pacientes distribuídos em dois grupos: 22 pacientes com LES em atividade e 44 pacientes com doença inativa. A presença e o índice de avides de anticorpos IgG anti-EBV foram determinados pela técnica ELISA. (Enzygnost anti-EBV - Dade Behring).

RESULTADOS. Identificou-se positividade no teste de detecção de IgG para EBV em 21 (95,5%) pacientes do grupo LES ativo e em 40 (90,9%) do grupo LES inativo. O índice de avides alcançou valores 40 em 54 (88,5%) pacientes, sendo 34 (85%) do grupo LES inativo e 20 (95,2%) do grupo LES ativo; em cinco (12,5%) pacientes do grupo LES inativo, este índice ficou entre 20 e 40 e foi inferior a 20 em dois (3,3%) pacientes. Adotando-se 20, 30 ou 40 como ponto de corte do índice de avides, para diagnóstico de reativação da infecção por EBV, foram classificados como infecção reativada, nos grupos LES ativo e inativo, respectivamente: 1 (4,8%) x 5 (12,5%) pacientes, 1 (4,8%) x 4 (10%) pacientes e 1 (4,8%) x 5 (12,5%) pacientes.

CONCLUSÃO. No presente estudo, não foi demonstrada associação entre a atividade do LES e a reativação do EBV. Esse fato parece indicar que a não eliminação dos linfócitos B infectados se deve à falha no mecanismo de apoptose ou à ação de linfócitos T citotóxicos, permitindo assim a progressão do LES.

UNITERMOS: Lúpus eritematoso sistêmico. SLEDAI. Vírus Epstein-Barr. ELISA. Auto-anticorpos.

*Correspondência:

Rua Manoel Lubambo, 118,
Afogados, CEP: 50850-040,
Recife, PE
Tel/Fax - (81) 3428-1928
rcoelho@lika.ufpe.br

INTRODUÇÃO

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença auto-imune de etiologia desconhecida, na qual os auto-anticorpos encontram-se universalmente presentes. Os mecanismos responsáveis pela produção e pela perpetuação desta resposta imune aberrante permanecem pouco esclarecidos¹. A doença apresenta distribuição universal, acomete todas as classes sociais e sua incidência varia entre 2 e 8 por 100.000 habitantes para os Estados Unidos e entre 20 e 60 casos por 100.000 habitantes na Europa, não diferindo entre a população urbana e rural².

O LES tem como características epidemiológicas a predominância de acometimento de indivíduos do sexo feminino (cerca de 90% dos casos), maior incidência entre 15 e 45 anos de idade, comprometimento mais grave da raça negra. Sua etiologia é variada, estando incluídas alterações imunológicas acarretando a produção de auto-anticorpos, ação de fatores genéticos, fatores ambientais (vírus, radiação ultravioleta, drogas), fisiológicos (hormônios) e o stress³.

Dentre os prováveis fatores etiológicos ou etiopatogênicos do LES, a infecção viral tem sido largamente estudada. Os vírus desempenham um papel importante nas doenças auto-imunes, sendo o vírus *Epstein Barr* (EBV) um dos mais freqüentemente citados como desencadeante ou agravante das alterações auto-imunes⁴.

O EBV pertence à família *Herpesviridae*, e é o agente etiológico da mononucleose infecciosa. O ciclo viral, no interior do hospedeiro, inclui um período de latência, em cujo estado pode permanecer anos, e outro de replicação, no qual pode emergir em quantidade suficiente para causar estimulação do sistema imune⁵.

O antígeno nuclear I do EBV (EBNA-I) é a mais importante proteína viral expressa no interior dos linfócitos B durante o período de latência, o que torna estas células indetectáveis pelos linfócitos T citotóxicos⁶. Este mecanismo explicaria como o vírus pode permanecer no interior das células, sem o devido reconhecimento pelo sistema imune, que só ocorre quando o EBNA-I, no citoplasma dos linfócitos B, se associa a moléculas de histocompatibilidade celular (MHC) classe I e se apresenta na superfície celular aos linfócitos T citotóxicos. Apesar desta propriedade evasiva, o EBNA-I é o alvo mais comum da resposta imune humoral. Anticorpos dirigidos contra esta proteína podem reagir de forma cruzada com proteínas humanas⁷ e parecem desempenhar um importante papel nas doenças auto-imunes⁸.

A associação entre infecção pelo EBV e LES tem sido descrita por diferentes autores, bem como a reação cruzada de anticorpos contra constituintes protéicos virais e humanos⁹. A suspeita de tal associação foi reforçada pelo achado de altos títulos de anticorpos anti-EBV em pacientes com LES¹⁰, assim como pela constatação de que a

infecção pelo EBV antecede o aparecimento das alterações auto-imunes, que ocorrem no LES⁸.

Auto-anticorpos dirigidos contra as proteínas que compõem o spliceossomo, como a anti-Sm e anti-RNP, são encontrados no soro de 30% a 50% dos pacientes com LES¹¹. Anticorpos produzidos contra a EBNA-1 podem reagir de forma cruzada nestes pacientes, em decorrência da semelhança antigênica entre peptídeos virais e peptídeos do núcleo celular contidos nos spliceossoma, como a proteína Sm¹².

Essa semelhança antigênica explica como uma infecção viral pode ser o gatilho inicial das manifestações clínicas e imunológicas do LES¹. Dessa forma, ressalta-se a relevância do presente estudo, que busca analisar a associação da presença e da avidéz de anticorpos anti-EBV com a atividade do LES.

CASUÍSTICA

Os pacientes foram selecionados consecutivamente no ambulatório de Reumatologia do HC-UFPE, onde encontram-se cadastrados aproximadamente 200 pacientes lúpicos, no período de janeiro de 2002 a fevereiro de 2003. Foram incluídos pacientes portadores de LES de ambos os sexos, com 18 anos de idade ou mais e que preenchessem pelo menos quatro dos 11 critérios de classificação propostos pelo Colégio Americano de Reumatologia (*American College of Rheumatology - ACR*)¹³.

Todos os pacientes foram classificados como ativo ou inativo, de acordo com o índice de atividade da doença pelo *Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index - SLEDAI*¹⁴, avaliado no momento da coleta do sangue para os exames. Pacientes com LES em atividade (SLEDAI > 4) foram incluídos no grupo LES ativo e os com doença inativa (SLEDAI ≤ 4) no grupo LES inativo.

Foram considerados critérios de exclusão a negatividade e os títulos indeterminados pelo método ELISA para anticorpos IgG anti-EBV.

Todos os pacientes foram esclarecidos sobre os objetivos da pesquisa, seus riscos e benefícios, enfatizando-se seus direitos em participar ou não. Para os que concordaram, foi solicitada assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HC-UFPE.

MÉTODOS

Os exames foram realizados no Setor de Virologia do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA). Cada participante do estudo foi submetido a venopunção para coleta de 5 mL de sangue venoso, em tubo de ensaio 13x100mm, seco, tipo Vacutainer®. As amostras foram imediatamente submetidas a centrifugação a 1500 rpm durante 10 minutos, e os soros, assim obtidos, acondicionados em tubos Eppendorf, devidamente identificados com o nome de cada paciente e número seqüencial da amostra. As alíquotas de soro foram estocadas a -20°C até a realização dos testes sorológicos para determinar a presença dos anticorpos IgG anti-EBV e o índice de avidéz destes anticorpos Enzygnost® (Dade Behring, GMBH, Marburg, Germany).

A interpretação dos resultados se baseou no coeficiente de extinção, calculado pela fórmula 1: $\Delta E = E_{\text{antígeno}} - E_{\text{antígeno de controle}}$. Os coeficientes de extinção foram convertidos em atividade imunológica

Quadro 1 – Interpretação dos resultados do teste de ELISA para infecção por EBV

$\Delta E_{\text{amostra}}$	Interpretação clínica
$\Delta E_{\text{amostra}} < 0,10$	anti-EBV IgG negativo
$0,10 < \Delta E_{\text{amostra}} < 0,20$	anti-EBV IgG indeterminado
$\Delta E_{\text{amostra}} \geq 0,20$	anti-EBV IgG positivo

Tabela 1 – Distribuição de resultados da primeira fase do teste de detecção de IgG anti-EBV de 66 pacientes portadores de lúpus eritematoso sistêmico, segundo os grupos LES ativo e LES inativo

Teste de detecção de IgG anti-EBV (1ª fase)	Grupo de pacientes				Total
	LES ativo		LES inativo		
	n	%	n	%	
positivo	21	95,5	40	90,9	61
negativo	1	4,5	1	2,3	2
indeterminado	-	-	3	6,8	3
Total	22	100,0	44	100,0	66

Nota: Este agrupamento impossibilita teste estatístico porque há 62,5% das casas com frequência esperada inferior a cinco

do anticorpo anti-EBV utilizando a correção do ΔE , para cada amostra, segundo a fórmula 2: $\log 10 \text{ U/ml} = \alpha \cdot \Delta E$, onde: α e β são constantes que variam com o lote do kit e estão expressas na embalagem. Os resultados foram interpretados conforme consta no Quadro 1.

A porcentagem de anticorpos de alta avidéz, não deslocáveis, permite concluir sobre a resposta imunológica do paciente frente ao EBV. Dessa forma, comparou-se a densidade óptica do teste de ELISA com a do teste utilizando uréia (teste de avidéz por meio da razão de coeficientes de extinção), expressa na fórmula 3:

Os dados foram organizados e processados por meio do programa EPI-INFO, versão 6.04. Para a análise estatística utilizou-se o teste Qui-quadrado (χ^2) de homogeneidade e contingência, assim como o teste Exato de Fisher, para pequenas amostras, ambos ao nível de significância de 0,05.

RESULTADOS

Na primeira fase do teste de detecção de IgG para EBV, 61 (92,4%) dos 66 pacientes estudados apresentaram resultado positivo, dois (3%) foram negativos, sendo um (4,5%) do grupo LES ativo e um (2,3%) do grupo LES inativo, e três (4,5%) foram considerados indeterminados, todos do grupo LES inativo (Tabela 1).

Os resultados dos índices de avidéz de 61 pacientes com positividade no teste de detecção de IgG para EBV mostraram que 54 (88,5%) apresentaram valores iguais ou superiores a 40, dos quais 34 (63%) eram do grupo LES inativo e 20 (95,2%) tinham lúpus eritematoso em atividade. Em cinco (8,2%) pacientes, o índice

Tabela 2 – Distribuição dos índices de avidéz de anticorpos de 61 pacientes portadores de lúpus eritematoso sistêmico, segundo os grupos LES ativo e LES inativo

Classes de índice de avidéz de anticorpos	Grupo de pacientes				Total
	LES ativo		LES inativo		
	n	%	n	%	
< 20	1	4,8	1	2,5	2
20 - 40	-	-	5	12,5	5
≥ 40	20	95,2	34	85,0	54
Total	21	100,0	40	100,0	61

Nota: Foram excluídos: três pacientes com DO, cujo valor não permitiu concluir pela positividade ou negatividade do EBV; e dois pacientes com testes imunológicos negativos na primeira fase. $\chi^2=2,41$, $p=0,30$

esteve entre 20 e 40, sendo todos do grupo LES inativo, e em 2 (3,3%) foi inferior a 20 (Tabela 2).

Tomando 20 como valor de ponto de corte, identificou-se que dois (3,3%) pacientes tinham diagnóstico de infecção por EBV reativada, sendo um (4,8%) do grupo LES ativo e um (2,5%) do grupo LES inativo.

Ao adotar 30 por valor de ponto de corte, cinco (8,2%) pacientes foram diagnosticados como portadores de infecção por EBV reativada, dos quais um (4,8%) integrava o grupo LES ativo e quatro (10,0%), o grupo LES inativo.

Alterando o ponto de corte para o valor 40, o número de pacientes diagnosticados como infecção por EBV reativada no grupo LES inativo aumentou para cinco (12,5%), mantendo-se igual a um (4,8%) no grupo LES ativo, totalizando seis (9,8%) diagnósticos de infecção reativada, dentre os 61 pacientes estudados.

DISCUSSÃO

Escolheu-se estudar o EBV em pacientes com LES devido a sua alta prevalência na população em geral e, em especial, nesses pacientes, devido a sua latência e suas exacerbações de forma espontânea em indivíduos infectados¹⁵.

O encontro de alta prevalência de anticorpos anti-EBV, na amostra lúpica do presente estudo, sugeriu, como em outras pesquisas^{16,17}, a importância desse vírus como um dos agentes etiológicos do LES. Como o LES é uma doença auto-imune, de etiologia multifatorial, na qual ocorrem as mais diversas alterações imunológicas e clínicas^{5,18}, a comprovação de que o EBV poderia atuar como gatilho no seu desenvolvimento traria uma contribuição importante para o melhor entendimento do papel desse agente infeccioso na etiopatogênese do LES. Poder-se-á estar complementando os artigos que, embora investiguem a presença do EBV em LES, não classificam esta última como ativa ou inativa.

Durante a evolução do LES, pode ocorrer uma série de alterações imunológicas que favorecem o agravamento da enfermidade⁵. Como não é possível determinar quando tais exacerbações ocorrerão, buscou-se relacionar esse evento com o ciclo viral (latência ou replicação) no interior dos linfócitos B circulantes de

pacientes com LES. Isto foi feito por meio da análise da avidéz dos anticorpos de classe IgG no soro desses pacientes.

No presente trabalho, a prevalência do EBV foi alta tanto no grupo LES ativo como no grupo LES inativo, resultado este semelhante aos encontrados na literatura¹⁷.

Apesar de não ter sido possível demonstrar associação entre a atividade do EBV e a do LES, existem, na literatura, relatos de associação da atividade deste vírus com o LES¹⁷ e com outras doenças auto-imunes, especialmente a esclerose múltipla, na qual foi demonstrada nítida correlação entre a sua exacerbação e o período de replicação viral^{18,19}.

Com a finalidade de aprofundar o verdadeiro papel do vírus como desencadeador do LES, buscou-se estabelecer o índice de avidéz do anticorpo IgG anti-EBV, uma vez que, dependendo do resultado encontrado, poder-se-ia afirmar se, no momento da pesquisa, a doença encontrava-se ativa ou inativa.

Houve positividade de anticorpos anti-EBV em todos os pacientes estudados, entretanto esteve ausente diferença de avidéz desses anticorpos nos grupos de pacientes com LES ativo e inativo. A falta de associação entre avidéz dos anticorpos e ativação ou inativação do lúpus, constatada neste estudo, pode ter sido causada por problemas de ordem metodológica, como o pequeno tamanho da amostra, ou a limitação do teste de avidéz. No entanto, poderia também estar indicando uma falha da hipótese inicial, isto é, a sintomatologia do LES poderia independe do número de partículas virais livres circulantes, fato que poderia ser viável considerando a característica do EBV localizar-se nos linfócitos B e neles permanecer como hospedeiro. Caso isso ocorresse, a associação a ser pesquisada seria entre carga viral do EBV no interior das células mononucleares e LES, independentemente da sintomatologia.

Foi o trabalho de Moon et al.²⁰, publicado em 2004, que permitiu compreender os resultados de avidéz do estudo atual, ao confirmarem que pacientes com LES têm uma carga viral 15 vezes maior de EBV que os controle normais, dentro das células B, sugerindo que essa infecção é anormalmente controlada nos portadores de lúpus eritematoso sistêmico. A falta de associação entre SLEDAI e avidéz é a corroboração do trabalho destes autores.

Feitas essas ponderações, o presente trabalho pode ser considerado inovador por correlacionar, pela primeira vez, a afinidade dos anticorpos anti-EBV em pacientes com LES e a atividade da doença por meio do SLEDAI.

Constatou-se que a modificação do ponto de corte não alterou a distribuição dos pacientes do grupo LES ativo, mas o fez no grupo LES inativo. Não houve diferença estatisticamente significante em qualquer dos pontos de corte.

CONCLUSÃO

Não ter sido possível demonstrar, no presente trabalho, associação entre a reativação viral e exacerbação do LES corroborou relatos semelhantes na literatura consultada. Este fato parece indicar a não eliminação dos linfócitos B entre infectados por falha no mecanismo de apoptose ou na ação de linfócitos T citotóxicos permitindo a progressão do LES.

Conflito de interesse: não há

SUMMARY

EPSTEIN-BARR VIRUS INFECTION IN PATIENTS WITH SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS

OBJECTIVE. To verify the association of SLE activity to the avidity of IgG anti-EBV immune globulins.

METHODS. Peripheral blood of 66 patients was analyzed, 22 had active SLE and 44 had inactive SLE. Presence and avidity index of IgG anti-EBV antibodies were determined by the ELISA method (Enzygnost® anti-EBV/IgG - Dade Behring).

RESULTS. IgG anti-EBV test was positive for 21 (95.5%) patients in the active SLE group and 40 (90.9%) in the inactive group. The avidity index was 40 for 54 (88.5%) patients of which 34 (85%) belonged to the inactive SLE group and 20 (95.2%) to the active group. For 5 (12.5%) inactive SLE patients, the avidity index reached values ranging from 20 to 40; while for only 2 (3.3%) patients this index was lower than 20. Adopting 20, 30 or 40 as a cutoff point of the avidity index for diagnosis of reactivation of the EBV infection, the author classified as having reactivated infection, for active and inactive SLE groups, respectively: 1 (4.8%) x 1 (2.5%) patient; 1 (4.8%) x 4 (10%) patients and 1 (4.8%) x 5 (12.5%) patients.

CONCLUSION. Association between EBV activity and SLE was not demonstrated. This appears to indicate that persistence of infected B lymphocytes may be due to failure in the apoptosis mechanism or to the action of T cytotoxic lymphocytes, permitting evolution of SLE. [Rev Assoc Med Bras 2006; 52(5): 352-5]

KEY WORDS: Systemic Lupus Erythematosus. SLEDAI. Epstein-Barr virus. ELISA. Autoantibodies.

REFERÊNCIAS

1. James JA, Neas BR, Moser KL, Hall T, Bruner GR, Sestak AL, et al. Systemic lupus erythematosus in adults is associated with previous Epstein-Barr virus exposure. *Arthritis Rheum* 2001;44(5):1122-6.
2. Jacobson DL, Gange SJ, Rose NR, Graham NMH. Epidemiology and estimated population burden of selected autoimmune diseases in the United States. *Clin Immunol Immunopathol* 1997;84(2):223-43.
3. Phalen MKF. Progress on lupus: new clarity for a baffling disease. *E Mednews* [on line] 2002 [cited 2003 may 22]. Available from: http://www.amea-assn.org/sci-pubs/amnews/pick_02/hlsa100.htm.
4. Verdolini R, Bugatti L, Giangiacomi M, Nicolini M, Filosa G, Cerio R. Systemic lupus erythematosus induced by Epstein-Barr virus infection. *Br J Dermatol* 2002;146(5):877-881.

5. McClain MT, Rapp EC, Harley JB, James JA. Infectious mononucleosis patients temporarily recognize a unique, cross-reactive epitope of Epstein-Barr virus nuclear antigen-1. *J Med Virol* 2003;70(2):253-257.
6. Levitskaya J, Coram M, Levitsky V. Inhibition of antigen processing by the internal repeat region of the Epstein-Barr virus nuclear antigen-1. *Nature* 1995;375(7):685-8.
7. Vaughan JH. The Epstein-Barr virus and systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 1997; 100(12):2939-40.
8. Ascherio A, Munger KL, Lennette ET, Spiegelman D, Hernan MA, Olek MJ, et al. Epstein-Barr virus antibodies and risk of multiple sclerosis: a prospective study. *JAMA* 2001;286(24):3083-8.
9. Katz BZ, Salim IB, Kim S, Nsiah-Kumi P, Weinel W. Epstein-Barr virus burden in adolescents with systemic lupus erythematosus. *Pediatr Infect Dis J* 2001;20(2):148-53.
10. Origgi L, Perego R, Hu C, Bertetti E, D'agostino P, Asero R et al. Anti-Epstein-Barr virus antibodies in systemic lupus erythematosus. *Boll Ist Sieroter Milan* 1988;67(2):116-22.
11. Harley JB, James JA. Autoepitopes in lupus. *J Lab Clin Med* 1995;126(6):509-516.
12. Vaughan JH, Nguyen D, Valbracht JR, Patrick K, Rhodes GH. Epstein-Barr virus-induced autoimmune responses. II Immunoglobulin G autoantibodies to mimicking and non mimicking epitopes. Presence in autoimmune disease. *J Clin Invest* 1995;95(11):1316-27.
13. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1998;40(9):1725.
14. Bombardier C, Gladman DD, Urowitz MB. The development and validation of the SLE disease activity index. *Arthritis Rheum* 1992;35(5):630-40.
15. Wilson DA, Morgan AJ. Primary immune responses by cord blood CD4+ T cells and NK cells inhibit Epstein-Barr virus B-cell transformation in vitro. *J Virol* 2002;6(10):5071-81.
16. Kang I, Quan T, Nolasco H, Park SH, Hong MS, Crouch J, et al. Defective control of latent Epstein-Barr virus infection in systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 2004;173(12):1287-1294.
17. Huggins ML, Todd I, Powell RJ. Reactivation of Epstein-Barr virus in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int* 2005;25(3):183-7.
18. Swaak GJA, Tosi S, Mosca M. Systemic lupus erythematosus: clinical features in patients with a disease duration of over 10 years: first evaluation. *Br Soc Rheumatol* 1999;38(9):953-8.
19. Wandinger KP, Jabs W, Siekhaus A, Bubel S, Trillenber P, Wagner HJ, et al. Association between clinical disease activity and Epstein-Barr virus reactivation in MS. *Neurology* 2000;55(2):178-84.

Artigo recebido: 16/06/2005
 Aceito para publicação: 06/03/2006
