

LEANDRO LARA DO PRADO

**Avaliação dos anticorpos anti-alfa-enolase na
doença de Behçet como marcador de atividade**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciências

Programa de Ortopedia e Traumatologia

Orientadora: Profa. Dra. Eloisa Silva Dutra de
Oliveira Bonfa

**SÃO PAULO
2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Prado, Leandro Lara do
Avaliação dos anticorpos anti-alfa-enolase na
doença de Behçet como marcador de atividade / Leandro
Lara do Prado. -- São Paulo, 2018.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Ortopedia e Traumatologia.
Orientadora: Eloisa Silva Dutra de Oliveira
Bonfa.

Descritores: 1.Síndrome de Behçet 2.Diagnóstico
3.Biomarcadores 4.Autoanticorpos 5.Fosfopiruvato
hidratase

USP/FM/DBD-110/18

Responsável: Kátia Maria Bruno Ferreira - CRB-8/6008

Dedico esta tese:

Aos meus pais, Guaracy e Botelho, exemplos de vida, amor e carinho, sempre incentivando a busca por conhecimento.

Ao meu irmão, Laurence, primeiro parceiro da vida, ídolo e fã incondicional.

A minha esposa, Mismam, pelo imenso amor, admiração, cumplicidade e companheirismo na realização de sonhos.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, Profa. Dra. Eloisa Silva Dutra de Oliveira Bonfa, pelos ensinamentos e constante incentivo para a pesquisa. Pela sua grande capacidade de liderança, valorizando o crescimento dos membros da Disciplina de Reumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, da qual tenho orgulho em pertencer.

A minha coorientadora, Dra. Carla Gonçalves Schahin Saad, pela dedicação em todas as etapas desta tese, desempenhando um papel chave com brilhantismo, contudo sempre generosa ao compartilhar seu conhecimento.

Ao mestre Dr. Celio Roberto Gonçalves, idealizador deste trabalho e fonte do meu interesse na doença de Behçet, justamente por inspirar em seus alunos a paixão pelo raciocínio clínico, fundamental no exercício da medicina. Muito obrigado pela oportunidade de seguir seus passos e receber seus conselhos.

Ao amigo Dr. Mauricio Levy-Neto, professor e colega nesta jornada, pelos seus ensinamentos valiosos e vasta experiência, compartilhados de uma forma leve e amistosa. Agradeço também pelos conselhos na banca de qualificação desta tese.

Ao amigo-irmão, Dr. Kristopherson Lustosa Augusto, pelo estímulo na elaboração deste estudo, pela sua generosidade em vários momentos decisivos e pela amizade e convivência destes anos.

Aos Doutores Samuel Katsuyuki Shinjo e Alexandre Wagner Silva de Souza, que também compuseram minha banca de qualificação, pelas contribuições relevantes e enriquecedoras para a tese.

A Dra. Vilma Trindade Viana, Elaine Pires Leon e toda a equipe do Laboratório de Investigação Médica (LIM-17) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela elaboração e execução das análises laboratoriais desta pesquisa, fundamentais para o resultado obtido.

Aos médicos assistentes da Disciplina de Reumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, especialmente aos colegas do Centro de Dispensação de Medicamentos de Alta Complexidade (CEDMAC) e dos Ambulatórios de Espondiloartrites e Doença de Behçet, por todo o apoio, amizade e incentivo na rotina de trabalho.

A equipe do CEDMAC (enfermagem e secretaria), pelo grande auxílio no recrutamento dos pacientes e coleta das amostras deste estudo.

As secretárias da Disciplina de Reumatologia: Cristina, Cláudia, Marta e Mayra, pela constante disposição em ajudar nas mais diversas situações.

A todos os pacientes, motivo da realização desta pesquisa, pela confiança depositada em nosso trabalho.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação.
Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias.

Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentações; 2011.

Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas

Resumo

Abstract

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	4
3	MÉTODOS	6
3.1	Pacientes.....	7
3.2	Desenho do Estudo	7
3.3	Avaliação Clínica	8
3.4	Avaliação Laboratorial	8
3.5	Análise Estatística	9
4	RESULTADOS.....	10
4.1	Características Demográficas e Clínicas na Primeira Avaliação	11
4.2	Análise Laboratorial na Primeira Avaliação	12
4.3	Segunda Avaliação no Grupo DB.....	14
5	DISCUSSÃO	16
6	CONCLUSÕES	20
7	ANEXOS	22
8	REFERÊNCIAS.....	28

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAAE	-	Anticorpos anti-alfa-enolase
AACE	-	Anticorpos anti-células endoteliais
BDAI	-	<i>Behçet's Disease Activity Index</i>
BDCAF	-	<i>Behçet's Disease Current Activity Form</i>
BR-BDCAF	-	Formulário de Atividade Atual da Doença de Behçet
DB	-	Doença de Behçet
DC	-	Doença de Crohn
EA	-	Enteroartrite
HBI	-	Índice de Harvey-Bradshaw
PCR	-	Proteína-C-reativa
RCU	-	Retocolite ulcerativa
VPN	-	Valor preditivo negativo
VPP	-	Valor preditivo positivo

RESUMO

Prado LL. *Avaliação dos anticorpos anti-alfa-enolase na doença de Behçet como marcador de atividade* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

Objetivo: este estudo objetivou avaliar a presença do anticorpo anti-alfa-enolase (AAAE) IgM na doença de Behçet (DB) e suas possíveis associações com as manifestações clínicas e atividade da doença. Métodos: noventa e sete pacientes com DB foram comparados a 36 pacientes com enteroartrite (EA) [24 com doença de Crohn (DC) e 12 com retocolite ulcerativa (RCU)], além de 87 controles saudáveis. Os testes para detecção do AAAE IgM foram realizados por *Immunoblotting*. A atividade de doença foi avaliada por índices padronizados, como o Formulário de Atividade Atual da Doença de Behçet (BR-BDCAF) para os pacientes com DB e o Índice de *Harvey-Bradshaw* (HBI) para os pacientes com DC e RCU. Uma segunda avaliação foi realizada somente nos pacientes com DB (n=56) para a detecção do AAAE IgM, avaliação de atividade de doença e dosagem de proteína-C-reativa (PCR). Resultados: maior prevalência do AAAE IgM foi encontrada na DB (17,7%) comparativamente à EA (2,8%) e aos controles saudáveis (2,3%), $p < 0,001$. A frequência do AAAE IgM foi maior na DB ativa quando comparada à DB inativa (30,2% vs. 7,4%, $p = 0,006$). Este achado foi confirmado em uma segunda avaliação de 56 pacientes do grupo com DB (45,5% vs. 13,3%, $p = 0,02$). A média do BR-BDCAF foi maior no grupo com AAAE IgM positivo, em ambas avaliações ($9,1 \pm 5,4$ vs. $4,9 \pm 4,9$, $p = 0,002$; $5,0 \pm 4,9$ vs. $2,2 \pm 2,9$, $p = 0,01$, respectivamente). Os pacientes com DB em atividade mucocutânea e articular apresentaram maior incidência do AAAE IgM, tanto na primeira quanto na segunda avaliação (64,7% vs. 27,5%, $p = 0,005$; 36,4% vs. 7,1%, $p = 0,039$, respectivamente). Conclusões: os presentes dados corroboram que a alfa-enolase é um antígeno alvo na DB, particularmente associada à atividade mucocutânea e articular da doença. Além disso, o AAAE IgM pode distinguir a DB da EA, especialmente em pacientes com alta atividade de doença.

Descritores: síndrome de Behçet; diagnóstico; biomarcadores; autoanticorpos; fosfopiruvato hidratase

ABSTRACT

Prado LL. *Anti-alpha-enolase antibodies evaluation in Behçet's disease as a marker of disease activity* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2018.

Objective: this study aimed to assess IgM AAEA in systemic Behçet's disease (BD) and its possible association with clinical manifestations and disease activity. Methods: ninety-seven consecutively selected BD patients were compared to 36 enteropathic spondyloarthritis (ESpA) [24 Crohn's disease (CD) and 12 ulcerative colitis (UC)] patients and 87 healthy controls. IgM AAEA was detected by Immunoblotting. Disease activity was assessed by standardized indexes, Brazilian BD Current Activity Form (BR-BDCAF) for BD and Harvey-Bradshaw Index (HBI) for CD and UC patients. A second evaluation was performed in BD patients (n=56), regarding IgM AAEA presence, disease activity scores and C-reactive protein (CRP). Results: higher IgM AAEA prevalence was found in BD (17.7%) compared to ESpA (2.8%) and healthy controls (2.3%), $p < 0.001$. IgM AAEA frequency was higher in active BD compared to inactive BD (30.2% vs. 7.4%, $p = 0.006$), a finding confirmed in the second cross-sectional evaluation of 56 of these BD patients (45.5% vs. 13.3%, $p = 0.02$). Mean BR-BDCAF scores were higher in IgM AAEA positive group on both evaluations (9.1 ± 5.4 vs. 4.9 ± 4.9 , $p = 0.002$; 5.0 ± 4.9 vs. 2.2 ± 2.9 , $p = 0.01$, respectively). BD patients with mucocutaneous and articular symptoms presented higher IgM AAEA positivity in the first and second evaluations (64.7% vs. 27.5%, $p = 0.005$; 36.4% vs. 7.1%, $p = 0.039$ respectively). Conclusions: these data support the notion that alpha-enolase is a target antigen in BD, particularly associated with disease activity, mucocutaneous and articular involvement. In addition, IgM AAEA may distinguish BD from ESpA, especially in patients with high disease activity.

Descriptors: Behcet syndrome; diagnosis; biomarkers; autoantibodies; phosphopyruvate hydratase

1 INTRODUÇÃO

A doença de Behçet (DB) é uma síndrome multissistêmica, na qual os critérios diagnósticos atuais são baseados apenas em características clínicas, sem biomarcadores específicos, levando a dificuldade no diagnóstico diferencial com outras condições, particularmente as doenças inflamatórias intestinais¹⁻³.

Os anticorpos anticélulas endoteliais (AAE) são um grupo heterogêneo de anticorpos contra proteínas de superfície das células endoteliais. AAE foram descritos em várias doenças imunomediadas, bem como em amostras de soro de pacientes com DB⁴.

A alfa-enolase foi descrita como um alvo antigênico dos AAE do tipo IgM no soro de pacientes com DB⁵, porém o significado clínico deste antígeno ainda está indefinido. O anticorpo anti-alfa-enolase (AAE) IgM apresenta especificidade moderada para DB quanto comparado a outras doenças reumáticas (artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistêmico e granulomatose com poliangiíte)⁶. Além disso, foi descrita uma maior prevalência de lesões vasculares em pacientes com presença de AAE⁷.

Por outro lado, Shin *et al.*⁸ detectaram AAE IgM em pacientes com DB com acometimento intestinal isolado e associou a presença deste anticorpo com maior atividade de doença neste órgão-alvo. Ao mesmo tempo, observaram uma fraca correlação entre a presença do AAE IgM e o

Harvey-Bradshaw Index (HBI), índice comumente utilizado para a avaliação da atividade da doença de Crohn (DC)⁸. Entretanto, não há dados sobre a positividade do AAE IgM na DB ativa utilizando índices de atividade estabelecidos para esta síndrome, como o *Behçet's Disease Current Activity Form* (BDCAF)⁹.

2 OBJETIVOS

a) Avaliar a presença do AAAE IgM na DB, comparativamente às enteroartrites (EA) e controles saudáveis.

b) Avaliar a associação deste biomarcador com as características clínicas da DB.

c) Avaliar a associação deste biomarcador com a atividade sistêmica da DB.

3 MÉTODOS

3.1 Pacientes

Este estudo transversal unicêntrico foi realizado nos ambulatórios de espondiloartrites e DB de um hospital terciário. Foram selecionados 133 pacientes consecutivamente, de ambos os gêneros, sendo 97 pacientes com DB, preenchendo os critérios diagnósticos de DB da *International Study Group for Behçet's Disease*¹⁰, além de 36 pacientes com EA, incluindo 24 pacientes com DC e 12 indivíduos com retocolite ulcerativa (RCU). Os pacientes com EA preenchem os critérios de classificação do *European Spondylarthropathy Study Group* (ESSG)¹¹. Oitenta e sete indivíduos saudáveis pareados para idade e gênero com os pacientes com DB foram selecionados como grupo controle.

3.2 Desenho do Estudo

Este estudo compreende: 1) uma avaliação transversal, que comparou 97 pacientes com DB, 36 pacientes com EA e 87 controles saudáveis no início do estudo. 2) uma avaliação complementar de seguimento, incluindo 56 dos 97 pacientes com DB.

Todos os indivíduos selecionados concordaram em participar do estudo e assinaram o consentimento informado (Anexo A), de acordo com a Declaração de Helsinque, previamente aprovada pelo Comitê de Ética local (CAPPesq numero 0180/11) (Anexo B).

3.3 Avaliação Clínica

Os dados foram obtidos por meio de pesquisa em prontuário eletrônico e entrevistas com os participantes, utilizando um formulário padronizado para coleta de dados, incluindo dados demográficos, clínicos, laboratoriais e de tratamento. Questionários padronizados e específicos para avaliar a atividade clínica das doenças foram aplicados a todos os pacientes.

Nos pacientes com DB foi aplicado o Formulário Brasileiro de Atividade Atual da Doença de Behçet (BR-BDCAF)¹² (Anexo C). Foi definida como DB ativa valores de BR-BDCAF maiores que 4. O Índice de *Harvey-Bradshaw*¹³ foi utilizado para avaliar os pacientes com doença de Crohn e retocolite ulcerativa. Cinquenta e seis pacientes com DB foram reavaliados em uma segunda visita após um intervalo mínimo de dois anos.

3.4 Avaliação Laboratorial

Todos os pacientes e controles coletaram amostras de soro na avaliação transversal e somente os pacientes com DB reavaliados longitudinalmente realizam a segunda coleta.

As amostras de soro foram coletadas após jejum de 12 horas e foram armazenadas à -80 °C para posterior análise.

Os AAAs IgM foram detectados por *immunoblotting*, utilizando um lisado celular transinfectado com alfa-enolase humana (*Santa Cruz Biotechnology, Inc.*, EUA) como antígeno e AAAs IgM e IgG (*Sigma-Aldrich*, EUA) como anticorpos secundários.

A proteína C-reativa (PCR) foi medida por nefelometria, em pacientes com DB e EA. Os níveis de PCR foram expressos em mg/L.

3.5 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada comparando os grupos de pacientes e controles saudáveis. As variáveis contínuas foram expressas como mediana \pm desvio-padrão (DP) e comparadas utilizando o Teste t de *Student* ou o teste de *Mann-Whitney* ao comparar dois grupos e os testes ANOVA / ANOVA *on ranks* para comparar mais de dois grupos, conforme apropriado. As variáveis categóricas foram apresentadas em percentuais e avaliadas por meio do Teste Exato de *Fisher* para dois grupos e Qui-quadrado em caso de mais de dois grupos, conforme apropriado. Um valor de p menor que 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

Também foram calculados sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) do biomarcador ao discriminar a atividade de doença da DB.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando os *softwares* *SigmaStat* versão 3.1 (2005) e *GraphPad*.

4 RESULTADOS

4.1 Características Demográficas e Clínicas na Primeira Avaliação

Os pacientes com DB, EA e os controles saudáveis eram comparáveis em relação à mediana de idade ($44,0 \pm 11,3$, $47,0 \pm 12,6$ e $45,0 \pm 10,4$ anos, $p = 0,313$, respectivamente) e prevalência do gênero feminino (74,2%, 77,7% e 78,1%; $p = 0,802$).

As características clínicas da primeira avaliação dos pacientes com DB estão resumidas na Tabela 1. A mediana de duração da doença foi de $11,0 \pm 8,2$ anos. As frequências das principais manifestações clínicas da DB foram: úlceras orais (100%), úlceras genitais (86,6%), lesões cutâneas (incluindo pseudofoliculite e eritema nodoso) (76,2%), doença ocular (49,4%), envolvimento vascular (28,8%), envolvimento neurológico (24,7%) e doença intestinal (12,3%). Na primeira avaliação, 44,3% dos pacientes apresentava doença ativa, com uma mediana do BR-BDCAF de $4,0 \pm 5,3$. Os principais sinais de atividade encontrados na primeira avaliação foram sintomas cutâneos (50,5%), articulares (58,8%) e oculares (7,2%). A atividade intestinal foi encontrada em apenas 2,3% dos casos e nenhum paciente apresentava atividade vascular ou neurológica.

Tabela 1 - Características clínicas do grupo com DB

Variáveis	
Idade, mediana \pm DP, anos	44,0 \pm 11,3
Tempo de doença, mediana \pm DP, anos	11,0 \pm 8,2
Gênero Feminino, % (n)	74,2% (72)
Doença ativa, % (n)	44,3% (43)
BR-BDCAF, mediana \pm DP	4,0 \pm 5,3
<i>História prévia das manifestações da DB</i>	
Úlceras orais, % (n)	100% (97)
Úlceras genitais, % (n)	86,6% (84)
Doença Ocular, % (n)	49,4% (48)
Cutânea, % (n)	76,2% (74)
Articular, % (n)	45,3% (44)
Vascular, % (n)	28,8% (28)
Neurológica, % (n)	24,7% (24)
Gastrointestinal, % (n)	12,3% (12)
<i>Sintomas clínicos na primeira avaliação</i>	
Cutâneo, % (n)	50,5% (49)
Articular, % (n)	58,8% (57)
Ocular, % (n)	7,2% (7)
Intestinal, % (n)	2,3% (2)
Neurológico, % (n)	0,0% (0)
Vascular, % (n)	0,0% (0)

BR-BDCAF: Formulário Brasileiro de Atividade Atual da doença de Behçet; DB: doença de Behçet; DP: desvio-padrão; n: número de pacientes.

4.2 Análise Laboratorial na Primeira Avaliação

A presença do AAAE IgM foi maior no grupo com DB quando comparado ao grupo EA e controles [17 (17,5%) vs. 1 (2,8%) vs. 2 (2,3%), respectivamente, $p < 0,001$].

O grupo de pacientes com DB foi classificado de acordo com o resultado do BR-BDCAF em DB ativa se > 4 e DB inativa se ≤ 4 . A frequência do AAAE IgM foi maior no grupo com DB ativa (30,2%), quando

comparada ao grupo com DB inativa (7,4%), $p = 0,006$. A mediana dos índices de BR-BDCAF foi maior no grupo AAAE IgM positivo ($7,5 \pm 5,4$ vs. $4,0 \pm 4,9$, $p = 0,002$), quando comparada ao grupo AAAE IgM negativo.

A mediana dos níveis da PCR nos pacientes com DB e EA foi comparável ($2,4 \pm 12,6$ vs. $6,3 \pm 8,9$ mg/L, $p = 0,211$). Comparando os grupos AAAE IgM positivo e negativo, a mediana dos níveis da PCR foi semelhante ($3,6 \pm 26,3$ vs. $2,1 \pm 7,2$ mg/L, $p = 0,07$).

Considerando a história de acometimento prévio pela DB, os grupos AAAE IgM positivo e negativo apresentaram frequências semelhantes de úlceras orais (100% vs. 100%, $p = 1,0$), úlceras genitais (82,4% vs. 87,5%, $p = 0,69$), eritema nodoso (58,8% vs. 52,5%, $p = 0,79$), pseudofoliculite (47,2% vs. 55%, $p = 0,6$), envolvimento ocular (41,2% vs. 51,3%, $p = 0,59$), envolvimento articular (41,2% vs. 46,3%, $p = 0,79$), doença intestinal (17,6% vs. 11,3%, $p = 0,43$), envolvimento vascular (35,3% vs. 27,5%, $p = 0,56$) e doença neurológica (23,5% vs. 25%, $p = 1,0$).

A avaliação das características clínicas da DB nas quatro semanas anteriores à análise laboratorial revelou que o grupo AAAE IgM positivo apresentou maior frequência de atividade articular (88,2% vs. 52,5%, $p = 0,006$) quando comparado ao grupo AAAE IgM negativo. Além disso, quando selecionados pacientes com atividade mucocutânea e articular concomitantes, foi evidenciada maior positividade de AAAE IgM neste grupo (64,7% vs. 27,5%, $p = 0,005$) (Tabela 2).

Tabela 2 - Positividade do AAE IgM de acordo com os parâmetros clínicos de atividade da DB

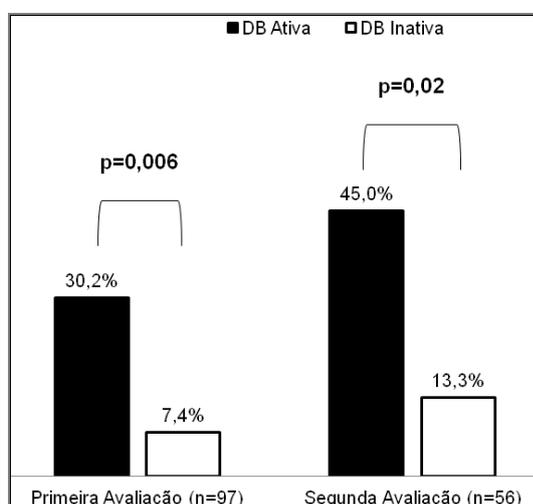
AAAE IgM	Primeira Avaliação		p	Segunda Avaliação		p
	n=97			n=56		
	Positivo n=17	Negativo n=80		Positivo n=11	Negativo n=45	
Doença Ativa	76,5%	37,5%	0,006	45,5%	13,3%	0,02
BR-BDCAF, mediana ± DP	7,5±5,4	4,0±4,9	0,002	3,5±4,9	1,0±2,9	0,01
PCR, mg/L, mediana ± DP	3,6±26,3	2,1±7,2	0,07	5,8±10,5	2,4±4,7	0,13
<i>Atividade Clínica</i>						
Mucocutânea, % (n)	70,6% (12)	46,3% (37)	0,1	54,5% (6)	40% (18)	0,5
Articular, % (n)	88,2% (15)	52,5% (42)	0,006	54,5% (6)	15,6% (7)	0,01
Mucocutânea e articular, % (n)	64,7% (11)	27,5% (22)	0,005	36,4% (4)	7,1% (4)	0,03
Ocular, % (n)	17,6% (3)	5% (4)	0,1	0% (0)	0% (0)	1,0

BR-BDCAF: Formulário Brasileiro de Atividade Atual da doença de Behçet; DB: doença de Behçet; DP: desvio-padrão; n: número de pacientes; PCR: proteína C-reativa.

4.3 Segunda Avaliação no Grupo DB

A segunda análise da frequência do AAE IgM foi realizada em 56 pacientes com DB pertencentes ao grupo transversal original, com uma mediana de intervalo de $26,6 \pm 1,8$ meses entre as duas avaliações. Esta análise também confirmou uma maior frequência de AAE IgM na DB ativa (45,5%) em comparação com a DB inativa (13,3%), $p = 0,02$ (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Frequência do AAE IgM na DB ativa versus DB inativa



Além disso, nesta segunda avaliação, a mediana dos índices de BR-BDCAF também foi maior no grupo AAAE IgM positivo comparado ao grupo AAAE IgM negativo ($3,5 \pm 4,9$ vs. $1,0 \pm 2,9$, $p = 0,01$).

A mediana dos níveis da PCR também foi semelhante nos grupos AAAE IgM positivo e negativo nesta avaliação ($5,8 \pm 10,5$ vs. $2,4 \pm 4,7$ mg/L, $p = 0,13$).

Em relação às manifestações clínicas, confirmamos a maior frequência de sintomas mucocutâneos e articulares no grupo AAAE IgM positivo (36,4% vs. 7,1%, $p = 0,039$), comparativamente ao grupo AAAE IgM negativo, conforme mostrado na Tabela 2.

Notavelmente, o AAAE IgM apresentou alta especificidade para a discriminação de atividade na DB, com valores de 92,6% e 86,7% na primeira e segunda avaliação, respectivamente. Do mesmo modo, o VPN foi de 62,5% na primeira avaliação e atingiu 86,7% na segunda avaliação. A sensibilidade e o VPP foram de 30,2% e 76,5% na primeira avaliação e 45,5% e 45,4% na segunda avaliação, respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3 - Sensibilidade, especificidade, VPP e VPN do AAAE IgM para discriminar DB ativa

	Primeira Avaliação		Segunda Avaliação	
	Valor	IC 95%	Valor	IC 95%
Sensibilidade	30,2%	17,2% a 46,1%	45,4%	16,7% a 76,6%
Especificidade	92,6%	82,1% a 97,9%	86,7%	73,2% a 94,9%
VPP	76,5%	50,1% a 93,2%	45,4%	16,7% a 76,6%
VPN	62,5%	50,9% a 73,1%	86,7%	73,2% a 94,9%

IC 95%: intervalo de confiança de 95%; VPN: valor preditivo negativo; VPP: valor preditivo positivo

5 DISCUSSÃO

O presente estudo encontrou uma alta prevalência de AAE IgM em pacientes com DB, particularmente em indivíduos com atividade mucocutânea e articular.

A avaliação simultânea da presença do AAE IgM em DB, DC e RCU confirmou observações prévias de coortes de países orientais, que reportaram uma frequência significativamente maior deste anticorpo na DB^{7,8} e enfatizou uma possível relevância deste biomarcador para ajudar a distinguir essas condições.

Além disso, validou-se a presente descoberta para uma população multiétnica, com baixa prevalência da DB, associada a menor frequência de envolvimento intestinal do que a relatada em coortes orientais, consistindo principalmente de casos esporádicos, com história familiar pouco frequente. Vale destacar que, na presente coorte, a predominância feminina observada (72,4%) se assemelha aos padrões de doença das áreas endêmicas, conforme descrito anteriormente pelo grupo deste estudo¹⁴, com frequência similar de manifestações sistêmicas relatadas em séries maiores¹⁵⁻¹⁷, como doença ocular (49,4%), envolvimento vascular (28,8%), envolvimento neurológico (24,7%) e doença intestinal (12,3%).

Correlacionando as manifestações clínicas à frequência do AAE IgM, demonstrou-se que a história prévia e o tipo de manifestação sistêmica

não influenciou a positividade do anticorpo. Entretanto, o AAAE IgM parece ser um marcador para a atividade da DB, particularmente associado ao acometimento mucocutâneo e articular.

Em relação ao possível papel patogênico da anti-alfa-enolase, evidências anteriores sugerem que a enzima alvo possui, além de função glicolítica inata, um papel relevante em vários processos biológicos e fisiopatológicos. De fato, esta enzima pode atuar como um receptor de plasminogênio em muitos tipos celulares e parece ser um marcador de estresse patológico¹⁸. Vale lembrar que a alfa-enolase foi descrita como um antígeno alvo em muitas doenças inflamatórias e imunomediadas, como artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistêmico, vasculites e esclerose sistêmica¹⁹. Da mesma forma, observou-se neste estudo uma alta prevalência de AAAE IgM em um subgrupo de pacientes com DB clinicamente ativa.

Esse achado pode ajudar no diagnóstico diferencial entre DB e EA. Ambas são patologias crônicas, passíveis de acometer indivíduos jovens, com curso clínico flutuante. A artrite é uma característica comum dessas condições, juntamente com úlceras orais, lesões cutâneas e manifestações intestinais. Na DB, os sintomas mucocutâneos são marcadores da atividade da doença e parecem estar associados em até 80% com o comprometimento articular^{20,21}. Os presentes achados corroboram com esta premissa, uma vez que o grupo com envolvimento mucocutâneo e articular apresentou maior positividade do AAAE IgM. Portanto, a presença do AAAE IgM pode ser útil para avaliar atividade na DB.

Deve-se destacar que o uso de um índice de atividade já estabelecido para avaliação da DB (BR-BDCAF), ao invés do HBI, comumente usado para a doença de Crohn, reforça o papel da alfa-enolase como possível antígeno-alvo para inflamação sistêmica em DB, não sendo restrito ao grupo com DB intestinal, conforme relatado anteriormente⁸. De fato, os valores do BR-BDCAF independem da atividade intestinal e a baixa frequência deste acometimento na população do presente estudo pode ter influenciado a ausência de associação entre atividade intestinal e positividade do AAE IgM.

O BR-BDCAF foi validado para o Português Brasileiro por Neves *et al.*¹², a partir da versão inglesa do BDCAF⁹ e avalia as quatro últimas semanas de sintomas. O *Behçet's Disease Activity Index* (BDAI)⁹ é um índice amplamente utilizado internacionalmente e semelhante ao BR-BDCAF, considerando a avaliação dos sintomas de atividade. No entanto, este último parece mais adequado para avaliar casos em que a intensidade dos sintomas mucocutâneos e articulares são manifestações relevantes, marcando de 0 a 4 pontos para cada sintoma, dependendo da intensidade¹². Tendo em vista este fato, com base nos dados coletados por meio do BR-BDCAF, aplicou-se o BDAI nesta população do estudo e, notavelmente, a associação entre a atividade da doença e positividade do anticorpo foi mantida, com maior pontuação média do BDAI no grupo AAE IgM positivo (dados não apresentados). Portanto, índices de atividade alternativos poderão ser utilizados em futuros estudos internacionais que avaliem a capacidade do AAE IgM em distinguir a atividade da DB.

6 CONCLUSÕES

a) A presença do AAAE IgM foi maior no grupo com DB quando comparado ao grupo EA e controles.

b) Os pacientes com DB AAAE IgM positivos e negativos apresentaram características clínicas semelhantes .

c) Os pacientes com DB do grupo AAAE IgM positivo apresentavam maior frequência de atividade mucocutânea e articular, comparativamente ao grupo AAAE IgM negativo.

Os dados do presente estudo suportam o valor da alfa-enolase como um antígeno-alvo na DB e sugerem que o AAAE IgM é um marcador sorológico de atividade nesta doença.

Estudos adicionais são necessários para confirmar a relevância deste anticorpo para discriminar DB da EA, particularmente em pacientes com alta atividade da doença.

7 ANEXOS

Anexo A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:
- DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M F
- DATA NASCIMENTO:/...../.....
- ENDEREÇO Nº APTO:
- BAIRRO: CIDADE
- CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)
2. RESPONSÁVEL LEGAL
- NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
- DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M F
- DATA NASCIMENTO:...../...../.....
- ENDEREÇO: Nº APTO:
- BAIRRO: CIDADE:
- CEP: TELEFONE: DDD (.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: **ANTICORPOS ANTI-SACCHAROMYCES CEREVISIAE (ASCA) E ANTI-CITOPLASMA DE NEUTRÓFILOS (ANCA) EM PACIENTES COM DOENÇA DE BEHÇET E ENTEROARTRITE DA DOENÇA DE CHRON**
- PESQUISADORES : Célio Roberto Gonçalves, Leandro Lara do Prado
- CARGO/FUNÇÃO: Prof Dr Associado, Médico Residente em Reumatologia
- INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 20383 (CRG), 127425 (LLP)
- UNIDADE DO HCFMUSP: Reumatologia
3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:
- RISCO MÍNIMO RISCO MÉDIO
- RISCO BAIXO RISCO MAIOR
4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 12 meses

- 1 – Você está sendo convidado a participar deste estudo, onde iremos avaliar se pacientes com a sua doença (**Doença de Behçet, Doença de Crohn ou Retocolite Ulcerativa**) possuem anticorpos específicos circulando no organismo, que podem estar relacionados ao desenvolvimento destas doenças;
- 2 – Serão colhidos exames de sangue para a realização dos testes laboratoriais;
- 3 – Existem mínimos riscos para o participante do estudo, como sangramentos e hematomas no local da coleta de sangue;
- 4 – A partir dos resultados desta pesquisa poderemos conhecer melhor a presença de alterações laboratoriais nestas duas doenças, que irão ajudar a realização de diagnósticos mais precisos, com maior rapidez e facilidade;
- 5 – Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o **Dr Célio Roberto Gonçalves**, que pode ser encontrado no endereço **Av. Dr. Arnaldo, 455, 3º andar - CEP: 05016-010, São Paulo-SP Telefone(s) 11-3061-7213**. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br;
- 6 – Você pode suspender a autorização a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;
- 7 – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente;
- 8 – Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.
- 9 – Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo, o participante tem direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas;
- 10 - Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo *Anticorpos Anti-Saccharomyces cerevisiae (ASCA) E Anticitoplasma de neutrófilos (ANCA) em pacientes com Doença de Behçet e Enteroartrite da Doença de Chron*

Eu discuti com o Dr **Célio Roberto Gonçalves e/ou Dr Leandro Lara do Prado** sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia ao acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal	Data ____ / ____ / ____
--	-------------------------

Assinatura da testemunha	Data ____ / ____ / ____
--------------------------	-------------------------

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo	Data ____ / ____ / ____
---------------------------------------	-------------------------

Anexo B - Aprovação do Comitê de Ética local (CAPPesq numero 0180/11)



APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 16/03/2011, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0108/11**, intitulado: **"ANTICORPOS ANTI-SACCHAROMYCES CEREVISIAE (ASCA) E ANTI-CITOPLASMA DE NEUTRÓFILOS (ANCA) EM PACIENTES COM DOENÇA DE BEHÇET E ENTEROARTRITE DA DOENÇA DE CHRON"** apresentado pelo Departamento de **CLÍNICA MÉDICA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **CÉLIO ROBERTO GONÇALVES**

Pesquisador (a) Executante: **LEANDRO LARA DO PRADO**

Co-autores: **CARLA GONÇALVES SCHAHIN SAAD**

CAPPesq, 17 de Março de 2011

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Anexo C - Formulário Brasileiro de Atividade Atual da Doença de Behçet (BR-BDCAF)

BR-BDCAF

Formulário de atividade atual da doença de Behçet (Brasil)

Escala de bem-estar na últimas 4 semanas
(Paciente deve marcar o rosto escolhido)

Escala de bem-estar hoje
(Paciente deve marcar o rosto escolhido)

DADOS CLÍNICOS *(faça as questões do item 2)*

ATIVIDADE	0	1	2	3	4
Fadiga (cansaço fora do normal)					
Cefaleia (dor de cabeça)					
Úlceras orais (boca)					
Úlceras genitais (região pênis/vagina)					
Lesões cutâneas (da pele)					
• Eritema nodoso ou tromboflebite superficial					
• Pústulas					
Articulações (juntas)					
• Artralgia (dor)					
• Artrite (inchaço quente)					

Gastrointestinal

- Náuseas, vômitos ou dor abdominal
- Diarreia com sangue

Ocular

Há atividade ocular? *(faça as questões do item 3)*

Índice de Oculopatia de Behçet *(preenchido por oftalmologista)*

() Sim () Não (0) (1) (2) (3)

SNC *(faça as questões do item 4)*

Há nova atividade em sistema nervoso central? () Sim () Não

(Se "sim", responder as questões abaixo)

Q1. () Sim () Não Q2. () Sim () Não Q3. () Sim () Não Q4. () Sim () Não Q5. () Sim () Não

Grandes vasos *(faça as questões do item 5)*

Há nova atividade em grandes vasos? () Sim () Não

(Se "sim", responder as questões abaixo)

Q1. () Sim () Não Q2. () Sim () Não Q3. () Sim () Não Q4. () Sim () Não

Atividade da Doença de Behçet nas últimas 4 semanas
(Impressão do médico)

Instruções

Sistema de pontuação do formulário de atividade

Toda pontuação depende dos sintomas presentes na últimas 4 semanas. Apenas os dados clínicos que o médico julga serem devidos à Doença de Behçet devem ser considerados.

(1) Para completar a escala de bem-estar na últimas 4 semanas, faça a seguinte pergunta ao paciente: "Aqui estão alguns rostos. Eles representam vários sentimentos, desde muito bem a muito mal-estar. Pensando apenas na sua Doença de Behçet, qual deles representa melhor como você vem se sentindo na últimas 4 semanas?"

Para completar a escala de bem-estar hoje, faça a seguinte pergunta ao paciente: "Aqui estão alguns rostos. Eles representam vários sentimentos, desde muito bem a muito mal-estar. Pensando apenas na sua Doença de Behçet, qual deles rostos representa melhor como você está se sentindo hoje?"

(2) Pontos para fadiga, cefaleia, úlceras orais, úlceras genitais, lesões cutâneas, sintomas articulares e sintomas gastrointestinais são baseados na duração dos sintomas (em semanas). Faça a seguinte pergunta, completando com o sintoma a ser avaliado, e marque o número correspondente de semanas:

"Nas últimas 4 semanas, durante quantas semanas no total você teve.....?"

0	Sem sintomas	
1	Sintomas durante 1 semana	(1-7 dias no total)
2	Sintomas durante 2 semanas	(8-14 dias no total)
3	Sintomas durante 3 semanas	(15-21 dias no total)
4	Sintomas durante 4 semanas	(22-28 dias no total)

(3) **Comprometimento ocular**

Atividade ocular pode estar presente se algum dos seguintes sintomas está presente:

(1) olho vermelho, (2) visão borrada, (3) dor ocular.

Faça então a seguinte pergunta (assinale na frase quais os sintomas presentes):

"Nas últimas 4 semanas você teve: olho vermelho (), dor no olho (), visão borrada ()?"

Se qualquer um desses sintomas estiver presentes ou se você acha que pode haver atividade ocular, encaminhe o paciente ao oftalmologista que o determinará o escore ocular (Índice de Oculopatia de Behçet).

(4) **Sistema nervoso central**

Faça então a seguinte pergunta (assinale na frase quais os sintomas presentes):

"Nas últimas 4 semanas você teve algum desmaio, perda da consciência e da visão (), dificuldade para falar ou ouvir (), enjoo em duplo (), fraqueza ou perda da sensibilidade no rosto, braço ou perna (), perda de memória () ou perda do equilíbrio ()?"

Se todas as respostas forem "não" as questões Q1 a Q5 serão consideradas negativas, caso contrário tente determinar o seguinte:

Q1. Há novos sinais ou sintomas compatíveis com comprometimento meníngeo?
 Q2. Há novos sinais ou sintomas compatíveis com comprometimento de par craniano?
 Q3. Há novos sinais ou sintomas compatíveis com comprometimento de tronco cerebral ou cerebelar?
 Q4. Há novos sinais ou sintomas compatíveis com comprometimento de hemisfério cerebral?
 Q5. Há novos sinais ou sintomas compatíveis com comprometimento da medula espinhal?

(5) **Grandes vasos**

Faça então a seguinte pergunta (assinale na frase quais os sintomas presentes):

"Nas últimas 4 semanas você teve dor no peito (), falta de ar (), tosse com sangue (), teve alguma dor (), inchaço ou descoloração de alguma parte do rosto (), braço () ou perna ()?"

Se todas as respostas forem "não" as questões Q1 a Q4 serão consideradas negativas, caso contrário tente determinar o seguinte:

Q1. Há novos sinais ou sintomas compatíveis com trombose venosa profunda periférica?
 Q2. Há novos sinais ou sintomas compatíveis com trombose venosa profunda central?
 Q3. Há novos sinais ou sintomas compatíveis com trombose arterial periférica ou aneurisma?
 Q4. Há novos sinais ou sintomas compatíveis com trombose arterial pulmonar ou aneurisma?

Figura 1. Versão brasileira do questionário para avaliação de atividade da DB (BR-BDCAF). As porções em destaque correspondem às questões sobre manifestações gerais, mucocutâneas e articulares da DB, nas quais se obtém boa confiabilidade de resultados. O conjunto destas questões produz um escore variável entre zero e 32, associado à atividade da doença.⁷

8 REFERÊNCIAS

1. Sakane T, Takeno M, Suzuki N, Inaba G. Behçet's disease. *N Engl J Med.* 1999;341(17):1284-9.
2. Yurdakul S, Hamuryudan V, Yazici H. Behçet syndrome. *Curr Opin Rheumatol.* 2004;16(1):38-42.
3. Bayraktar Y, Ozaslan E, Van Thiel DH. Gastrointestinal manifestations of Behcet's disease. *J Clin Gastroenterol.* 2000;30(2):144-54.
4. Aydınтуg AO, Tokgöz G, D'Cruz DP, Gürler A, Cervera R, Düzgün N, Atmaca LS, Khamashta MA, Hughes GR. Antibodies to endothelial cells in patients with Behçet's disease. *Clin Immunol Immunopathol.* 1993;67(2):157-62.
5. Lee KH, Chung HS, Kim HS, Oh SH, Ha MK, Baik JH, Lee S, Bang D. Human alpha-enolase from endothelial cells as a target antigen of anti-endothelial-cell antibody in Behçet's disease. *Arthritis Rheum.* 2003;48(7):2025-35.
6. Lee KH, Bang D, Choi ES, Chun WH, Lee ES, Lee S. Presence of circulating antibodies to a disease specific antigen on cultured human dermal microvascular endothelial cells in patients with Behçet's disease. *Arch Dermatol Res.* 1999;291(7-8):374-81.

7. Lee JH, Cho SB, Bang D, Oh SH, Ahn KJ, Kim J, Park YB, Lee SK, Lee KH et al. Human anti-alpha-enolase antibody in sera from patients with Behçet's disease and rheumatologic disorders. *Clin Exp Rheumatol*. 2009;27(2 Suppl 53):S63-6.
8. Shin SJ, Kim BC, Kim TI, Lee SK, Lee KH, Kim WH. Anti-alpha-enolase antibody as a serologic marker and its correlation with disease severity in intestinal Behçet's disease. *Dig Dis Sci*. 2011;56(3):812-8.
9. Bhakta BB, Brennan P, James TE, Chamberlain MA, Noble BA, Silman AJ. Behçet's disease: evaluation of a new instrument to measure clinical activity. *Rheumatology (Oxford)*. 1999;38(8):728-33.
10. International Study Group for Behçet's Disease. Criteria for diagnosis of Behçet's disease. *Lancet*. 1990;335(8697):1078-80.
11. Dougados M, van der Linden S, Juhlin R, Huitfeldt B, Amor B, Calin A, Cats A, Dijkmans B, Olivieri I, Paseri G, et al. The European Spondylarthropathy Study Group preliminary criteria for the classification of spondylarthropathy. *Arthritis Rheum*. 1991;34(10):1218-27.
12. Neves FS, Moraes JC, Kowalski SC, Goldenstein-Schainberg C, Lage LV, Gonçalves CR. Cross-cultural adaptation of the Behçet's Disease Current Activity Form (BDCAF) to Brazilian Portuguese language. *Clin Rheumatol*. 2007;26(8):1263-7.
13. Harvey RF, Bradshaw JM. A simple index of Crohn's-disease activity. *Lancet*. 1980;1(8167):514.

14. Calamia KT, Wilson FC, Icen M, Crowson CS, Gabriel SE, Kremers HM. Epidemiology and clinical characteristics of Behçet's disease in the US: a population-based study. *Arthritis Rheum.* 2009;61(5):600-4.
15. Neves FS, Caldas CA, Lage LV, Goldenstein-Schainberg C, Gonçalves CR. Faraway from the silk route: demographic and clinical features of Behçet's disease in 106 Brazilian patients. *Clin Rheumatol.* 2009;28(5):543-6.
16. López-Aleman R, Longstaff C, Hawley S, Mirshahi M, Fábregas P, Jardí M, Merton E, Miles LA, Félez J. Inhibition of cell surface mediated plasminogen activation by a monoclonal antibody against alpha-Enolase. *Am J Hematol.* 2003;72(4):234-42.
17. Meroni PL, Khamashta MA, Youinou P, Shoenfeld Y. Mosaic of anti-endothelial antibodies: review of the first international workshop on anti-endothelial antibodies, clinical and pathological significance. *Lupus.* 1995;4(2):95-9.
18. Tunc R, Keyman E, Melikoglu M, Fresko I, Yazici H. Target organ associations in Turkish patients with Behçet's disease: a cross sectional study by exploratory factor analysis. *J Rheumatol.* 2002;29(11):2393-6.
19. Diri E, Mat C, Hamuryudan V, Yurdakul S, Hizli N, Yazici H. Papulopustular skin lesions are seen more frequently in patients with Behçet's syndrome who have arthritis: a controlled and masked study. *Ann Rheum Dis.* 2001;60(11):1074-6.