



Alteração de marcadores inflamatórios, imunidade inata e metabolismo do ferro numa população portuguesa com doença de Behçet

Rita Oliveira¹, Patricia Napoleão², João Banha¹, Dina Pereira³,
Filipe Barcelos⁴, Ana Teixeira⁴, José Vaz Patto⁴,
Ana Maria Viegas-Crespo⁵, Luciana Costa^{1,6}

luciana.costa@insa.min-saude.pt

(1) Departamento de Promoção da Saúde e Prevenção de Doenças Não Transmissíveis, INSA.

(2) Instituto de Medicina Molecular. Faculdade de Medicina, Universidade de Lisboa.

(3) Hospital Vila Franca de Xira.

(4) Instituto Português de Reumatologia.

(5) Centro de Estudos do Ambiente e do Mar. Departamento de Biologia. Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa.

(6) Centro para a Biodiversidade, Genómica Integrativa e Funcional. Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa.

_Introdução

A Doença de Behçet (DB) é uma doença inflamatória crónica rara de carácter multisistémico. As manifestações clínicas mais comuns na DB são as úlceras orais e genitais recorrentes, a uveíte e as lesões cutâneas (1). O diagnóstico desta doença continua a ser baseado em critérios clínicos (2) não obstante a investigação realizada para encontrar um teste específico laboratorial adequado. Atualmente, a etiologia da DB permanece ainda por esclarecer. A hipótese mais aceite quanto à sua patogénese baseia-se na existência de uma resposta inflamatória iniciada por um agente infeccioso num hospedeiro geneticamente suscetível (3). Vários autores têm defendido um modelo "auto-inflamatório" para explicar a imunopatogénese da DB (4,5). Em particular, tem-se assistido a um acumular de evidência que sustenta o envolvimento do stress oxidativo e a participação de metais de transição nos processos de disfunção endotelial e alterações na resposta imunitária que estão na base das lesões tecidulares observadas nesta doença (6-8).

A ceruloplasmina (Cp) é uma proteína de cobre com um papel fundamental no metabolismo do ferro (Fe) que participa na resposta de fase aguda e contribui para o balanço oxidante/antioxidante sistémico. Resultados anteriores do nosso grupo mostraram que as células mononucleares do sangue periférico expressam constitutivamente

as duas isoformas de Cp (segregada e membranar), sugerindo uma ligação estreita entre imunidade, inflamação e "biologia oxidativa" (9,10). Curiosamente, estudos anteriores mostraram que a Cp circulante está aumentada na DB (11,12) muito embora o papel Cp associada aos leucócitos não tenha sido investigada nesta doença, para além dos nossos próprios estudos preliminares (13).

_Objetivos

O objetivo geral deste trabalho foi a investigação de novos aspetos relacionados com a interação entre a resposta inflamatória, a homeostase do Fe e o balanço pró/antioxidante na DB de forma a esclarecer o seu papel na fisiopatologia desta doença. Em particular, propusemo-nos medir a expressão da Cp membranar nas subpopulações leucocitárias mais representativas no sangue periférico de doentes com DB e respetivos controlos. Adicionalmente, pretendeu-se fazer uma caracterização clínica e laboratorial (hematológica, bioquímica e imunológica) destes dois grupos, nomeadamente com o enfoque na medição dos marcadores do metabolismo do ferro e da inflamação.

_Metodologia

Para este estudo foram selecionados 25 indivíduos clinicamente diagnosticados com DB de acordo com as normas internacionais do ISGBD (2), e classificados de acordo com a sintomatologia, gravidade e início da doença. Paralelamente, foram selecionados 24 indivíduos dadores de sangue saudáveis, constituindo estes o grupo controlo. Todos os voluntários participantes deram o seu consentimento informado e realizaram um inquérito confidencial. Um resumo dos dados clínicos e demográficos está representado na *Tabela 1*.

A caracterização hematológica das amostras colhidas foi feita através da realização de um hemograma completo. A medição sérica dos marcadores bioquímicos do metabolismo do Fe [Fe sérico, transferina (Tf) e capacidade total de fixação do Fe (CTFF)] foi realizada através de testes colorimétricos enzimáticos, enquanto a quantificação da ferritina (Ft) foi efetuada através de um ensaio imunométrico. Por outro lado, a avaliação do *status* inflamatório sistémico foi realizada através da quantificação da Cp e da proteína C reativa (PCR) por nefelometria, ao passo que a beta2-microglobulina (β_2 -m) foi medida



artigos breves_ n. 4

Tabela 1: ↓ *Resumo dos dados clínicos e demográficos da população participante no estudo.*

Dados clínicos e demográficos	Controlos (n=24)	Doentes com DB (n=25)
Género (f/m)	11/13	16/9
Idade (anos)	38 ± 9	42 ± 10
Severidade da doença		
Ligeira	-	11
Moderada	-	7
Severa	-	7
Início da doença		
Precoce (≤25 anos), (n)	-	9
Tardio (>25 anos), (n)	-	16
Sintomatologia		
Uveíte (n)	-	10
Artrite (n)	-	10
Tromboflebite (n)	-	5

através de um ensaio imunoenzimático. Adicionalmente, a determinação quantitativa da concentração de mieloperoxidase (MPO) no soro baseou-se na técnica de ELISA, utilizando um *kit* comercial. Finalmente, o estudo da expressão da Cp nas várias subpopulações leucocitárias fez-se através da técnica de citometria de fluxo.

Resultados

Os resultados laboratoriais obtidos encontram-se sumarizados na **Tabela 2**.

A análise comparativa dos marcadores inflamatórios séricos mostrou um aumento significativo de todas as proteínas inflamatórias (Cp, CRP e β_2m) em doentes com DB comparativamente aos indivíduos saudáveis.

Um aumento significativo da concentração sérica da MPO foi também encontrado no grupo dos doentes em comparação com os controlos.

Por outro lado, a análise dos dados hematológicos mostrou um aumento significativo do número total de glóbulos brancos e de neutrófilos do sangue periférico dos indivíduos com DB comparativamente aos indivíduos saudáveis.

Os resultados da medição da expressão da Cp à superfície dos leucócitos mostraram que os granulócitos, comparativamente aos linfócitos e aos monócitos, são a subpopulação celular com maior expressão desta proteína nos dois grupos em estudo. Em particular, encontrou-se um aumento significativo da Cp membranar expressa pelos monócitos do sangue periférico dos doentes em comparação com os controlos.

Finalmente, a medição sérica dos vários marcadores do metabolismo do Fe mostrou um aumento significativo na Tf e CTFF nos doentes com DB. Não se encontraram diferenças significativas nas concentrações séricas de Fe e Ft quando se fez a comparação entre os dois grupos em estudo.

Tabela 2: ↓ *Resumo de parâmetros hematológicos, bioquímicos e imunológicos medidos em indivíduos saudáveis (n=24) e doentes com DB (n=25).*

Marcadores sistémicos	Controlos (n=24)	Doentes com DB (n=25)
Inflamação		
CRP (mg/dl)	0.20 (0.10-0.30)	0.45 ^a (0.19-0.74)
Cp (mg/dl)	30 (25-36)	39 ^a (32-50)
β_2m (μ g/l)	938(866-1038)	1145 ^a (1040-1447)
Leucócitos totais ($\times 10^6$ /ml)	6.2(5.4-7.1)	7.5 ^a (6.1-9.1)
Neutrófilos ($\times 10^6$ /ml)	3.6(3.1-4.3)	4.6 ^a (3.8-5.9)
Linfócitos ($\times 10^6$ /ml)	1.8(1.6-2.1)	1.7(1.5-2.5)
Monócitos ($\times 10^6$ /ml)	0.40(0.35-0.50)	0.50(0.40-0.65)
MPO (ng/ml)	0.88(0.55-1.5)	1.5 ^a (0.95-2.1)
Metabolismo do Ferro		
Fe (μ g/dL)	105(85-119)	103(73-129)
Ft (mg/dl)	67(30-114)	81(24-149)
Tf (mg/dl)	253(226-273)	305 ^a (270-330)
CTFF (mg/dl)	316(283-341)	381 ^a (336-413)
GRCp	363 (318-409)	401 (317-409)
PBLcP	63 (48-79)	68 (53-83)
MNCp	103 (87-119)	123 (109-137)

Os resultados estão apresentados como média (1º quartil-3º quartil); ^ap<0,05 vs controlos; CRP- proteína C reativa; Cp- ceruloplasmina; β_2m - β_2 -microglobulina; MPO- mieloperoxidase; Fe- ferro; Ft- ferritina; Tf- transferrina; CTFF- capacidade total de fixação do Fe; GRCp- expressão de Cp à superfície dos granulócitos de sangue periférico; PBLcP- expressão de Cp à superfície de linfócitos de sangue periférico; MNCp- expressão de Cp à superfície de monócitos de sangue periférico.

_Discussão

Para além da evidência de que a DB pode estar fortemente associada a uma componente genética (14), vários estudos mostram que a inflamação tem um papel determinante na fisiopatologia desta doença. De fato, os resultados obtidos no presente estudo confirmam esta hipótese visto que todos os marcadores inflamatórios séricos medidos mostraram-se significativamente aumentados nos doentes comparativamente aos controlos.

Por outro lado, tem sido anteriormente reportada a existência de várias alterações leucocitárias na DB (15-17). As nossas observações também reforçam esta noção, visto ter sido encontrado um aumento significativo do número total de leucócitos circulantes em indivíduos com DB. Esse resultado deveu-se essencialmente ao aumento do número de neutrófilos, o que parece corroborar o aumento significativo da concentração sérica de MPO observada nestes doentes. Efetivamente, estudos anteriores mostram que os neutrófilos estão hiperativados na DB (18-19) e, nestas condições segregam quantidades consideráveis de MPO (20) que contribuem para a lesão tecidual observada nesta doença.

O balanço pró/antioxidante sistémico está fortemente ligado à capacidade de impedir reações de formação de radicais livres mediadas por metais de transição. Neste contexto, proteínas de ligação/oxidação de Fe são consideradas como os mais importantes antioxidantes existentes no plasma (21). Neste trabalho, para além do aumento significativo da Cp sérica encontrado nos doentes com DB, observou-se também um aumento significativo da Tf (e da CTFF), sugerindo o envolvimento destas proteínas em mecanismos de proteção contra uma potencial lesão oxidativa.

Muito embora a Cp seja normalmente considerada como uma proteína sérica de síntese maioritariamente hepática, foi anteriormente por nós demonstrado que as células imunes são capazes de sintetizar ambas isoformas (9,10). Os resultados aqui obtidos mostraram que os granulócitos constituem a subpopulação leucocitária com maior expressão de Cp à sua superfície. Adicionalmente, observou-se um aumento significativo do número de neutrófilos nos doentes com DB o que indica que estas células poderão contribuir para o aumento da isoforma solúvel medida em circulação.

Por outro lado, o aumento da expressão da Cp membranar nos monócitos de doentes com DB sugere um potencial papel alternativo desta proteína na defesa contra potenciais agentes infecciosos. Efetivamente, tanto o papel desta isoforma facilitando o exporte de Fe celular, como a reconhecida atividade bactericida (22) e pró-oxidante (23) da isoforma em circulação, apoiam não só este pressuposto como também constituem um suporte adicional para a proposta do envolvimento da infeção na etiologia da DB.

_Conclusão

Os resultados obtidos neste trabalho mostram pela primeira vez a existência de alterações significativas da expressão de ambas isoformas da Cp na DB, muito especialmente no que respeita ao aumento da Cp membranar à superfície dos monócitos do sangue periférico. É assim reforçada a importância da relação funcional entre a inflamação, a imunidade inata e o metabolismo do Fe na DB, sugerindo a implicação de novas vias metabólicas na patogénese desta doença que poderão ser cruciais para o desenho de novos alvos terapêuticos e/ou identificação de novos biomarcadores de diagnóstico.

Referências bibliográficas:

- (1) Verity DH, Wallace GR, Vaughan RW, et al. Behçet's disease: from Hippocrates to the third millennium. *Br J Ophthalmol*. 2003;87(9):1175-83. [LINK](#)
- (2) International Study Group for Behçet's Disease. Criteria for diagnosis of Behçet's disease. *Lancet*. 1990; 335 (8697):1078-80.
- (3) Kalayciyan A1, Zouboulis C. An update on Behçet's disease. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2007;21(1):1-10.
- (4) Yazici H, Fresko I. Behçet's disease and other autoinflammatory conditions: what's in a name? *Clin Exp Rheumatol*. 2005;23(4 Suppl 38):S1-2.
- (5) Direskeneli H. Autoimmunity vs autoinflammation in Behçet's disease: do we oversimplify a complex disorder? *Rheumatology (Oxford)*. 2006;45(12):1461-5. [LINK](#)
- (6) Köse K, Doğan P, Aşçıoğlu M, et al. Oxidative stress and antioxidant defenses in plasma of patients with Behçet's disease. *Tohoku J Exp Med*. 1995;176(4):239-48. [LINK](#)
- (7) Isik A, Koca SS, Ustundag B, et al. Decreased total antioxidant response and increased oxidative stress in Behçet's disease. *Tohoku J Exp Med*. 2007 Jun;212(2):133-41. [LINK](#)
- (8) Doğan P, Tanrikulu G, Soyuer U, et al. Oxidative enzymes of polymorphonuclear leucocytes and plasma fibrinogen, ceruloplasmin, and copper levels in Behçet's disease. *Clin Biochem*. 1994;27(5):413-8.
- (9) Banha J, Marques L, Oliveira R, et al. Ceruloplasmin expression by human peripheral blood lymphocytes: a new link between immunity and iron metabolism. *Free Radic Biol Med*. 2008;44(3):483-92. Epub 2007 Oct 22.
- (10) Marques L, Auriac A, Willemetz A, Banha J, Silva B, Canonne-Hergaux F, Costa L. Immune cells and hepatocytes express glycosylphosphatidylinositol-anchored ceruloplasmin at their cell surface. *Blood Cells Mol Dis*. 2012;48(2):110-20. Epub 2011 Dec 16.
- (11) Doğan P, Tanrikulu G, Soyuer U, et al. Oxidative enzymes of polymorphonuclear leucocytes and plasma fibrinogen, ceruloplasmin, and copper levels in Behçet's disease. *Clin Biochem*. 1994;27(5):413-8.



artigos breves_ n. 4

- (12) Taysi S, Kocer I, Memisogullari R, et al. Serum oxidant/antioxidant status in patients with Behçet's disease. *Ann Clin Lab Sci.* 2002;32(4):377-82.
- (13) Oliveira R, Banha J, Martins F, et al. Lymphocyte ceruloplasmin and Behçet's disease. *Acta Reumatol Port.* 2006;31(4):323-9. [LINK](#)
- (14) Gül A, Inanç M, Ocal L, et al. Familial aggregation of Behçet's disease in Turkey. *Ann Rheum Dis.* 2000;59(8):622-5. [LINK](#)
- (15) Niwa Y, Miyake S, Sakane T, et al. Auto-oxidative damage in Behçet's disease-endothelial cell damage following the elevated oxygen radicals generated by stimulated neutrophils. *Clin Exp Immunol.* 1982;49(1):247-55. [LINK](#)
- (16) Niwa Y, Mizushima Y. Neutrophil-potentiating factors released from stimulated lymphocytes; special reference to the increase in neutrophil-potentiating factors from streptococcus-stimulated lymphocytes of patients with Behçet's disease. *Clin Exp Immunol.* 1990;79(3):353-60. [LINK](#)
- (17) Pronai L, Ichikawa Y, Nakazawa H, et al. Enhanced superoxide generation and the decreased superoxide scavenging activity of peripheral blood leukocytes in Behçet's disease-effects of colchicine. *Clin Exp Rheumatol.* 1991;9(3):227-33.
- (18) Eksioğlu-Demiralp E, Direskeneli H, Kibaroglu A, et al. Neutrophil activation in Behçet's disease. *Clin Exp Rheumatol.* 2001;19(5 Suppl 24):S19-24.
- (19) Orem A, Efe H, Değer O, et al. Relationship between lipid peroxidation and disease activity in patients with Behçet's disease. *J Dermatol Sci.* 1997;16(1):11-6.
- (20) Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med.* 1989;320(6):365-76.
- (21) Gutteridge JM, Quinlan GJ. Antioxidant protection against organic and inorganic oxygen radicals by normal human plasma: the important primary role for iron-binding and iron-oxidising proteins. *Biochim Biophys Acta.* 1993;1156(2):144-50.
- (22) Klebanoff SJ. Bactericidal effect of Fe²⁺, ceruloplasmin, and phosphate. *Arch Biochem Biophys.* 1992;295(2):302-8.