

13ª JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

BIOMEDICINA

DOPAMINA FAVORECE A EXPANSÃO DE CÉLULAS T PRODUTORAS DE IL-17 E RESISTENTES A GLICOCORTICÓIDES EM PACIENTES COM ESCLEROSE MÚLTIPLA

¹ Newton de Freitas Centurião (PIBIC/CNPq); ¹ Thais B. Ferreira (doutorado); ¹ Priscila O. Barros (mestrado); ¹ Bruna Teixeira (IC); ¹ Tatiane Cassano (PIBIC/CNPq); ¹ Taissa M. Kasahara (mestrado); ¹ Joana Hygino (doutorado); ² Claudia Cristina F. Vasconcelos (doutora); ² Helcio Alvarenga Filho (doutor); ² Ana Cristina Wing (mestrando), ² Regis M. Andrade (doutor), ^{1,2} Cleonice A. M. Bento (orientadora).

1 - Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto Biomédico, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro.

2 - Programa de pós-graduação em neurologia e Departamento de Medicina Geral, Hospital Gaffrée e Guinle, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro.

Apoio Financeiro: FAPERJ, CNPq.

Palavras-chave: esclerose múltipla; células T; dopamina.

INTRODUÇÃO

Esclerose Múltipla (EM) é uma desordem autoimune crônica do cérebro e medula espinhal, na qual células T ativadas periféricamente infiltram o Sistema Nervoso Central (SNC) e geram lesão à bainha de mielina. Apesar dessa doença ter uma forma monofásica, a maioria dos pacientes possui uma forma recorrente com ataques neurológicos que levam a déficits das funções sensoriais, motoras, autonômicas e cognitivas (ADAMS & VICTOR, 1989). A EM, por ser uma doença neurológica comum em adultos jovens, possui uma série de implicações para o paciente e para a sociedade. Uma série de estudos recentes tem demonstrado a participação das células Th17 na imunopatogênese da EM (MATUSEVICIUS ET AL., 1999; HOLLIFIELD ET AL., 2003; BRUCKLACHER-WALDERT ET AL., 2009; KEBIR ET AL., 2009; LOVETT-RACKE, YANG, RACKE, 2011). Como em outras doenças autoimunes, a patogênese da EM é influenciada por fatores ambientais, como o estresse psicológico (MOHR ET AL., 2004; SIEGERT & ABERNETHY, 2005; STOJANOVICH & MARISAVLJEVICH 2008). Durante o estresse, o sistema imune é modulado pelo Sistema Nervoso Simpático periférico e central através da liberação de catecolaminas, como a dopamina (DA). A DA não apenas participa como neurotransmissor, principalmente no SNC, mas também contribui para a modulação da função imune (PACHECO ET AL., 2009; NAKANO ET AL., 2011). Portanto, levando-se em conta que DA é a principal catecolamina do SNC e seus níveis periféricos estão elevados durante eventos estressantes, estudos sobre o impacto dessa catecolamina no status funcional de células T de pacientes com EM são necessários.

OBJETIVO

Avaliar os efeitos de doses de DA relacionados ao estresse no comportamento funcional das células T e dos monócitos do sangue periférico dos pacientes com a forma recorrente remitente da EM (EM-RR).

METODOLOGIA

Para o nosso estudo, 20 pacientes com diagnóstico definido de EM-RR foram recrutados do hospital da Lagoa. Todos os pacientes estavam em remissão clínica na data da coleta de sangue e não haviam recebido medicamentos modificadores da doença (como corticóides) por, pelo menos, três meses antes da coleta. O status de incapacidade dos pacientes foi registrado de acordo com a escala de status de incapacidade expandido de Kurtzke (EDSS) (KURTZKE, 1983) no momento do estudo. Como grupo controle, vinte indivíduos saudáveis de idades correspondentes e sem história de doença autoimune foram também recrutados para o estudo. Finalmente, nenhum dos indivíduos possuía diagnóstico clínico de infecção nos últimos três meses anteriores à coleta de sangue. O consentimento foi obtido de cada paciente e o estudo foi aprovado pelo comitê de ética para pesquisa em assuntos humanos da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO). Para avaliar a resposta imune in vitro, culturas de células mononucleares do sangue periférico (1×10^6 /mL) foram ativadas com phytohemaglutinina (PHA) a $1 \mu\text{g/mL}$ (Sigma, Co) por 3 dias (TEIXEIRA et al., 2013). Em alguns experimentos, monócitos circulantes foram ativados com lipopolissacarídeos (LPS) de *Escherichia coli* (Sigma, Co) a 100 ng/mL por 24 horas (TEIXEIRA et al., 2013). Nesses experimentos, os sobrenadantes dos monócitos ativados pelo LPS foram coletados para analisar sua habilidade de modular a produção de IL-17 e IL-10 por culturas de células T CD4⁺ autólogas ativadas policlonalmente com PHA. Para avaliar o efeito da dopamina (DA), as células T ou monócitos foram cultivados na presença de doses relacionadas ao estresse dessa catecolamina ($1 \times 10^{-5} \text{ M}$ ou $1 \times 10^{-6} \text{ M}$) (CONSENTINO et al., 2004). O efeito do glicocorticoide foi avaliado pelo uso de hidrocortisona (HC), adicionado às culturas nas concentrações de $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ ou $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ (Sigma Chemicals, St Louis, MD). Finalmente, em alguns experimentos, o efeito da sinalização via receptor para IL-6 (IL-6R) (MIHARA ET AL., 2005) foi aferido através da adição $100 \mu\text{g/mL}$ de anticorpo monoclonal (mAb) anti-IL6R humanizado (Tocilizumab, Roche). Todas as culturas foram mantidas no tempo indicado em estufa de CO₂ à 5% e a temperatura de 37 °C. Quanto aos ensaios imunofuncionais, nós avaliamos nesse estudo a proliferação das células T, medida pela incorporação de [³H] timidina, e o conteúdo in vitro de citocinas presente nos sobrenadantes dessas culturas através da técnica ELISA utilizando o protocolo do fornecedor (Kits OptEIA ELISA, BD, Pharmingen, San Diego, CA). A análise estatística foi feita usando o software Prism 5.0. A significância em todos os experimentos foi definida como $p < 0.05$.

13ª JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

RESULTADOS

A extensão da linfoproliferação em resposta ao PHA foi significativamente inferior em culturas de células T de pacientes com EM-RR, sendo esse fenômeno associado à menor produção de IL-2 e à severidade da doença, calculado pelo valor do EDSS, como já descrito anteriormente (MERRIL et al., 1984). Interessantemente, enquanto a DA diminuiu a expansão das células T no grupo controle, essa catecolamina aumentou a expansão das células T de pacientes com EM-RR, independente do EDSS. Ademais, a adição da DA também amplificou, nas culturas das células T CD4+ ativadas de pacientes com EM-RR, a produção de IL-17 e, principalmente, da IL-6, ambas citocinas implicadas na progressão das lesões no SNC como descritos em LOVETT-RACKE et al (2011). Interessantemente, a HC, um poderoso imunossupressor utilizado no controle das recaídas clínicas da doença, teve menor efeito em reduzir a linfoproliferação e produção de citocinas relacionadas ao fenótipo Th17 no grupo dos pacientes com EM-RR, sendo ambos os fenômenos amplificados pela adição da DA. Sabe-se que, na progressão da doença, os pacientes, principalmente aqueles com desordens depressivas maiores, tendem a se tornar resistentes a essa droga (FISCHER et al., 2012), o que provavelmente é gerado pelo envolvimento da DA segundo nossos achados preliminares. Adicionalmente, a presença de DA reduziu a produção das citocinas anti-inflamatórias IL-10 e TGF- β nas culturas de células T ativadas obtidas de pacientes com EM-RR, estudo de CONSENTINO et al (2012) demonstrou que a DA através dos receptores tipo-DR1 aboliam a capacidade das Tregs dos pacientes com EM de abolir a proliferação das células T efectoras. A capacidade da DA em ampliar tanto o fenótipo Th17 quanto reduzir a eficácia da HC em modular o status funcional das células T dos pacientes com EM-RR foram também atreladas à habilidade dessa catecolamina em elevar a produção de IL-23 e, principalmente, IL-6 por monócitos ativados pelo LPS. Finalmente, o bloqueio da sinalização do receptor para IL-6 (IL-6R) com mAb em culturas de monócitos ativados com LPS reduziu a capacidade dessas células em amplificar tanto a produção de IL-17 quanto a proliferação das células TCD4+, porém aumentou a liberação de IL-10.

CONCLUSÃO

Apesar de preliminares, nossos dados indicam que a dopamina (DA) amplifica a expansão de clones de células Th17 refratários à inibição pelo corticóide em pacientes com EM-RR e sugerem que esse fenômeno pode estar, ao menos em parte, relacionado a habilidade dessa catecolamina em elevar a produção de IL-6 por monócitos e pelas células T CD4+.

REFERÊNCIAS

- ADAMS RD, VICTOR M. Multiple sclerosis and allied demyelinating diseases. In: Principles of Neurology. 4:755-774, 1989.
- BRUCKLACHER-WALDERT, V., STURNER, K., KOLSTER, M., et al. Phenotypical and functional characterization of T helper 17 cells in multiple sclerosis. *Brain* v.132, p.3329-3341, 2009.
- HOLLIFIELD, R.D., HARBIGE, L.S., PHAM-DINH, D., et al. Evidence for cytokine dysregulation in multiple sclerosis: peripheral blood mononuclear cell production of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines during relapse and remission. *Autoimmun.* vol. 36, p.133-41, 2003.
- COSENTINO, M., RASINI, E., COLOMBO, C., et al., 2004. Dopaminergic modulation of oxidative stress and apoptosis in human peripheral blood lymphocytes: evidence for a D1-like receptor-dependent protective effect. *Free Radic. Biol. Med.* 36 (10): 1233–1240.
- CONSENTINO, M., ZAFFARONI, M., TROJANO, M., et al., 2012. Dopaminergic modulation of CD4+CD25(high) regulatory T lymphocytes in multiple sclerosis patients during interferon- β therapy. *Neuroimmunomodulation* 19(5):283-92.
- TEIXEIRA, B., BITTENCOURT, V.C., FERREIRA, T.B., et al., 2013. Low sensitivity to glucocorticoid inhibition of in vitro Th17-related cytokine production in multiple sclerosis patients is related to elevated plasma lipopolysaccharide levels. *Clin Immunol.* VOL. 148, p. :209-18.
- FISCHER, A., OTTE, C., KRIEGER, T., et al., 2012. Decreased hydrocortisone sensitivity of T cell function in multiple sclerosis-associated major depression. *Psychoneuroendocrinol.* 37, 1712-1718.
- KEBIR, K., IFERGAN, I., ALVAREZ, J.I., et al. Preferential recruitment of interferon-gamma-expressing TH17 cells in multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* vol., 66, p.390–402, 2009.
- KURTZKE, J.F. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* vol. 33, p. 1444–52, 1983.
- LOVETT-RACKE, A.E., YANG, Y., RACKE, M.K. Th1 versus Th17: Are T cell cytokines relevant in multiple sclerosis? *Bioch. Bioph. Acta* vol. 1812, p. 246–251, 2011.
- MATUSEVICIUS, D., KIVISAKK, P., KOSTULAS, B., et al. Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis. *Mult Scler* vol. 5, p. 101–104, 1999.
- MERRIL, J.E., MOHLSTROM, C., et al., 1984. Response to and production of interleukin 2 by peripheral blood and cerebrospinal fluid lymphocytes of patients with multiple sclerosis. *J. Immunol.* 133:1931–7.
- MIHARA, M., KASUTANI, K., OKAZAKI, M., et al. Tocilizumab inhibits signal transduction mediated by both mIL-6R and sIL-6R, but not by the receptors of other members of IL-6 cytokine family. *Int. Immunopharmacol.* vol. 5, p. 1731–1740, 2005.
- MOHR, D.C., HART, S.L., JULIAN, L., et al. Association between stressful life events and exacerbation in multiple sclerosis: a meta-analysis. *BMJ* vol. 328, p. 731-735, 2004.
- NAKANO, K., YAMAOKA, K., HANAMI, K., et al. Dopamine Induces IL-6–Dependent IL-17 Production via D1-Like Receptor on CD4 naive T cells and D1-like receptor antagonist SCH-23390 inhibits cartilage destruction in a human rheumatoid arthritis/SCID mouse Chimera Model. *J. Immunol.* vol. 186, p. 3745–3752, 2011.
- PACHECO, R., PRADO, C.E., BARRIENTOS, M.J., et al. Role of dopamine in the physiology of T-cells and dendritic cells. *J. Neuroimmunol.* vol. 216, p. 8–19, 2009.
- SIEGERT, R.J., ABERNETHY, D.A. Depression in multiple sclerosis: a review. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 76, 469-475, 2005.
- STOJANOVICH, L., MARISAVLJEVICH, D. Stress as a trigger of autoimmune disease. *Autoimmun. Rev.* vol. 7, p. 209-13, 2008.