

13ª JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

BIOMEDICINA

PAPEL DA IL-6 COMO FATOR DE RISCO PARA PROGRESSÃO DA NEUROMIELITE ÓPTICA

¹Tatiane Cassano Fonseca (IC-PIBIC); ¹Priscila O. Barros (Doutorado-CAPEs); ¹Thais B. Ferreira (Doutorado-CAPEs); ¹Bruna Teixeira (IC-UNIRIO); ¹Taissa M. Kasahara (Mestrado-CAPEs); ¹Newton F. Centurião (IC-PIBIC); ²Regina Alvarenga (Coorientadora); ¹Cleonice A. M. Bento (orientadora).

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

2 - Departamento de Neurologia; Hospital Gaffrée e Guinle; Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro.

Apoio financeiro: CNPq, FAPERJ, UNIRIO.

Palavras-chave: Neuromielite óptica; citocinas; LPS.

INTRODUÇÃO

A neuromielite óptica (NMO) é uma doença desmielinizante de fundo autoimune do sistema nervoso central (SNC) que foi por muitas décadas considerada uma variante da esclerose múltipla (EM) (ARGYRIOU, MAKRIS, 2008). O reconhecimento da NMO como nova condição nosológica e não uma variante clínica da EM passou pela mudança de um paradigma na concepção do diagnóstico das doenças desmielinizantes. Contribuíram decisivamente para isto estudos de séries ocidentais e asiáticas, a introdução da ressonância magnética (RM) nos critérios de diagnóstico e, mais recentemente, a identificação de um auto-anticorpo detectado na maioria dos pacientes com NMO, a IgG anti-aquaporina 4 (AQP4) (LENNON et al., 2004, 2005; LUCCHINETTI et al., 2002). Acredita-se que a doença se manifesta a partir do ataque imune à bainha de mielina aos nervos ópticos e da medula espinhal, caracterizado, clinicamente, por dois eventos índices, neurite óptica (NO) e mielite transversa aguda (MTA) (PITTOCK et al., 2006; WINGERCHUK et al., 2006). Entretanto, devido ao pouco tempo de reconhecimento da NMO como uma doença desmielinizante do SNC distinta da EM, poucos estudos foram publicados sobre os diferentes mecanismos genéticos e ambientais em elevar o risco à patologia. O melhor entendimento desses fatores possibilitará a aquisição de conhecimentos valiosos acerca das bases moleculares e celulares da NMO, podendo assim ajudar no desenho de novas e mais eficazes ferramentas terapêuticas. Nesse sentido, estudos recentes publicados pelo nosso grupo demonstraram uma frequência elevada de células T CD4+ produtoras de interleucina (IL)-6 e IL-21 no sangue periférico de pacientes com NMO na fase de remissão clínica que foi diretamente correlacionada à progressão da doença. Adicionalmente, a liberação dessas citocinas pelas células T CD4+ foi significativamente menos sensível a inibição seguindo o tratamento da cultura com doses farmacológicas de corticoide, potente droga utilizada no controle das crises agudas de déficits neurológicos (LINHARES et al., 2013). Esses resultados estão de acordo com outros estudos que sugerem a participação das células Th17 na NMO (ISHIZU et al., 2005; UZAWA et al., 2010; KIRA, 2011). Epidemiologicamente, um dos principais fatores de risco relacionados ao desenvolvimento e/ou exacerbação de desordens autoimunes é a recorrência de doenças infecciosas (MILLS, 2011). Acredita-se que diferentes produtos microbianos podem favorecer doenças autoimunes tanto por amplificar a expansão do fenótipo Th17 quanto por danificar o status funcional das células T reguladoras (T regs). As T regs são linfócitos importantes em inibir processos inflamatórios autoagressivos por produzir, por exemplo, grandes quantidades de citocinas anti-inflamatórias, tais como IL-10 e o fator β de crescimento transformado (TGF- β) (WING & SAKAGUCHI, 2010). Nesse sentido, outro trabalho publicado recentemente pelo nosso grupo (BARROS et al., 2013) demonstrou uma elevada responsividade imune in vitro das células T CD4+ a um isolado intestinal de *Escherichia coli* levando a uma produção descontrolada de citocinas relacionadas ao fenótipo Th17 com reduzidos níveis de IL-10. Apesar de muito interessantes, esses dados revelam alterações funcionais das células T de pacientes com NMO quando estimulados in vitro. Entretanto, para aumentar a nossa compreensão sobre o impacto dos eventos imunes e progressão da doença, algumas análises imunes in vivo são necessárias.

OBJETIVO

O presente estudo tem como objetivo avaliar a relação entre o perfil de citocina no sangue periférico de pacientes com NMO com marcadores clínicos de progressão.

METODOLOGIA

Pacientes: Para o nosso estudo 20 pacientes adultos (02 homens e 18 mulheres) com diagnóstico de NMO recorrente remitente (NMO-RR), segundo os critérios de Wingerchuck e colaboradores (2006), foram recrutados do Hospital Federal da Lagoa (Rio de Janeiro, Brasil) e que tiveram os seus seguintes parâmetros imunológicos avaliados em nosso laboratório: 1) Quantificação de citocinas in vitro e in vivo, através da técnica ELISA (Kits OptEIA ELISA, BD, Pharmingen, San Diego, CA); 2) Dosagem dos níveis plasmáticos de LPS pelo teste LAL. A dosagem das citocinas in vitro foi realizada nos sobrenadantes obtidas das culturas de células T CD4+ policlonalmente ativadas por 3 dias com a fitohemaglutinina (PHA, a 1 μ g/mL) ou de monócitos ativados por 24 h com LPS (100 ng/mL). Como controle da normalidade, esses mesmos parâmetros imunológicos foram quantificados em indivíduos adultos saudáveis, pareados pela idade e gênero (n=20). No grupo dos pacientes, todos os parâmetros laboratoriais acima mencionados foram avaliados durante a fase de remissão da doença. O status de incapacidade dos pacientes foi avaliado pela Professora Regina Alvarenga, neurologista de nosso grupo utilizando a escala do EDSS. Ademais, informações adicionais serão colhidas a partir dos prontuários médicos, tais como: etnia e a ocorrência de doenças infecciosas e transtornos de humor (depressão maior). Escala EDSS: Seguindo a avaliação da extensão dos distúrbios nos sistemas funcionais, os pacientes com NMO são estadiados utilizando a escala chamada Expanded Disability Status Scale (EDSS), que mede o grau de incapacidade neurológica do paciente (KURTZKE, 1983). O EDSS possui 10 itens com valores variando de 0 a 10, com pontuação aumentando em meio ponto conforme o grau de incapacidade do paciente, dando maior enfoque à capacidade de deambulação do paciente (principalmente quando o EDSS é > 4,0). Esta classificação vai desde o normal, que

13ª JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

é zero, até à incapacidade máxima, quando os valores de EDSS são superiores a 6. A cima do valor 6 os pacientes ficam restritos à cadeira de rodas. Análise estatística: Todas as análises estatísticas dos ensaios foram conduzidas usando o programa de gráfico GraphPad Prism versão 5.0 para Windows. A significância em todos os experimentos foi definida como $p < 0,05$.

RESULTADOS

Com relação à análise do perfil de citocinas nos plasmas, nossos resultados demonstraram que a IL-6 foi significativamente superior nos plasmas dos pacientes com NMO-RR quando comparado ao grupo controle. Dentre os pacientes, maiores níveis circulantes de IL-6 foram dosados em pacientes que apresentavam repetidas infecções (geralmente urinárias) e com maior número de recaídas nos últimos dos anos de seguimento clínico. Ademais, quanto maior o nível in vivo de IL-6 maior a severidade de progressão da doença, determinada pela pontuação do EDSS. Como esperado, os níveis dessa citocina foi diretamente correlacionado a quantidade de LPS nos plasmas dos pacientes com NMO-RR. Quanto à produção de citocinas pelas culturas de monócitos estimulados com LPS, nossos resultados demonstraram que níveis significativamente maiores de IL-6 e IL-23 foram detectados no grupo dos pacientes, quando comparado ao grupo controle. Dentre os pacientes, a produção de IL-6, mas não de IL-23, foi significativamente maior em pacientes com formas mais severas da NMO. Como essas duas citocinas têm sido atreladas ao favorecimento e expansão do fenótipo Th17 (MILLS, 2008), nosso próximo passo foi observar se essas citocinas seriam capazes de potencializar a produção de citocinas sabidamente relacionadas ao fenótipo Th17 em culturas de células T CD4 policlionalmente ativadas com PHA. De fato, sobrenadantes das culturas de monócitos dos pacientes, ativadas com LPS, amplificaram a produção de IL-21 e IL-17, enquanto diminuiu a liberação de IL-10, conhecida citocina anti-inflamatória e envolvida na regulação da resposta imune.

CONCLUSÃO

Apesar de preliminares, nossos dados apresentados aqui revelam os efeitos deletérios da IL-6 na NMO por favorecer a ativação das células TCD4+ em Th17, conhecido fenótipo envolvido em desordens inflamatórias de fundo autoimune. Ademais, nosso estudo revelou o impacto adverso de produtos microbianos na progressão da doença, devendo este fenômeno deve estar atrelado, ao menos em parte, a indução de síntese da IL-6.

REFERÊNCIAS

- ARGYRIOU A. A., MAKRI, N.. Neuromyelitis optica: a distinct demyelinating disease of the central nervous system. *Acta Neurol Scand*, vol. 118, p.209-217, 2008.
- BARROS P.O., LINHARES U.C., TEIXEIRA B., et al. High in vitro immune reactivity to *Escherichia coli* in neuromyelitis optica patients is correlated with both neurological disabilities and elevated plasma lipopolysaccharide levels, *Hum Immunol* vol 74, p. 1080-1087, 2013.
- COSTANTINO CM, BAECHER-ALLAN CM, HAFLER, DA. Human regulatory T cells and autoimmunity. *Eur. J. Immunol.* Vol. 38, p 921-924, 2008.
- ISHIZU, T., OSOEGAWA, M., MEI, F-J, et al., Intrathecal activation of the IL-17/ IL-8 axis in opticospinal multiple sclerosis. *Brain*, vol. 128, p. 988-1002, 2005.
- KIRA, J. Neuromyelitis optica and opticospinal multiple sclerosis: mechanisms and pathogenesis. *Pathophysiology*, vol. 18, p. 69-79, 2011.
- KURTZKE, J.F. Rating neurology impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* vol. 33, p. 1444-52, 1983.
- LENNON, V. A., KRYZER, T. J., PITTOCK, S. J., et al. IgG marker of optic-spinal multiple sclerosis binds to the aquaporin-4 water channel. *Journal of Experimental of Medicine*, vol. 202, p. 473-477, 2005.
- LENNON, V. A., WINGERCHUCK, D. M., KRYZER, T. J. et al. A serum autoantibody marker of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis. *Lancet*, vol. 364, p. 2106-2112, 200.
- LINHARES, UC, SCHIAVONI PB., BARROS PO, et al. The Ex Vivo Production of IL-6 and IL-21 by CD4+ T Cells is Directly Associated with Neurological Disability in Neuromyelitis Optica Patients. *J Clin Immunol* (2013) 33: 179-189.
- LUCCHINETTI, C. F., MANDLER, R. N., MCGAVERN, D. et al., A role for humoral mechanisms in the pathogenesis of Devic's neuromyelitis optica. *Brain*, vol. 125, p. 1450-1461, 2002.
- MILLS KHG. Induction, function and regulation of IL-17-producing T cells. *Eur. J. Immunol.* v. 38, p. 2636-2649, 2008.
- MILLS KHG. TLR-dependent T cell activation in autoimmunity. *Nat Rev Immunol.* vol. 11, p. 807-22, 2011.
- PITTOCK, S. C., WEINSHENKER, B. G., LUCCHINETTI, C. F. et al. Neuromyelitis optica brain lesions localized at sites of high aquaporin 4-expression. *Arch Neurol*, vol. 63, p. 964-968, 2006.
- UZAWA, A., MORI, M., ARAI, K., et al., Cytokine and chemokine profiles in neuromyelitis optica: significance of interleukin-6. *Multiple Sclerosis*, vol. 16, n. 12, p. 1443-1452, 2010.
- WING, K. & SAKAGUCHI, S. Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. *Nature Immunol.* vol. 11, p. 7-13, 2010.
- WINGERCHUCK, D. M. Diagnosis and treatment of neuromyelitis optica. *The neurologist*, vol. 13, p. 2-11, 2006.