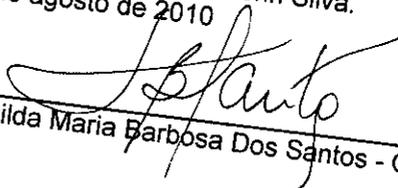


FELIPE VON GLEHN SILVA

**Esclerose Múltipla: Produção de citocinas pelos linfócitos Th17 e Th1 de pacientes tratados ou não com interferon beta e quantificação das células dendríticas plasmocitóides no líquido cefalorraquiano.**

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Médicas da FCM/UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas, área de concentração em Neurologia, do aluno Felipe Von Glehn Silva. Campinas, 03 de agosto de 2010

  
Profa. Dra. Leonilda Maria Barbosa Dos Santos - Orientadora

**Campinas**

**2010**

**FELIPE VON GLEHN SILVA**

**Esclerose múltipla: Produção de citocinas pelos linfócitos Th17 e Th1 de pacientes tratados ou não com interferon beta e quantificação das células dendríticas plasmocitóides no Líquido cefalorraquiano.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós- Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas, área de concentração Neurologia.

**ORIENTADORA: PROFA. DRA. LEONILDA M. B. SANTOS**

**CO-ORIENTADOR: PROF. DR. BENITO P. DAMASCENO**

**CAMPINAS**

**Unicamp**

**2010**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**  
Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

Si38e Silva, Felipe Von Glehn  
Esclerose múltipla: Produção de citocinas pelos linfócitos Th17 e Th1 de pacientes tratados ou não com interferon beta e quantificação das células dendríticas plasmocitóides no líquido cefalorraquiano / Felipe Von Glehn Silva. Campinas, SP : [s.n.], 2010.

Orientadores: Leonilda Maria Barbosa dos Santos, Benito Pereira Damasceno

Dissertação ( Mestrado ) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Esclerose multipla. 2. Células dendríticas plasmocitóides. 3. Líquido cefalorraquidiano. I. Santos, Leonilda Maria Barbosa dos. II. Damasceno, Benito Pereira. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

**Título em inglês: Multiple Sclerosis: cytokine production by Th17 and Th1 lymphocytes of treated and non-treated patients with beta interferon and quantification of plasmacytoid dendritic cells in the cerebrospinal fluid.**

**Keywords:** • Multiple sclerosis  
• Plasmacytoid dendritic cells  
• Cerebrospinal fluid

**Titulação: Mestre em Ciências Médicas**  
**Área de concentração: Neurologia**

**Banca examinadora:**

**Profa. Dra. Leonilda Maria Barbosa dos Santos**  
**Profa. Dra. Anamarli Nucci**  
**Profa. Dra. Regina Maria Papais Alvarenga**

**Data da defesa: 03—8-2010**

---

**Banca examinadora da Dissertação de Mestrado**  
**Felipe Von Glehn Silva**

---

---

Orientador(a): Profa. Dra. Leonilda Maria Barbosa Dos Santos

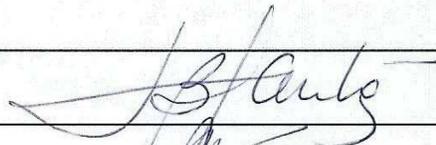
---

---

**Membros:**

---

1. Profa. Dra. Leonilda Maria Barbosa Dos Santos -



2. Profa. Dra. Anamarli Nucci -

3. Profa. Dra. Regina Maria Papais Alvarenga-



Curso de pós-graduação em Neurologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

---

**Data: 03/08/2010**

---

Trabalho realizado com apoio recebido da:

**FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO  
FAPESP**

**COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL  
SUPERIOR - CAPES**

## **Dedicatória**

Dedico este trabalho à minha família, que sempre me ensinou que o maior investimento que existe é o da educação. Aos meus pais, Elizabete e Xavier, minha esposa Fádua e meu filho Henrique.

## **Agradecimentos.**

---

À Profa. Leonilda dos Santos pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório e fazer parte do grupo de neuroimunologia. Tive a sorte de conhecer uma pessoa maravilhosa, exemplo de amor a profissão, dedicação, capacidade técnica e valores. Sem a sua orientação e ajuda este trabalho não aconteceria. Agradeço por ter me levado à bancada do laboratório e me ensinado a ser um pesquisador.

Ao Prof. Benito Damasceno pela oportunidade de trabalhar no Ambulatório de Esclerose Múltipla e pelos ensinamentos na Neurologia Clínica.

Aos professores do Departamento de Neurologia, que me ensinaram muito e passaram experiências valiosas durante a residência de Neurologia.

Aos amigos do Laboratório de Neuroimunologia pelo apoio, ensinamentos e trocas de experiências na parte laboratorial: Ana Leda Longhini, minha parceira de trabalhos e pela ajuda com a citometria de fluxo, Alessandro Farias, pela importante ajuda com a análise estatística e preparo da aula, Elaine Oliveira, Rosemeire de Paula, Adriel Moraes, Vânia Ramos, Juliana Sartorelli, Fernando Pradella, Cassiana Abreu e Lidiane Campos.

Ao meu amigo Dr. Carlos Otávio pelos ensinamentos na arte da punção liquorica.

Ao Dr. Sussumo Waki e colaboradores do Departamento de Patologia Clínica por ceder o espaço e material para coleta do LCR e sangue dos pacientes.

À equipe multidisciplinar do Ambulatório de Esclerose Múltipla pelo apoio e ajuda no atendimento dos pacientes: Leonardo de Deus, Alfredo Damasceno, Juan Cabanillas, Stella Maris, Marcos Barg, Isilda, Solaine, Sônia, Ivonilde e residentes de neurologia.

À FAPESP e CAPES pela ajuda financeira na realização deste estudo.

“Tão importante quanto conhecer a doença que o homem tem, é conhecer o homem que tem a doença.”

**Sir William Osler**

A Esclerose Múltipla (EM) é uma doença primária do sistema nervoso central. Geralmente, expressa-se numa fase clínica de surto e remissão, mediada por lesões focais inflamatórias agudas na substância branca cerebral e medula espinhal, podendo evoluir para uma fase progressiva, mediada por perda axonal e neuronal. Paralelamente ao aumento do conhecimento sobre a participação dos linfócitos na execução da resposta imune, cresce a importância das células dendríticas na subsequente regulação da resposta imune adquirida. O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito do tratamento com o interferon beta na produção de citocinas pelos linfócitos Th17 / Th1 no sangue dos pacientes com EM forma remitente recorrente (EMRR), comparando-os com grupo controle e estudar a concentração de células dendríticas plasmocitóides (pDCs) no líquido cefalorraquiano (LCR) de pacientes com EMRR nas fases aguda e de remissão da doença. Trinta e quatro pacientes, divididos em grupos tratados com interferon  $\beta$  e não tratados, e um grupo controle de 20 voluntários sadios, foram avaliados quanto a resposta de linfoproliferação de células mononucleares extraídas do sangue periférico e colocadas em cultura com estímulo específico e inespecífico, além do grau de produção de citocinas pró- e anti- inflamatória. Posteriormente, a concentração de pDCs foi mensurada no LCR e sangue periférico de pacientes em fase de surto e em fase remissão da EMRR, comparadas com pacientes com doenças não inflamatórias do sistema nervoso central, analisados por citometria de fluxo. Os resultados demonstraram que o tratamento com o IFN- $\beta$  diminui a resposta proliferativa fisiológica dos linfócitos T de pacientes em tratamento, e

modifica o padrão de citocinas pró- (IFN- $\gamma$  e IL-17) e anti- inflamatória (IL-10) nos pacientes com EMRR. As pDCs estão aumentadas no líquido de pacientes em surto, quando comparada a fase de remissão, sem correspondência no sangue periférico, indicando uma provável migração seletiva.

Multiple sclerosis (MS) is a primary disease of the central nervous system, clinically characterized by relapses mediated by acute inflammatory lesions in white matter. With time, the disease could evolve to a neurodegenerative phase, characterized by axonal loss. In parallel to the importance of T helpers lymphocytes in the genesis of disease, enhance the knowledge about the participation of dendritic cells in orchestrating the immune response. The objective of this study is to evaluate the effect of interferon beta therapy on the cytokine production of Th1 and Th17 subsets from MS patients, comparing with controls, and to study the plasmacytoid dendritic cells concentration in cerebrospinal fluid of MS patients in different phases, relapse and remitting, of disease. The proliferative response of lymphocytes from PBMC from thirty four patients divided in two groups, interferon beta therapy and no treatment, and a control group with twenty individuals were evaluated in culture with specific and non specific stimulation. After that, the level of pro and anti-inflammatory cytokine production were measure. In a second step, the pDCs concentrations were measured in CSF and PBMC of patients in different phases, comparing with patients with others non inflammatory diseases. The results showed that interferon beta therapy diminished the proliferative response of T lymphocytes compared with the non treated group and modify cytokine production of IFN- $\gamma$ , IL-17 and IL-10 in MS patients. The pDCs were increased in CSF in phase of relapse compared with remission, with no corresponding increasing in PBMC, indicating a selective migration.

## Lista de Abreviaturas.

---

- APC – células apresentadoras de antígeno
- BCR – receptor de células B
- BOC – bandas oligoclonais
- CD – grupamento de diferenciação das células
- CTLA-4 – antígeno de linfócitos T citotóxicos
- DC – células dendríticas (p) plasmocitóides e (m) mielóides
- EAE – encefalomielite experimental auto-imune
- EDSS – escala de incapacidade funcional de Kurzke
- EM – esclerose múltipla
- EMRR – esclerose múltipla forma recorrente remitente
- EMSP – esclerose múltipla forma secundariamente progressiva
- HLA – antígeno leucocitário humano
- ICAM – molécula de adesão intercelular
- IFN - interferon
- IgG – imunoglobulina G
- IL - Interleucinas
- LCR – líquido cefalorraqueano
- MBP – proteína básica de mielina
- MHC – complexo de histocompatibilidade principal
- MAG – glicoproteína associada a mielina
- MOG – glicoproteína da mielina do oligodendrócito
- NAbs – anticorpos neutralizantes contra IFN- $\beta$

PLP – proteína proteolipídica

PHA - fitohemaglutinina

SNC – sistema nervoso central

TCR – receptor de célula T

TGF – fator transformador de crescimento

Th – linfócitos T auxiliares

TNF – fator de necrose tumoral

VCAM – molécula de adesão vascular celular

VLA-4 – alfa 4 beta 1 integrina

	<b>Pág.</b>
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	16
2. OBJETIVOS.....	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
3.1. Sujeitos.....	33
3.2. Amostras de líquido e sangue periférico.....	35
3.3. Procedimentos laboratoriais.....	35
3.31 Bandas oligoclonais de IgG.....	35
3.32 Separação das células mononucleares e cultura celular.....	36
3.33 Teste de linfoproliferação.....	36
3.34 Quantificação de Citocinas.....	36
3.35 Análise das pDCs por citometria de fluxo.....	38
3.4 Análise estatística.....	38
4. RESULTADOS.....	39
4.1 Resposta proliferativa de linfócitos estimulados com PHA e mielina humana.....	40
4.2 Determinação dos níveis de citocinas pró e anti-inflamatória no sobrenadante de cultura de leucócitos de pacientes com EM tratados ou não com o INF- $\beta$ .....	43
4.21 Dosagem de IL-17.....	43

4.22 Dosagem de IFN- $\gamma$ .....	43
4.23 Dosagem de TNF- $\alpha$ .....	44
4.24 Dosagem de IL-10.....	44
4.3 Análise das pDCs presentes no líquido cefalorraquiano e sangue venoso periférico de pacientes com EM em surto e em remissão.....	47
5. DISCUSSÃO.....	49
6. CONCLUSÃO.....	57
7. REFERÊNCIAS.....	59
8. ANEXOS.....	70
8.1 Anexo 1- Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.....	70
8.2 Anexo 2- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), conforme resolução 196/96.....	72
8.3 Anexo 3– Ficha de Atendimento Ambulatorial.....	74
8.4 Anexo 4– Critérios de McDonald revisados 2005 para Esclerose Múltipla .....	76
8.5 Anexo 5- Artigo submetido periódico Multiple Sclerosis Journal 2010.	77

A Esclerose Múltipla (EM) é uma doença que afeta aproximadamente 2,5 milhões de pessoas no mundo e 400.000 nos Estados Unidos (1). Apresenta incidência maior em adultos jovens, na faixa etária 20 a 50 anos de idade, e mais no sexo feminino, numa relação aproximada de 2:1 (2). No Brasil, não existem muitos estudos de prevalência. Em julho de 1997, Callegaro e colaboradores identificaram em torno de 1500 pacientes com EM clinicamente definida na cidade de São Paulo, resultando numa prevalência geral de 15/ 100.000 habitantes. A prevalência encontrada pelo mesmo grupo e na mesma cidade, em 1990, era de 4,27/ 100.000 habitantes (3). Comparando-se os dados e considerando o maior acesso da população aos exames de imagem, maior treinamento dos médicos generalistas para o diagnóstico precoce da EM, assim como, melhor acesso aos médicos neurologistas, este número pode estar subestimado nos dias atuais.

A EM é uma doença primária do sistema nervoso central (SNC). Geralmente, se expressa numa fase clínica de surto e remissão, mediada por lesões focais inflamatórias agudas na substância branca cerebral e medula espinhal, podendo evoluir para uma fase progressiva, mediada por perda axonal e neuronal. As conseqüências da inflamação, como desmielinização, remielinização incompleta e gliose, parecem sensibilizar os axônios remanescentes a novos insultos, encurtando seu tempo de vida (4,5). Diante destes fatos, estudos têm demonstrado que intervenções precoces na fase inflamatória da doença atrasam ou podem até prevenir o desenvolvimento da fase progressiva degenerativa (5,6).

A etiologia da EM é desconhecida, mas admite-se que se trata de uma doença com etiologia multifatorial, de natureza auto-imune, na qual o fator ambiental, provavelmente de origem infecciosa, e a susceptibilidade genética parecem ter um papel essencial na sua determinação (5)

Os estudos conduzidos no modelo experimental da EM, a encefalomielite experimental auto-imune (EAE), foram fundamentais para o entendimento dos mecanismos imunológicos envolvidos no processo de desmielinização da doença. A EAE pode ser induzida ativamente em animais geneticamente susceptíveis pela imunização com mielina e seus componentes, como a proteína básica de mielina (MBP), proteína proteolípídica (PLP), glicoproteína associada à mielina (MAG), glicoproteína da mielina do oligodendrócito (MOG) e peptídeos encefalitogênicos derivados desses antígenos (7,8). Tanto a EM, como a EAE, são consideradas doenças auto-imunes mediadas por linfócitos T. No modelo experimental essa evidência é direta, pois a EAE pode ser transferida para animais normais por clones de linfócitos sensibilizados aos componentes da mielina (7). Na EM, as evidências são indiretas, mas indicam a importante participação dos linfócitos T auto-reativos no desencadeamento da doença. A presença de linfócitos T reativos à mielina foi descrita em indivíduos normais, mas estão aumentados ou ativados no sangue periférico de portadores de EM, principalmente na fase de exacerbação da doença (9-11). Essas observações foram confirmadas pelos recentes relatos sobre o efeito benéfico do tratamento da EM com o anticorpo monoclonal humanizado (natalizumab), que diminuiu significativamente a migração dos linfócitos T para o SNC (12).

Os linfócitos T sofrem o processo de maturação e diferenciação no timo. No córtex tímico, rearranjam os genes para a expressão dos receptores específicos de células T (TCR) para o antígeno e expressam as moléculas dos co-receptores CD4 ou CD8 (13). A migração desses timócitos duplo-positivos do córtex para a medula do timo permite a interação dessas células com as células do microambiente tímico, ou seja, as células epiteliais, dendríticas e macrófagos, que expressam altos níveis de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I e classe II. As células epiteliais da medula do timo normalmente expressam inúmeros genes de antígenos específicos do tecido, também conhecidos como antígenos dos tecidos periféricos, que estão normalmente expressos nos órgãos da periferia e aparentemente não são necessários para a função das células epiteliais da medula tímica. Durante a seleção negativa, essas moléculas antigênicas são apresentadas aos timócitos como antígenos próprios (13). Quando esses antígenos são apresentados com muita avides, esses timócitos entram em apoptose caracterizando um processo chamado de tolerância central.

Os mecanismos de seleção no timo, no entanto, não garantem que todos os linfócitos T potencialmente auto-reativos sofram o processo de apoptose (13). Atualmente, entende-se que o organismo convive com os clones de linfócitos auto-reativos e auto-anticorpos de uma forma harmônica. Inclusive, há referências de que esse equilíbrio seja fundamental para a homeostase do próprio organismo (13). Essas evidências indicam que as células potencialmente autorreativas que deixam o timo estão circulando na periferia sob um controle complexo que é conhecido por tolerância periférica.

As causas que levam ao aparecimento das doenças auto-imunes ainda são obscuras, mas fatores genéticos, ambientais, hormonais e anormalidades imunológicas são cruciais nesse processo. Entre os fatores imunológicos, o desequilíbrio entre os linfócitos T efetores e os linfócitos T reguladores foi demonstrado em várias doenças auto-imunes inclusive na EM (14).

Na EM, as células T autorreativas para os componentes da mielina são, portanto, geradas na periferia e migram para o SNC. Em 1986, Robert Coffman e Tim Mosmann descreveram a heterogeneidade das populações de linfócitos T CD4, conforme o perfil de citocinas produzidas: os linfócitos Th1 produzem interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), que protege o organismo contra patógenos intracelulares e promovendo a resposta imune celular. Os linfócitos Th2 produzem as citocinas IL-4, IL-5, IL-13 e IL-24 promovendo proteção contra patógenos extracelulares através da resposta imune humoral. Vários estudos mostraram que as citocinas pró-inflamatórias produzidas pelos linfócitos Th1 estavam envolvidas nos danos causados à bainha de mielina (15), enquanto citocinas com efeito anti-inflamatório como a IL-10 e TGF- $\beta$  são responsáveis pela redução da resposta inflamatória observada principalmente durante os surtos da EM (16).

A EAE foi inicialmente descrita como uma doença mediada por linfócitos Th1. Posteriormente, o efeito danoso do IFN- $\gamma$  no processo de desmielinização foi confirmado com descrição da IL-12, uma citocina indutora de IFN- $\gamma$  que também está aumentada na EM (17). No entanto, a observação que animais geneticamente deficientes para IFN- $\gamma$  ou para seu receptor específico desenvolviam EAE normalmente, sugeriu a existência de outra subpopulação de linfócitos efetores nesse modelo (18-20). À descoberta da IL-23, interleucina que

apresenta mesma subunidade p40 que a IL-12, mas difere por outra subunidade p19, como agente indutor de outra subpopulação de linfócitos T encefalitogênicos na EAE, permitiu a identificação posterior das células Th17 na inflamação cerebral (21,22). Estudos recentes mostraram o importante papel da IL-17 no desenvolvimento da EAE, sendo que as células T CD4 produtoras dessa citocina foram descritas como linfócitos Th17 (23). Elas recebem este nome pela grande produção de IL- 17A, 17F, 21 e 22, cuja função principal é combater, juntamente com as outras células efetoras, patógenos extracelulares tão diversos como bactérias Gram-positivas (*Propionibacterium sp*), Gram-negativas (*Citrobacter sp*, *Klebsiella sp*, *Bacterioides sp*, *Borrelia sp*), bacilos álcool-ácido-resistentes (*Mycobacterium tuberculosis*) e fungos (*Cândida sp*) (24). A IL-17A, principal citocina produzida por estes linfócitos, tem efeito semelhante à IL-17F e induz a produção de citocinas pró- inflamatórias, quimiocinas e metaloproteinases por vários tecidos e tipos celulares, resultando no recrutamento de neutrófilos para o sítio inflamatório (25).

A diferenciação dos linfócitos Th17 é regulada por uma complexa rede de citocinas. Enquanto o TGF- $\beta$  promove a diferenciação de linfócitos T reguladores que apresentam a capacidade de inibir a resposta inflamatória, a presença de IL-6 produzida pela resposta imune inata no microambiente onde a resposta imune acontece, somada ao efeito de TGF- $\beta$ , promove a diferenciação das células Th17 (24,26). A IL-23 atua na expansão e manutenção da população dos linfócitos Th17 contribuindo para o aumento da gravidade da EAE (27,28). Além da IL-6 e TGF- $\beta$ , outras citocinas incluindo a IL-1- $\beta$ , IL-13, IL-18, IL-22, IL-23 e TNF- $\alpha$  participam da diferenciação e expansão da Th17 (24,26). Por outro lado, alguns estudos

demonstraram que citocinas como a IL-4, IFN- $\gamma$  e IFN- $\alpha$  inibem a expansão das Th17 mediadas pela IL-23 (30). A IL-27, membro da família IL-12/IL-23, também foi descrita como um potente regulador negativo da diferenciação da Th17. Trabalho recente mostra que a IL-27 inibe a diferenciação da Th17 e a ausência de expressão da IL-27 aumenta a diferenciação e infiltração das células T produtoras de IL-17 nos tecidos do SNC, contribuindo para a exacerbação da EAE (31). O fator de transcrição específica desta linhagem é o ROR- $\gamma$ t (Retinoic Acid Orphan Nuclear Receptor), assim como T-BET (T-box expressed in T cells) nas células Th1, GATA3 nas Th2 e FOXP3 nas células T regulatórias (24).

Os dados que demonstram a participação das Th17 nos processos de desmielinização em modelos animais são que intervenções na via de formação da resposta Th1, pioravam ou mantinham a doença inalterada (18); intervenções na via Th17 atenuavam ou melhoravam a doença; a transferência de células Th17 reativas à mielina em ratos saudáveis induzia EAE (20); e a IL-17 possuía grande efeito inflamatório e induzia dano tecidual durante o curso de doenças auto-imunes. Níveis altos desta também já foram demonstrados em pacientes com outras doenças auto-imunes como artrite reumatóide, doença inflamatória intestinal e psoríase (32-36).

Kebir e colaboradores demonstraram a expressão de receptores de IL-17 e IL-22 (IL-17R e IL-22R) nas células endoteliais da barreira hematoencefálica de pacientes com EM e no modelo EAE em ratos, *in vitro* e *in vivo*, que quando entravam em contato com suas respectivas interleucinas, rompiam as junções intercelulares e facilitavam a migração de linfócitos Th17 auto-reativos (37). Também foi demonstrado que estas células produziam granzima B, com

considerável atividade citolítica, quando em contato com culturas enriquecidas com neurônios fetais humanos (37). Frisullo e colaboradores detectaram grande produção espontânea de IL-17 e IFN- $\gamma$  a partir de células sangüíneas mononucleares periféricas (PBMC) de pacientes com Síndrome Clínica Isolada (CIS) e EM forma remitente-recorrente (EMRR) na fase aguda – subaguda da doença, definida como até 30 dias após o surto. Nas formas secundariamente progressivas (EMSP) e na fase de remissão da EMRR, tais níveis não se repetiram, sugerindo a relação da IL-17 com a atividade e indução da doença (38).

Em humanos, a depender do grau de infiltrado de células mononucleares e do nível de destruição da bainha de mielina, os patologistas definem, em autópsias, áreas do cérebro de pacientes com EM em lesões agudas, lesões crônicas ativas, lesões inativas e substância branca aparentemente normal (39). Em recente estudo, Tzartos e colaboradores demonstraram grande infiltrado de células Th17 em áreas ativas, como lesões agudas e bordas de lesões crônicas ativas, quando comparadas com áreas inativas e substância branca de aparência normal. Além disto, não apenas células Th17 produziam IL-17, mas também astrócitos e oligodendrócitos nas áreas de inflamação, contribuindo para manutenção de altos níveis locais desta citocina, quando comparadas com cérebros normais (39). Isto pode significar que elas estão envolvidas não apenas na indução das lesões, mas também na persistência delas.

Num estudo japonês, Ishizu e colaboradores detectaram altos níveis de IL-8 no LCR de pacientes com EMSR e EM forma óptico-espinhal e IL-17 apenas nesta última, após pesquisa de 16 diferentes citocinas. Encontraram uma correlação positiva entre níveis de IL-17 e IL-8 e o grau da escala do estado da incapacidade

funcional de Kurzke (EDSS), índice de IgG e proteína e extensão das lesões medulares vistas pela imagem de ressonância nuclear magnética (IRM) dos pacientes (40). Pesquisaram apenas linfócitos Th1 e Th2 nestas amostras, encontrando níveis relativamente altos dos primeiros nas duas formas de EM, quando comparados com controles. Além do mais, identificaram níveis significativos de células Th2 na forma óptico-espinhal, que pode corresponder à associação com os anticorpos anti-Aquaporina 4, da neuromielite óptica ou Doença de Devic (40).

A ativação das células T autorreativas levando ao processo de desmielinização pode ser reduzida ou neutralizada pelos linfócitos T reguladores (Tregs). O estudo de células reguladoras nas doenças auto-imunes despertou grande interesse na última década. As Tregs exercem papel importante na manutenção da tolerância central e periférica aos antígenos próprios, assim como atuam na proteção contra uma resposta exacerbada aos antígenos externos (41). O conceito de células T supressoras da resposta imune foi introduzido no começo dos anos 70 por GERSHON e KONDO (42). No entanto, sempre houve muita dificuldade na identificação dessas células devido à falta de ferramentas de análise molecular e celular. Em 1995, Sakaguchi e colaboradores descreveram a existência de uma população celular  $CD4^+CD25^+$  que apresentava uma potente atividade imunorreguladora (43). Em 2003, com a identificação do fator de transcrição *forkhead box 3* (Foxp3), o estudo das células reguladoras teve um considerável avanço, uma vez que esse fator foi associado ao desenvolvimento e função das Tregs (44). Mutação no gene Foxp3 causa uma síndrome linfoproliferativa em humanos, caracterizada por disfunção imunológica e pela falta

de imunorregulação. Os mecanismos pelos quais as Tregs suprimem a resposta imunológica ainda estão sendo estudados. Essas células podem atuar tanto através do contato célula-célula, como através da liberação de fatores como citocinas com efeito antiinflamatório (45). A contribuição do mecanismo do contato célula-célula na imunossupressão causada pelas Tregs foi mostrada em cultura de células, onde as células reguladoras não eram capazes de inibir a resposta proliferativa de linfócitos, quando foram separadas por membranas semipermeáveis (44,46). As Tregs podem ainda lisar os linfócitos respondedores por mecanismos dependentes de granzimas e/ou perforinas (47,48), podem emitir sinais reguladores negativos para as células alvo, como aumentar os níveis intracelulares de AMP cíclico, que leva a inibição da resposta proliferativa dos linfócitos T e síntese de IL-2 (49). Elas podem também aumentar ou diminuir a expressão de CD80 ou CD86 nas células apresentadoras de antígeno, assim como estimular as células dendríticas a expressar a enzima indolamina 2,3 dioxigenase (IDO). Essa enzima participa do catabolismo do triptofano em quinurenina, que é tóxica para as células T (50,51). Esses mecanismos são dependentes da expressão de CTLA4 ou CD152 nas células T reguladoras que se ligam as moléculas CD80 e CD86. As Tregs ativadas podem ainda matar as células apresentadoras de antígeno inclusive os linfócitos B (52).

Paralelamente ao aumento do conhecimento sobre a participação dos linfócitos na regulação da resposta imune, cresce a importância das células dendríticas no subsequente controle da resposta imune adquirida. Essas células são apresentadoras profissionais do antígeno, especializadas em capturá-lo, processá-lo, conduzi-lo aos órgãos linfóides, e finalmente apresentá-lo aos

linfócitos T (53). Como iniciadoras da resposta imune, as células dendríticas controlam e orquestram o sistema imunológico. Há pelo menos dois tipos de células dendríticas atuando de forma distinta na indução da resposta efetora e tolerância imunológica: as células dendríticas mielóides (mDCs) e as células dendríticas plasmocitóides (pDCs). As células mDCs são capazes de induzir resposta tanto Th1 como Th2 dependendo das condições de maturação. São células que expressam principalmente o marcador CD11c e podem ser encontradas em vários tecidos, órgãos linfóides secundários assim como no sangue (54). As células pDCs, quando ativadas, são capazes de produzir até mil vezes mais IFN do tipo I (alfa e beta) que quaisquer outras células do organismo (55). A capacidade da pDC secretar IFN do tipo I depende de sensores celulares (Toll-like receptors- TLR) que rapidamente detectam a presença de vírus DNA ou RNA (56). A utilização de camundongos geneticamente deficientes em TLR-9 permitiu demonstrar que as pDCs necessitam dos TLR9 e TLR7 para responder aos vírus - DNA incluindo herpes simples e citomegalovírus (57,58).

Quando recém isoladas, tanto as pDCs humanas como as de murinos expressam níveis baixos de moléculas MHC de classe I e classe II, CD86 e níveis não detectáveis de CD80 e CD40 (59,60). São pobres indutoras de proliferação das células T e também apresentam o antígeno de forma deficiente, pois não capturam, processam ou ligam o peptídeo às moléculas de MHC de forma tão eficiente como as células mDCs. No entanto, quando ativadas, as pDCs expressam as moléculas de MHC e as co-estimulatórias, aumentando a capacidade de ativar as células T, principalmente os linfócitos T CD8 e CD4 Th1 específicos para os antígenos endógenos e virais (55).

As pDCs também possuem plasticidade funcional em termos de induzir diferentes subtipos de células Tregs. Foi demonstrado que as pDCs apresentam a propriedade de induzir a diferenciação de células T reguladoras produtoras de IL-10 tanto em humanos (59) como em animais (61). Estudo prévio demonstrou que as pDCs humanas quando ativadas por ODN-CpG induzem a diferenciação de células reguladoras CD4+CD25+ *in vitro* (59).

Na EM, as pDCs vem assumindo particular importância na estimulação e regulação das células T efetoras. Recentes estudos na EAE mostram que as pDCs facilitam a diferenciação dos linfócitos T auxiliares indiferenciados (naive, Th0) em Th17 e, quando depuradas antes da indução da doença, diminui a sua gravidade, mas quando depletadas durante o curso da doença, causam a sua exacerbação (62). Pashenkov e colaboradores demonstraram elevado número de células dendríticas (DCs), mais pDCs, no líquido de pacientes com neuroborreliose e outras doenças inflamatórias do SNC, incluindo EM, quando comparadas a doenças não inflamatórias do SNC. Não foi encontrada correspondente elevação das DCs no sangue periférico de todos os grupos (63). O IFN tipo I produzido pelas pDCs é capaz de atrair e mobilizar granulócitos ativados e linfócitos T para o sítio inflamatório, mas por outro lado, pode induzir e ativar Tregs que atenuam a resposta inflamatória. Estudos demonstram que as pDCs induzem as células T reguladoras, principalmente, pelo aumento da expressão daIDO (64).

Nos últimos anos, várias medicações foram lançadas com sucesso no mercado, chamadas de terapias modificadoras da doença, mas com um controle parcial sobre a EM (65). Os Interferons beta recombinantes (IFN- $\beta$ ) e o Acetato de Glatirâmer foram os primeiros a serem desenvolvidos e representam a intervenção

terapêutica mais prescrita para os pacientes com EMRR. Eles apresentam resultados clínicos e radiológicos semelhantes, demonstrando aproximadamente 30% de redução do número de surtos anuais no grupo tratado quando comparado com placebo, além de reduzir a taxa de progressão secundária relacionada a atividade inflamatória (66,67,68,69). Estes valores representam uma resposta terapêutica parcial e ainda existem subgrupos de pacientes que respondem diferentemente a cada terapia. A heterogeneidade pode ter origem nas bases genéticas que determinam as diferenças na migração celular, proliferação, diferenciação, apresentação de antígeno e regulação de citocinas e, também, ao surgimento de anticorpos neutralizantes contra IFN- $\beta$  (NAbs) (70).

Os mecanismos exatos de ação do IFN- $\beta$  não são muito bem reconhecidos, mas se estipula que ele atua, após estímulo dos receptores de IFN $\alpha/\beta$ , suprimindo a proliferação e migração dos linfócitos T, diminua a produção de IFN- $\gamma$  e a expressão de moléculas de MHC classe II, iniba produção de metaloproteinases teciduais e liberação de moléculas de adesão vascular-celular, e aumente expressão de IL-10. O IFN- $\beta$  estimula também a função das Tregs, que é importante para atenuar o processo inflamatório (11,71).

Existem duas formas de IFN- $\beta$  comercialmente disponíveis: IFN- $\beta$ -1a e IFN- $\beta$ -1b, com a mesma eficácia clínica, porém com origens diferentes. A primeira é produzida a partir de linhagens celulares derivadas de ovário de hamster chinês e a segunda, a partir *Escherichia coli* modificada geneticamente. Como as bactérias não glicosilam proteínas, a IFN- $\beta$ -1b não apresentam radical glicosil, tornando-as mais ávidas pela albumina sérica humana. Isto implica na necessidade de uma

maior dosagem para ter a mesma equivalência de atividade da IFN- $\beta$ -1a, aumentando os riscos do aparecimento de anticorpos NAbs (71). Os efeitos colaterais são geralmente bem tolerados e os mais freqüentes podem ser reação local no sítio de injeção, febre, calafrio, cefaléia e mialgias, semelhante a uma síndrome gripal. Os mais graves e que, caso persistente, determinam suspensão da terapia são leucopenia e hepatite medicamentosa (71).

Em 2006, foi aprovado pelo FDA outro tratamento para EMRR, o anticorpo monoclonal anti- $\alpha$ 4 $\beta$ 1 integrina (VLA-4), que atua impedindo a migração de linfócitos T auto-reativos para o SNC. Apresentou redução no número anual de surtos em 50-70% e redução de lesões vista pela imagem de ressonância magnética (RNM) em 80-90% (12). Porém, não existem estudos comparando diretamente a eficácia deste com os imunomoduladores e a comparação dos resultados dos estudos pivô de cada droga não é possível pelas diferenças metodológicas e características dos pacientes examinados (72).

Os dados apresentados sugerem que os linfócitos T efetores desempenham um importante papel na patogênese da EMRR, como promotores e moduladores da inflamação tecidual, agindo em conjunto com as outras células do sistema imunológico adaptativo e inato, como as pDCs e outras APCs (73). Diante do exposto, fica clara a necessidade de mais estudos para uma maior compreensão da fisiopatologia da EM e para a criação de novos métodos terapêuticos.

## **Objetivos.**

---

Avaliar o efeito do tratamento com o IFN beta na produção de citocinas pelos linfócitos Th17/Th1 no sangue dos pacientes com Esclerose Múltipla, comparando-os com grupo controle.

Estudar a concentração de pDCs no LCR de pacientes com EMRR nas fases aguda e de remissão da doença.

### Sujeitos:

Pacientes com diagnóstico de EMRR segundo os critérios de McDonald revisado (74-75), atendidos no Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), procedentes de Campinas e municípios vizinhos do Estado de São Paulo, durante o ano de 2009. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Médicas desta instituição (FCM-UNICAMP), registrada na Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) sob o número FR – 239409. Depois de aceite da participação no estudo, o paciente assinava o termo de consentimento livre e esclarecido. Os pacientes foram recrutados durante acompanhamento no referido ambulatório.

No período, foram selecionados 34 pacientes e 20 voluntários, divididos em três grupos:

- I. 17 pacientes recém diagnosticados com EMRR, ainda sem tratamento e durante remissão clínica (17 mulheres, média de idade 34 anos).
- II. 17 pacientes com EMRR tratados com o imunomodulador IFN- $\beta$  e durante remissão clínica (13 mulheres e quatro homens, média de idade 29 anos).
- III. 20 voluntários como controles (16 mulheres e quatro homens, média de idade 29,5 anos).

Os testes laboratoriais de LCR e sangue periférico foram realizados durante procedimento diagnóstico de rotina do ambulatório de Esclerose Múltipla.

Durante consulta, as informações eram coletadas através de ficha padronizada (em anexo), que continham idade, gênero, número do registro hospitalar, telefone para contato, critérios de McDonald, data do primeiro surto, número total de surtos, escala de incapacidade funcional de Kurtzke (EDSS) (76), uso prévio de imunomoduladores e imunossupressores, presença de bandas oligoclonais no LCR e data da coleta.

Durante o estudo, foram analisados em separado, os pacientes com EMRR na fase de surto e na fase de remissão, que apresentavam indicação para realização do estudo do líquido cefalorraquiano, comparando com pacientes submetidos à investigação diagnóstica que resultaram em doença neurológica não inflamatória. Geralmente, estes pacientes estavam iniciando acompanhamento no HC, Centro de Referência em Esclerose Múltipla da região metropolitana de Campinas, procedentes de Unidades Básicas de Saúde e cidades vizinhas. Após avaliação e confirmação diagnóstica, permaneceram com acompanhamento trimestral e receberam tratamento adequado.

A fase de surto foi caracterizada por surgimento ou piora de disfunção clínica neurológica durante 1 a 7 dias, na ausência de sinal clínico ou laboratorial de infecção no momento da punção lombar e da coleta de sangue periférico, criando-se três grupos:

- I. 7 pacientes com EMRR em surto (quatro sem tratamento prévio, dois em uso de IFN- $\beta$  e um azatioprina / IFN- $\beta$ ), sem uso de corticóide nos últimos 30 dias (6 mulheres e 1 homem, média de idade de 34 anos).

- II. 11 pacientes com EMRR em remissão (oito sem tratamento prévio e três em uso de IFN- $\beta$ ) sem uso de corticóide nos últimos 30 dias (9 mulheres e 1 homem, média de idade de 34 anos).
- III. 8 pacientes com doenças neurológicas não inflamatórias, consistindo de 2 com AVC isquêmico, 2 com pseudotumor cerebri, um com neuropatia óptica hereditária de Leber, um com epilepsia, um com hidrocefalia de pressão normal e um paciente com cefaléia pós trauma (6 mulheres e 2 homens, média de idade de 46 anos).

#### Amostras de LCR e sangue periférico:

Todas as amostras foram obtidas após primeira consulta, durante a rotina laboratorial para exclusão de outras doenças. Neste momento, as amostras da pesquisa eram coletadas: LCR e soro, para pesquisa de bandas oligoclonais por focalização isoelétrica e fenotipagem celular através de citometria de fluxo, e sangue venoso por punção periférica coletados em tubos heparinizados para extração de células mononucleares (PBMC) para cultura, teste de linfoproliferação, armazenamento em trizol e pesquisa do perfil de citocinas no sobrenadante. Amostras foram armazenadas em tubos de polipropileno e estocadas a  $-80^{\circ}$  C até a realização do ensaio proposto.

#### Procedimentos Laboratoriais:

##### *Bandas Oligoclonais de IgG*

A detecção de bandas oligoclonais foi realizada através da focalização isoelétrica que é o método mais sensível para a comprovação da síntese intratecal de IgG (77)

#### *Separação das células mononucleares e cultura celular*

Após extração das células mononucleares por gradiente de Ficoll-Hypaque®, foram feitas contagens na câmara de Neubauer e diluída as células numa concentração de  $1 \times 10^6$  células por mililitro de meio de cultura (RPMI-1640 Sigma Aldrich, MO, USA) enriquecido com 10% de soro humano AB, antibióticos e glutamina. Na placa de 24 poços, cultivado 1ml/poço, cada amostra com dois poços, um com estímulo Fitohemaglutinina (PHA) ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) e outro sem. Após 48 horas, extraído o sobrenadante para pesquisa de citocinas e armazenado a  $-80^\circ \text{C}$  até a testagem.

#### *Teste de linfoproliferação*

As células mononucleares do PBMC ( $2 \times 10^5$  células/poço) foram colocadas em cultura em placas de 96 poços, com  $200 \mu\text{l}$  de meio de cultura padronizado, em triplicata, com e sem estímulo (PHA ou mielina do SNC humano). Quando estimulado com PHA, aguardava-se 48 horas e quando mielina 96 horas, para introdução de timidina radiomarcada. Após 18 horas, as placas eram congeladas a  $-20^\circ \text{C}$ , até a leitura no cintilógrafo.

#### *Quantificação das citocinas*

A IL-17 foi quantificada utilizando kit comercial disponível pelo método ELISA (Applied Biosystem). As microplacas (Immulon I, Nunc, Roskilde, Denmark) foram cobertas com solução padrão do anticorpo de captura da IL-17 (4 µg/ml) e incubadas por 18 h a temperatura ambiente. Após este período de incubação, para evitar possíveis reações inespecíficas, as microplacas foram incubadas com solução 2% de albumina de soro bovino (BSA) em PBS. Após as devidas lavagens, as amostras e a solução de IL-17 recombinante para construção da curva padrão foram adicionados e as microplacas foram incubadas por 2 horas. A seguir, após nova lavagem, foi adicionado anticorpo anti-IL17 marcado com biotina (4 µg/ml) e incubados por mais 2h em temperatura ambiente. Após novas lavagens, foi adicionada solução padronizada de estreptavidina-peroxidase (Sigma Chem, USA), associada a solução reveladora com substrato. Após 30 minutos de incubação em temperatura ambiente, adicionada 50 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4N, para parar a reação, e as microplacas foram lidas em Leitor de ELISA (Labsystem) a 492 nm. As curvas padrões foram feitas e as concentrações das diferentes amostras calculadas em picogramas/ ml. Todas as análises foram realizadas no mesmo momento para minimizar variabilidade intra-ensaio.

As citocinas IL-10, IFN-γ, TNF-α foram dosadas pela metodologia de *Cytometric Bead Array*, utilizando *CBA FLEX SET*, da BD Biosciences (San Diego, CA) conforme descrito pelo fabricante. Resumidamente, 50 µL do sobrenadante de cultura foram incubados com *beads* que contém anticorpos monoclonais ligados à sua superfície específicos para cada citocina, após incubação o anticorpo revelador conjugado com ficoeritrina (PE) específico para cada citocina

foi adicionado e duas horas depois as *beads* foram lavadas e adquiridas em citômetro de fluxo FACSCanto. A análise foi feita pelo software FCAP Array (BD Biosciences).

#### *Análise das pDCs por citometria de fluxo*

A concentração de pDCs em porcentagem entre as outras células mononucleares foi determinada pela marcação do líquido e PBMC com anticorpo monoclonal anti-BDCA2 humano conjugado com APC (Miltenyi Biotec, USA) e anticorpo anti-CD4 humano conjugado com PE (BD Biosciences, USA). Os dados foram adquiridos utilizando citômetro FACSCanto (BD Biosciences) e analisados usando FACSDiva software (BD Biosciences).

#### Análise Estatística

Para descrever o perfil da amostra segundo as diversas variáveis em estudo, foram feitas tabelas de frequência das variáveis categóricas (gênero, etc.) e estatísticas descritivas (mediana, média, desvio padrão, mínimo e máximo) das variáveis contínuas (nível de citocinas, etc.). Para comparação das variáveis de interesse entre os grupos foi utilizado o teste de Mann-Whitney para comparar dois grupos e o teste de Kruskal-Wallis para mais de dois grupos.

A razão de prevalência foi utilizada para comparar os parâmetros, com intervalo de confiança de 95%, tendo significância estatística quando a probabilidade de erro tipo I ( $\alpha$ ) foi <5%. A análise estatística foi realizada com auxílio do software GraphPad Prism 5 for Windows.

## Resultados.

As características clínicas e epidemiológicas dos pacientes estudados estão resumidas na tabela 1:

**Tabela 1 - Sumário dos achados clínicos dos grupos de pacientes e controles estudados**

Parâmetros	EMRR sem tratamento	EMRR imunomodulador	Controles
Número de pacientes	17	17	20
Relação ♀ : ♂	17 : 0	13 : 4	14 : 6
Idade (Mediana, faixa), anos	34 (19 - 51)	29 (19 - 52)	29,5 (21 - 52)
EDSS (Mediana, faixa)	1,5 ( 0 - 6,0)	2,5 (1,0 - 5,0)	n.a.
Taxa anual de surtos (Mediana, faixa), anos	0,8 (0,5 - 2,0)	1,0 (0,4 - 1,8)	n.a.
Duração média de doença, anos	3 (1 - 6)	5 (3 - 7)	n.a.
Presença BOC	10+ / 7 -	12+ / 5 -	n.a.

n.a – não se aplica; BOC - bandas oligoclonais

*Resposta proliferativa de linfócitos estimulados com PHA e mielina central humana.*

As PBMCs dos pacientes e do grupo controle foram separadas, o número de células ajustado para  $1 \times 10^6$  células/ ml de meio de cultura e colocadas em cultura. Parte das células foi estimulada com mitógeno inespecífico PHA e outra parte estimulada com mielina humana. O objetivo desse grupo de experimento foi verificar o efeito do tratamento com o IFN- $\beta$  sobre a ativação dos linfócitos T CD4. A figura 1 mostra que há uma moderada

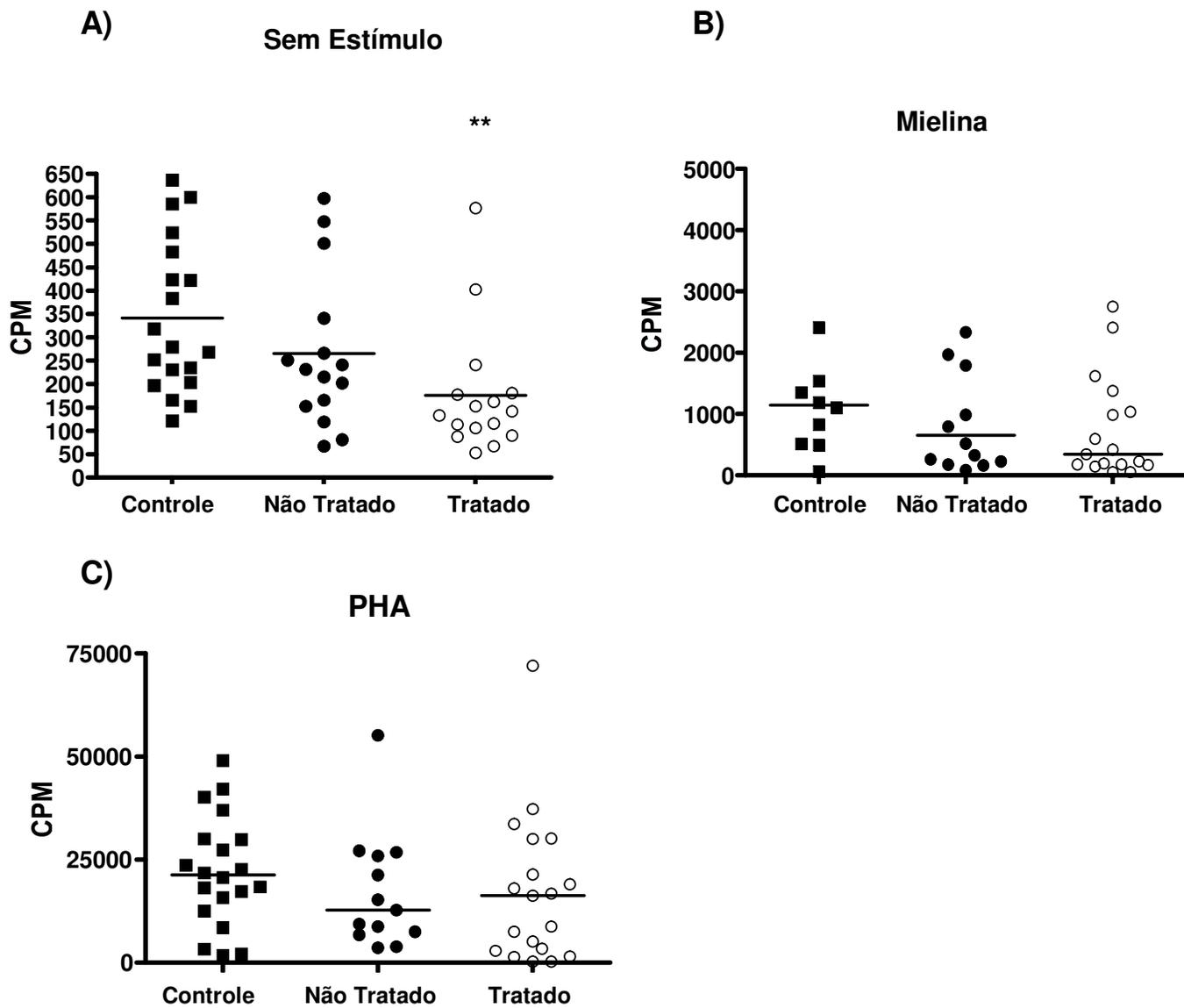
diminuição da resposta à PHA no grupo de pacientes tratados, embora esses valores não atinjam níveis estatisticamente significativos ( $p>0,05$ ). Contudo, quando se analisa o crescimento das células sem estímulo, pode-se observar que os linfócitos dos pacientes tratados com o IFN- $\beta$  respondem bem menos ao estímulo do que com o PHA. Essa observação é relevante, pois reflete o crescimento dos linfócitos de forma fisiológica, sem a interferência dos estímulos exógenos. Durante análise, algumas amostras dos três grupos resultaram em valores indeterminados e não foram contabilizadas na análise estatística, principalmente na estimulação com mielina.

Com relação à resposta proliferativa de linfócitos estimulados pela mielina humana, pode-se observar um discreto aumento da resposta proliferativa dos linfócitos no grupo de pacientes não tratados com o IFN- $\beta$ , sugerindo que o imunomodulador pode atuar diminuindo a expansão dos clones de linfócitos auto-reativos.

**Tabela 2 - Características dos pacientes e teste linfoproliferação**

<b>Parâmetros</b>	<b>Controles</b>	<b>EMRR sem tratamento</b>	<b>EMRR imunomodulador</b>
<b>Número de pacientes</b>	20	17	17
<b>Relação ♀ : ♂</b>	14 : 6	17 : 0	13 : 4
<b>Idade (Mediana, faixa), anos</b>	29,5 (21 - 52)	34 (19 - 51)	29 (19 - 52)
<b>Teste LPF – sem estímulo</b>	299,5 (121 - 1391,7)	221,7 (67,7 - 598)	152,7 (52,7 - 3686)
<b>Teste LPF – mielina</b>	777,3 (62,3 - 6.267)	439,7 (76,7 - 17.955)	422 (55,3 - 9.349)
<b>Teste LPF – PHA</b>	21.203 (1.782 - 49.039)	9.045 (407 - 55.094)	16.245 (226 - 71.970)

PHA - fitoaglutinina, LPF – linfoproliferação



**Figura 1** – Resposta proliferativa de linfócitos em pacientes tratados e não tratados com IFN- $\beta$ , e grupo controle. **A**- sem estímulo. **B**- com estímulo específico – mielina. **C**- com estímulo inespecífico – PHA. Testes realizados em triplicatas e valores em contagem por minuto (cpm). Os pontos representam indivíduos. Algumas amostras resultaram em valor indeterminado e não foram contabilizados.

*Determinação dos níveis de citocinas pró- e anti- inflamatória no sobrenadante de cultura de leucócitos de pacientes com EM tratados ou não com o IFN- $\beta$ .*

Depois, avaliou-se o grau de ativação das células T efectoras, através do perfil de citocinas. Como a simples mensuração de citocinas no soro apresenta muitas variáveis que dificultam a análise dos linfócitos, extraíram-se as células mononucleares do sangue periférico, as quais foram cultivadas. Após 48 horas de cultivo em estufa, sem e com estímulo PHA, o sobrenadante dos pacientes e controles foi analisado.

#### *Dosagem de IL-17*

A figura 2A mostra os níveis de IL-17 do grupo de pacientes tratados e não tratados com o IFN- $\beta$  em relação ao grupo controle. Pode-se observar que o tratamento leva a uma moderada diminuição dos níveis de IL-17 em relação aos outros grupos, no entanto, essa redução não foi estatisticamente significativa. No grupo não tratado, não foi detectado IL-17 em um paciente e no grupo tratado, dois pacientes. Na análise do sobrenadante das amostras não estimuladas, não foi detectado nível de IL-17 nos três grupos na grande maioria das vezes. Quando detectado, os níveis eram muito baixos. Alguns pacientes dos três grupos apresentaram valores indeterminados e não foram incluídos na análise.

#### *Dosagem de IFN- $\gamma$*

A figura 2 B mostra os níveis de IFN- $\gamma$  do grupo de pacientes tratados e não tratados com o IFN- $\beta$  em relação ao grupo controle. Pode-se observar que o

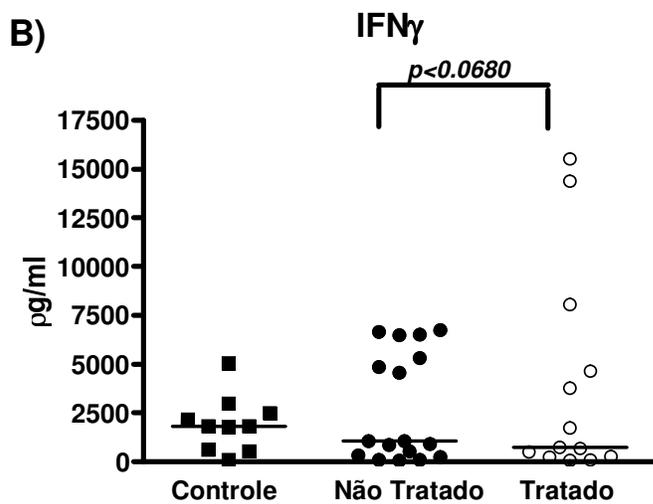
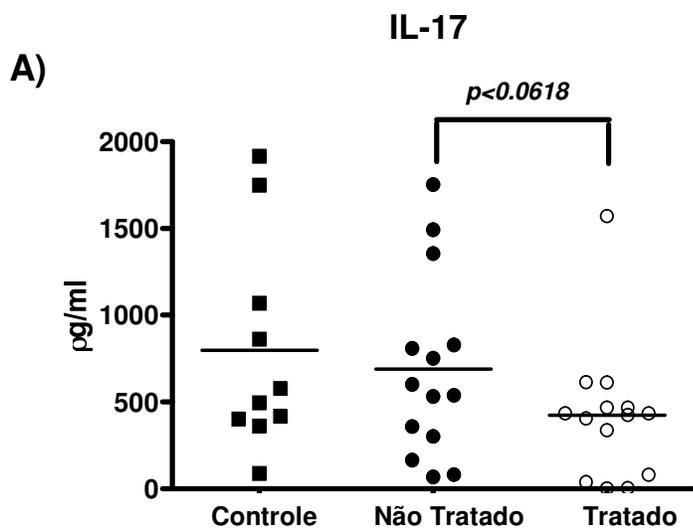
tratamento leva a uma moderada diminuição dos níveis de IFN- $\gamma$  em relação aos outros grupos, no entanto, essa redução não foi estatisticamente significativa.

#### *Dosagem de TNF- $\alpha$*

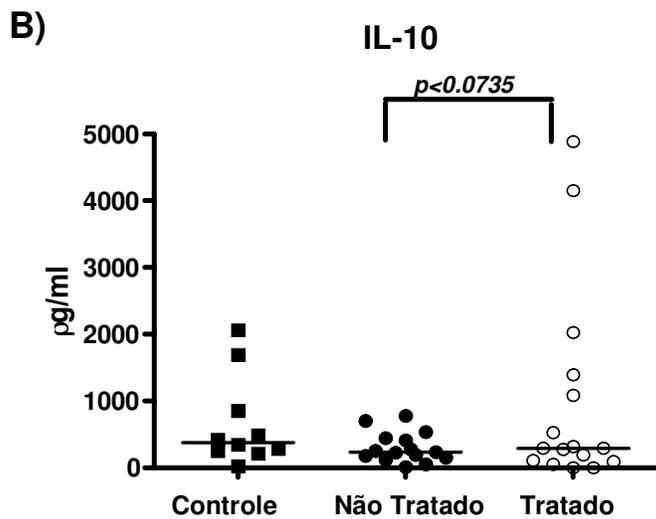
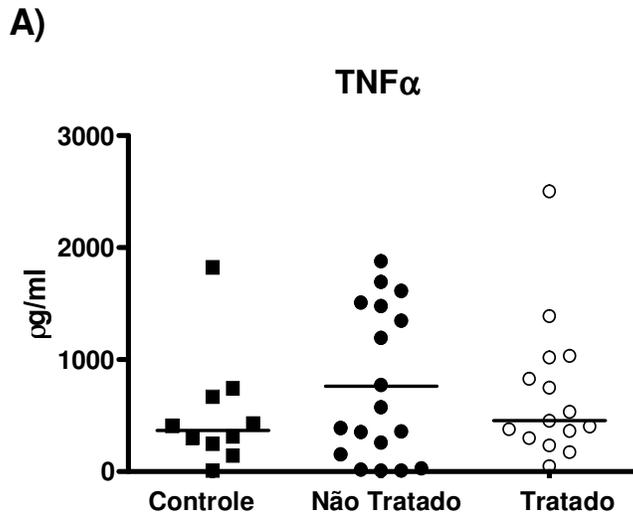
A figura 3 A mostra os níveis de TNF- $\alpha$  do grupo de pacientes tratados e não tratados com o IFN- $\beta$  em relação ao grupo controle. Pode-se observar que os pacientes apresentam níveis mais elevados que os controles e quando comparados os grupos tratados e não tratados, o IFN- $\beta$  leva a uma moderada diminuição dos níveis de TNF- $\alpha$ , no entanto, essa redução não foi estatisticamente significativa. Alguns pacientes dos três grupos apresentaram valores indeterminados e não foram incluídos na análise.

#### *Dosagem de IL-10*

A figura 3 B mostra os níveis de IL-10 do grupo de pacientes tratados e não tratados com o IFN- $\beta$  em relação ao grupo controle. Pode-se observar que o tratamento leva a um moderado aumento dos níveis de IL-10 em relação aos outros grupos, no entanto, essa redução não foi estatisticamente significativa. Alguns pacientes dos três grupos apresentaram valores indeterminados e não foram incluídos na análise.



**Figura 2** – Quantificação das citocinas IL-17 pelo método ELISA (A) e IFN- $\gamma$  por citometria de fluxo (B) nos grupos Controle, EMRR não tratado e EMRR em uso de IFN- $\beta$ . Os pontos representam indivíduos. O valor de p foi determinado pelo teste de Kruskal-Wallis. Algumas amostras resultaram em valor indeterminado e não foram contabilizados.



**Figura 3** – Quantificação das citocinas TNF- $\alpha$  (A) e IL-10 (B) por citometria de fluxo nos grupos Controle, EMRR não tratado e EMRR em uso de IFN- $\beta$ . Os pontos representam indivíduos. O valor de p foi determinado pelo teste de Kruskal-Wallis. Algumas amostras resultaram em valor indeterminado e não foram contabilizados.

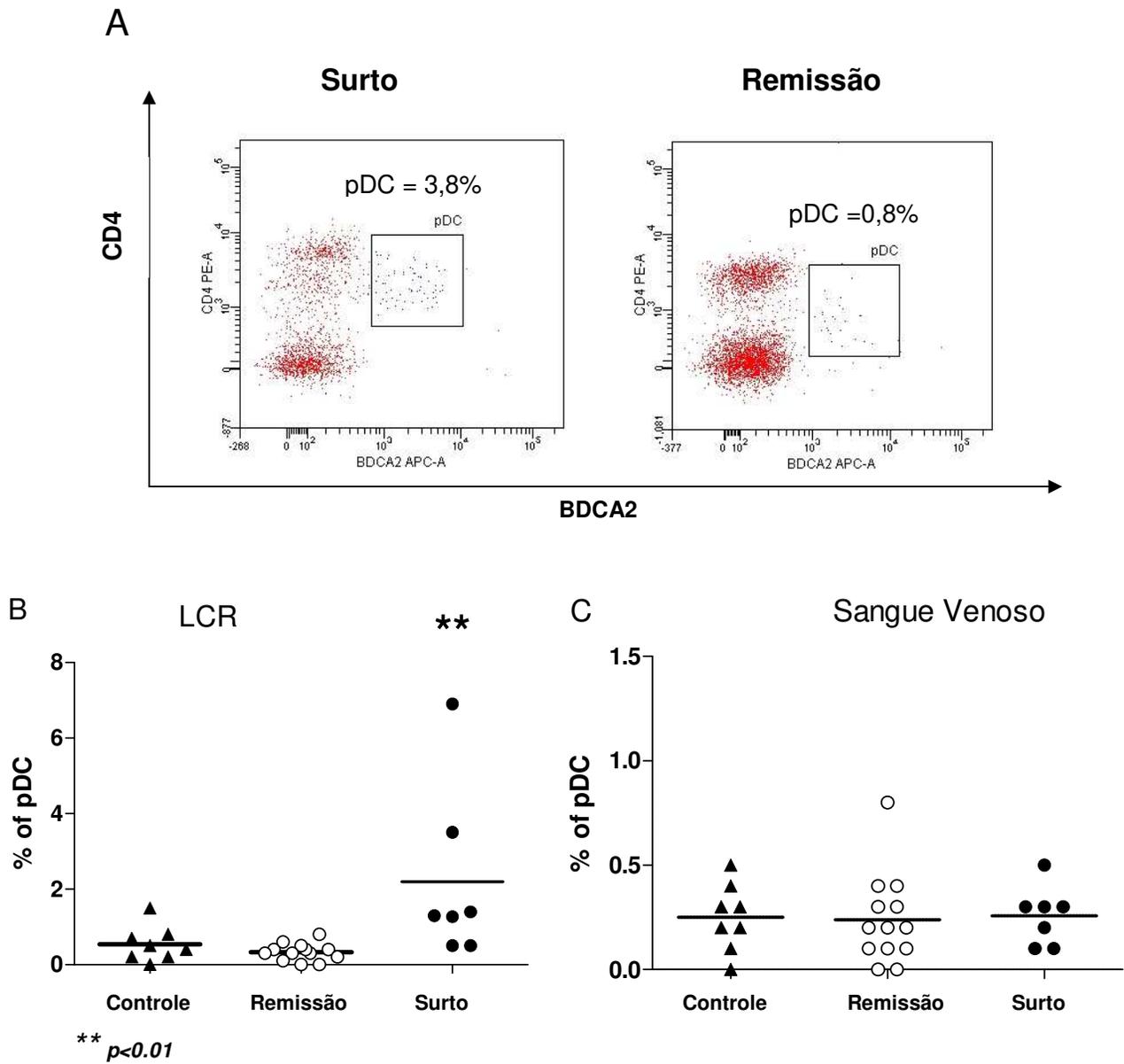
*Análise das pDCs presentes no LCR e sangue venoso periférico de pacientes com EM em surto e em remissão*

A resposta efetora das células auto-reativas assim como a resposta reguladora depende intimamente das células que atuam na resposta imune inata. Desta forma, pesquisou-se correlação do sistema imunológico inato com o adaptativo na EM, estudando a concentração de pDCs no LCR e sangue periférico dos pacientes nas fases de surto e remissão, comparando com pacientes apresentando doenças não inflamatórias do SNC. Na tabela 3, estão demonstradas as características clínicas e epidemiológicas dos grupos de pacientes em surto, em remissão e do grupo controle. Os resultados apresentados na figura 4 claramente mostram um significativo ( $p < 0,05$ ) aumento da percentagem das pDCs no LCR de pacientes em surto. Não houve alteração significativa na concentração das pDCs do sangue periférico, sugerindo que essas células migraram seletivamente para o SNC.

**Tabela 3 - Sumário dos achados clínicos dos grupos de pacientes em surto e remissão.**

<b>Parâmetros</b>	<b>EMRR surto</b>	<b>EMRR remissão</b>	<b>Controle Não inflamatório</b>
<b>Número de pacientes</b>	7	11	8
<b>Relação ♀ : ♂</b>	6 : 1	10 : 1	6 : 2
<b>Idade (Mediana, faixa), anos</b>	34 (30 - 47)	34 (26 - 61)	46 (30 - 64)
<b>EDSS (Mediana, faixa)</b>	2,0 ( 1,5 - 5,5)	2,0 (0 - 6,0)	n.a.
<b>Taxa anual de surtos (Mediana, faixa), anos</b>	1,0 (0,4 - 2,0)	1,0 (0,5 - 1,8)	n.a.
<b>Duração média de doença, anos</b>	5 (1 - 8)	3 (1 - 8)	n.a.
<b>Presença BOC</b>	6 + / 1 -	6 + / 5 -	n.a.

n.a – não se aplica; BOC - bandas oligoclonais



**Figure 4** – Concentração das pDCs no LCR e sangue periférico. **A-** expressão de CD4 e BDCA2 pelas células do LCR. Os resultados representam os pacientes do grupo surto e remissão. **B-** porcentagem das pDCs no LCR, os pontos representam indivíduos. **C-** porcentagem das pDCs no sangue periférico, os pontos representam indivíduos. O valor de  $p$  foi determinado pelo teste de Kruskal-Wallis.

A EM é uma doença com atividade biológica que começa alguns anos antes de o paciente apresentar os primeiros sintomas. Não se sabe ainda quais os fatores ambientais a que os indivíduos susceptíveis foram expostos e como detectar precocemente estes indivíduos. Os parâmetros clínicos como taxa anual de surtos e grau de incapacidade funcional (EDSS) não expressam com exatidão a atividade da doença e possuem baixa reprodutibilidade e baixa sensibilidade. Os exames de imagem, como RNM, surgiram como um importante método de diagnóstico e acompanhamento dos pacientes, detectando lesões clinicamente silenciosas, permitindo diagnóstico e tratamento cada vez mais precoce. Porém, como uma doença com atividade biológica por auto-imunidade, com bases fisiopatológicas genéticas e moleculares, torna-se necessário o apoio laboratorial, a busca por marcadores biológicos que ajudem no diagnóstico diferencial e sua própria confirmação, identificação de grupos de risco genético e grupos que se beneficiem com determinada terapêutica em detrimento de outras.

Desta forma, o presente estudo teve como objetivo comparar os pacientes recém diagnosticados com EM, no momento em que o sistema imunológico está mais ativado e sem interferência causada por drogas, com aqueles tratados com IFN- $\beta$ , estudando a influência desta intervenção. Estudou-se o perfil de citocinas das células T efetoras Th17 e Th1, nos sobrenadantes de linfócitos estimulados em cultura, pois essa abordagem expressa melhor a ativação destas células do que sua simples mensuração no soro. Essas determinações foram realizadas paralelamente ao estudo da resposta proliferativa dos linfócitos estimulados tanto

com mitógenos inespecíficos como com o estímulo com a mielina do SNC humano.

A resposta proliferativa de linfócitos estimulados com mitógenos inespecíficos como a PHA é um método clássico para a avaliação da imunidade celular *in vitro*. Os linfócitos de indivíduos hígidos normalmente proliferam muito bem quando estimulados por esses mitógenos. Já os indivíduos com a resposta imune deficiente normalmente não respondem satisfatoriamente (10).

Vários estudos, inclusive de nosso laboratório, demonstraram que pacientes com EM tratados com IFN- $\beta$  apresentam resposta diminuída aos mitógenos inespecíficos. Esses resultados podem ser explicados, pelo menos em parte, pelo aumento de citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 e TGF- $\beta$  induzidas pelo tratamento com o imunomodulador (11).

Nossos resultados demonstram uma tendência a linfoproliferação diminuída no grupo tratado, embora, devido ao número reduzido de casos, essa diminuição não atingiu níveis estatisticamente significativos. No entanto, a diminuição do crescimento dos linfócitos foi claramente demonstrada quando os linfócitos mantêm um crescimento fisiológico, ou seja, na ausência de estímulos, corroborando os achados anteriores. O estudo da resposta proliferativa de linfócitos *in vitro* também é muito utilizado para selecionar os linfócitos que reconhecem determinados epítomos dos antígenos. O antígeno, no caso do estudo, a mielina central humana, foi colocado em cultura de leucócitos. As células apresentadoras de antígeno fagocitam e apresentam vários epítomos juntamente com as moléculas de MHC de classe II aos linfócitos T CD4 que podem reconhecer esse complexo, proliferando.

Os resultados do estudo mostram que os pacientes com EM apresentaram uma moderada resposta proliferativa à mielina, enquanto os pacientes tratados praticamente não responderam ao neuro-antígeno. A baixa resposta ao neuro-antígeno é esperada, dada a complexidade molecular da mielina. Os linfócitos T CD4 reconhecem epítomos de aproximadamente 20 aminoácidos, assim uma vez que a mielina é composta de varias proteínas potencialmente antigênicas como a proteína básica de mielina (MBP), PLP, MAG, MOG etc, fica muito difícil a seleção dos clones de linfócitos auto-reativos. Mesmo assim, foi possível distinguir certa diferença entre o grupo tratado e não tratado com o IFN- $\beta$  em termos de resposta proliferativa à mielina.

Após a ligação com os antígenos, os linfócitos T são ativados e clones potencialmente auto-reativos entram em proliferação. Na seqüência de eventos que vão culminar com a ativação linfocitária, a participação dos produtos celulares solúveis é fundamental. As células T CD4 secretam certos tipos de citocinas que as diferenciam em subpopulações celulares do tipo Th1, Th2 ou Th17. Os linfócitos T CD4 do tipo Th1 secretam citocinas como IL-2, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  que medeiam as reações de hipersensibilidade tardia (DTH) e induzem a síntese preferencial de alguns isotipos de imunoglobulinas. As células do tipo Th2 secretam IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 e estão associadas com a produção de imunoglobulinas dos tipos IgE. As células Th17 secretam preferencialmente as citocinas inflamatórias IL-17A, IL-17F, IL-23 e IL-22 (15,25).

Vários fatores, incluindo a dose do antígeno, tipo de células apresentadoras de antígeno (APCs), a presença de moléculas co-estimuladoras e

as citocinas presentes no microambiente, influenciam a diferenciação do subtipo Th0 (naive), em células T efetoras ou mesmo T reguladoras (78). As citocinas produzidas pelos linfócitos Th1 e Th17 estão envolvidas nos mecanismos de desmielinização, no entanto, esse efeito é indireto, normalmente ativando outras células como, por exemplo, os macrófagos que produzirão mais TNF- $\alpha$  e várias enzimas com efeito proteolítico. O efeito diretamente tóxico sobre a mielina foi descrito para o TNF- $\alpha$ . No nosso estudo não verificamos mudanças significativas dos níveis de TNF- $\alpha$  e houve um moderado aumento de IL-10 nos pacientes tratados com IFN- $\beta$ . O aumento da citocina antiinflamatória IL-10 após o tratamento com o IFN- $\beta$  confirma dados publicados anteriormente em nosso laboratório (11). Quanto às citocinas pró-inflamatórias IL-17 e IFN- $\gamma$ , foi observada uma moderada redução nos seus níveis após o tratamento, embora os valores obtidos não sejam estatisticamente significativos.

O IFN- $\beta$  pertence à primeira linha de agentes terapêuticos para o tratamento da EMRR. O IFN- $\beta$  pode modificar a resposta de linfócitos T, B, macrófagos e células dendríticas reduzindo a resposta inflamatória. Em estudo conduzido em nosso laboratório, mostramos que esse imunomodulador diminui consideravelmente a taxa anual de surtos, mas não modifica o EDSS dos pacientes tratados (79). Alguns estudos mostraram que aproximadamente 40% dos pacientes tratados não respondem positivamente à terapia com o IFN- $\beta$ . A explicação para a falência do tratamento nesses pacientes é complexa, podendo ser atribuída, pelo menos em parte, ao desenvolvimento de anticorpos neutralizantes ao IFN- $\beta$  (71).

Recentemente, Axtell e colaboradores correlacionaram a maior atividade de doença, em pacientes classificados como não-respondedores ao tratamento com IFN- $\beta$ , com níveis altos de IL-17F e IFN- $\beta$  endógeno dosados no soro destes pacientes, sugerindo que eles teriam uma maior ativação da via Th17 (80). Foi sugerida a hipótese deste IFN- $\beta$  aumentado traduzir um mecanismo compensatório antiinflamatório ou o próprio IFN- $\beta$  agir como uma citocina pró-inflamatória. No modelo EAE, o tratamento com IFN- $\beta$  era efetivo em reduzir a resposta inflamatória induzida pela transferência de linfócitos Th1 auto-reativos, aumentando a produção de IL-10; mas exacerbava a resposta inflamatória, quando a transferência era de linfócitos Th17, não alterando a produção do IL-10. A ação do IFN- $\beta$  dependia do nível de IFN- $\gamma$  e seus receptores nas células apresentadoras de antígeno (APC) e nos linfócitos T, expressando a importância da interação entre o sistema inato e adaptativo da resposta imunológica. Os dados do estudo apontam para essa tendência e é possível que existam subgrupos de pacientes que produzam mais IFN- $\gamma$ , com maior ativação da via Th1, e com maiores chances de responder ao interferon beta e outros com maiores níveis de IL-17, necessitando de terapias alternativas (80).

Os mecanismos para explicar esse aumento seletivo de IL-17 nos pacientes com EM é complexo e tem início ainda na resposta imune inata. Quando se trata de EM, a subpopulação de células dendríticas pDC assume particular importância, uma vez que essas células, quando ativadas, produzem consideráveis níveis de IFN do tipo I (81,82). Recentemente, Schwab e colaboradores mostraram que as pDCs também são populações heterogêneas quanto ao tipo de citocinas que elas

produzem, e chamaram de pDC1 (alta expressão de CD123 e baixa CD58), as pDCs que induzem os linfócitos T CD4+ produtoras de IL-10 (Tr1) e que mais produzem INF tipo 1, e de pDC2 (baixa expressão de CD123 e alta CD58) as células dendríticas plasmocitoides que induzem linfócitos Th-17, ou seja produtores de IL-17 (83). Ainda, verificou-se que, nos pacientes com EMRR e miastenia gravis, predominava a forma pDC2 sobre a pDC1. Nos indivíduos normais, existia uma relação pDC1 / pDC2 de 4 : 1. Após terapia com IFN- $\beta$  dos pacientes com EMRR, esta relação tendia para a normalidade, regulando a resposta imunológica (83).

No presente estudo, detectou-se uma elevação da concentração de pDCs no LCR de pacientes em surto, quando comparados àqueles em remissão e nos controles. Não houve diferença na porcentagem dessas células no sangue periférico dos pacientes com EM nos dois grupos estudados. Este achado pode indicar uma migração seletiva das pDCs para o SNC. Estudo anterior abrangendo doenças inflamatórias do SNC, como neuroborreliose, já havia detectado aumento da concentração de pDCs no LCR quando comparados a outras doenças não inflamatórias (63). No estudo, no entanto, detectou-se um aumento seletivo em fases distintas da EM: surto x remissão. A importância deste achado é que as pDCs são células apresentadoras de antígeno e orquestram o sistema imuno-adaptativo e seu aumento pode estar ligado a uma estimulação da resposta inflamatória ou a própria redução desta resposta, uma vez que as pDCs, principalmente o subtipo pDC1, pode ativar a população de células T reguladoras, produtoras de IL-10. Esse aumento das pDCs na fase aguda da doença pode

também estar ligado à preparação do microambiente do SNC para a fase de remissão da doença.

Embora estudos adicionais sejam necessários para entendimento das subpopulações de linfócitos Th1 e Th17, assim como a subpopulação de células dendríticas das pDCs, as observações do estudo alertam para a possibilidade de a IL-17 ser um marcador de resistência ao tratamento com IFN- $\beta$  e mostra pela primeira vez, que as pDCs migram para o SNC na fase aguda da doença.

Nossas observações permitem concluir que:

1. O tratamento com o IFN- $\beta$  tende a diminuir a resposta proliferativa fisiológica dos linfócitos T de pacientes em tratamento e tende a modificar o padrão de citocinas pró (IFN- $\gamma$  e IL-17) e anti- inflamatória (IL-10) nos pacientes com EMRR.
  2. As células dendríticas plasmocitoides estão aumentadas no LCR de pacientes com EMRR em surto, quando comparada à fase de remissão, sem correspondência no sangue periférico, indicando uma provável migração seletiva.
-

## Referências Bibliográficas.

---

1. Ross, AP. Strategies for optimal disease management, adherence, and outcomes in multiple sclerosis patients. *Neurology* 2008, 71 (3): 1-2.
2. National Multiple Sclerosis Society (NMSS) Washington D.C. Just the facts - 2010. Available from: <http://www.nationalmssociety.org/download.aspx?id=2>
3. Callegaro D, Goldbaum M, Morais L, Tilbery CP, Moreira MA, Gabbai AA et al. The prevalence of multiple sclerosis in the city of São Paulo, Brazil, 1997. *Acta Neurol Scand.* 2001, 104: 208-213.
4. Hauser S L. Multiple lessons for multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2008, 359 (17): 1838-41.
5. Compston A, Coles A. Multiple Sclerosis. *Lancet* 2008, 372: 1502-15.
6. Coyle P K. Early treatment of multiple sclerosis to prevent neurologic damage. *Neurology* 2008, 71 (3): 3-6.
7. Lider O, Santos LM, Lee CS, et al. Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by oral administration of myelin basic protein. II. Suppression of disease and in vitro immune responses is mediated by antigen-specific CD8+ T lymphocytes. *J Immunol.* 1989; 142 (3): 748-52.
8. Santos LM, al-Sabbagh A, Londono A, et al. Oral tolerance to myelin basic protein induces regulatory TGF-beta-secreting T cells in Peyer's patches of SJL mice. *Cell Immunol.* 1994;157(2): 439-47.

9. Ota K, Matsui M, Milford EL, et al. T-cell recognition of an immunodominant myelin basic protein epitope in multiple sclerosis. *Nature*. 1990, 346(6280): 183-7.
10. Hallal-Longo DE, Mirandola SR, Oliveira EC, et al. Diminished myelin-specific T cell activation associated with increase in CTLA4 and Fas molecules in multiple sclerosis patients treated with IFN-beta. *J Interferon Cytokine Res*. 2007; 10: 865-73.
11. Mirandola SR, Hallal DE, Farias AS, et al. Interferon-beta modifies the peripheral blood cell cytokine secretion in patients with multiple sclerosis. *Int Immunopharmacol*. 2009; 9(7-8): 824-30.
12. Polman CH, O'Connor PW, Harvdova E, et al. AFFIRM Investigators. A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2006; 354: 899-910.
13. Paterson P, Org T and Rebane A. Transcriptional regulation by AIRE: molecular mechanisms of central tolerance. *Nat Rev Immunol* 2008, 8: 948-57.
14. Viglietta V, Baecher-Allan C, Weiner H L, Hafler D A. Loss of Functional Suppression by CD4+ CD25+ Regulatory T Cells in Patients with Multiple Sclerosis. *J Exp Med* 2004, 7: 971-9.
15. Steinman L. A brief history of Th17, the first major revision in the Th1/Th2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nature Med*. 2007, 13 (2): 139-45.
16. McFarland HF, Martin R. Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity. *Nature Immunol*. 2007, 8: 913-9.

17. Balashov KE, Smith DR, Khoury SJ, et al. Increased interleukin 12 production in progressive multiple sclerosis: induction by activated CD4+ T cells via CD40 ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997; 94(2): 599-603.
18. Heremans H, Dillen C, Groenen M, et al. Chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis (CREAE) in mice: enhancement by monoclonal antibodies against interferon-gamma. *Eur J Immunol*. 1996; 26(10): 2393-8.
19. Ferber IA, Brocke S, Taylor-Edwards C, Ridgway W, et al. Mice with a disrupted IFN-gamma gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *J Immunol*. 1996; 156(1): 5-7.
20. Willenborg DO, Fordham S, Bernard CC, et al. IFN-gamma plays a critical down-regulatory role in the induction and effector phase of myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*. 1996; 157(8):3223-7.
21. Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, Murphy CA, Joyce B, Seymour B, et al. Interleukin-23 rather than Interleukin-12 is the critical cytokine for the autoimmune inflammation of the brain. *Nature* 2003; 421(6924):744-8.
22. Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med*. 2005; 201(2): 233-40.
23. Murugaiyan G, Mittal A, Weiner H L. Increased osteopontin expression in dendritic cells amplifies IL-17 production by CD4+ T cells in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *J Immunol*, 2008, 181 (11): 7480-8.

24. Bettelli E, Korn T, Oukka M, Kuchroo V. Induction and effector functions of Th17 cells. *Nature* 2008, 453: 1051-57.
25. Wilson N J, Boniface K, Chan J R, McKenzie B S, et al. Development, Cytokine Profile and Function of Human Interleukin 17-Producing Helper T Cells. *Nature Imm.* 2007, 8: 950-7.
26. Acosta-Rodriguez E, Napolitani G, Lanzavecchia A, Sallusto F. Interleukins 1B and 6 but not transforming growth factor-B are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. 2007. *Nat. Immunol.* 2007, 8 (9): 942-9.
27. Korn T, Mitsdoerffer M, Kuchroo VK: Immunological Basis for the Development of Tissue Inflammation and Organ-Specific Autoimmunity in Animal Models of Multiple Sclerosis. *Results Probl Cell Differ* 2009.
28. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 2006, 441: 235-8
29. Thakker P, Leach MW, Kuang W, Benoit SE, et al. IL-23 is critical in the induction but not in the effector phase of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 2007; 178(4): 2589-98.
30. Ouyang W, Kolls JK, Zheng Y, et al. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity.* 2008; 28(4): 454-67.
31. Fitzgerald DC, Ciric B, Touil T, et al. Suppressive effect of IL-27 on encephalitogenic Th17 cells and the effector phase of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 2007; 179(5): 3268-75.

32. Lock C et al. Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yield new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nature Med.* 2002, 8: 500-8.
33. Fujino S et al. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut* 2003, 52: 65-70.
34. Yamada H et al. Th1 but not Th17 cells predominate in the joints of patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2008, 67: 1299-1304.
35. Chabaud M et al. Human Interleukin 17: a T cell-derived proinflammatory cytokine produced by the rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum.* 1999, 42: 963-70.
36. Zheng Y et al. Interleukin-22, a Th 17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis. *Nature* 2007, 445: 648-51.
37. Kebir H, Kreymborg K, Ifergan I, Dodelet-Devillers A, et al. Human Th17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nature Med* 2007, 13 (10): 1173-5.
38. Frisullo G, Nociti V, Iorio R, et al. IL-17 and IFN- $\gamma$  production by peripheral blood mononuclear cells from clinically isolated syndrome to secondary progressive multiple sclerosis. *Cytokine* 2008, 44 (1): 22-5.
39. Tzartos J, Friese M A et al. Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *Am J Pathol.* 2008, 172 (1): 146-55.
40. Ishizu T, Osoegawa M, Mei FJ, et al. Intrathecal activation of the IL-17/IL-8 axis in opticospinal multiple sclerosis. *Brain* 2005, 128: 988-1002.

41. Workman CJ, Szymczak-Workman AL, Collison LW, et al. The development and function of regulatory T cells. *Cell Mol Life Sci.* 2009; 66(16): 2603-22.
42. Gershon RK, Kondo K. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology.* 1970; 18(5): 723-37.
43. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, et al. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol.* 1995; 155(3): 1151-64.
44. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science.* 2003; 299(5609): 1057-61.
45. Sakaguchi S, Ono M, Setoguchi R, Yagi H, Hori S, Fehervari Z, et al. Foxp3<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol Rev* 2006, 212: 8-27.
46. Thornton AM, Shevach EM. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med.* 1998; 188(2): 287-96
47. Gondek DC, Lu LF, Quezada SA, et al. Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J Immunol.* 2005; 174(4): 1783-6.
48. Cao X, Cai SF, Fehniger TA, Song J, Collins LI, Piwnica-Worms DR, Ley TJ: Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity* 2007, 27: 635-46.

49. Bopp T, Jonuleit H, Schmitt E. Regulatory T cells--the renaissance of the suppressor T cells. *Ann Med*. 2007; 39(5): 322-34.
50. Oderup C, Cederbom L, Makowska A, et al. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4-dependent down-modulation of costimulatory molecules on dendritic cells in CD4+ CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression. *Immunology*. 2006; 118(2): 240-9.
51. Grohmann U, Orabona C, Fallarino F, Vacca C, Calcinaro F, Falorni A, Candeloro P, Belladonna ML, Bianchi R, Fioretti MC, Puccetti P: CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nat Immunol* 2002, 3: 1097-101.
52. Zhang L, Yi H, Xia XP, Zhao Y. Transforming growth factor-beta: an important role in CD4+CD25+ regulatory T cells and immune tolerance. *Autoimmunity*. 2006; 39(4): 269-76.
53. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998; 392(6673): 245-52.
54. Rissoan MC, Soumelis V, Kadowaki N, Grouard G, Briere F, de Waal Malefyt R, et al. Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science* 1999, 283: 1183-6.
55. Liu YJ. IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu Rev Immunol*. 2005; 23: 275-306.
56. Janeway CA Jr, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*. 2002; 20: 197-216.
57. Lund J, Sato A, Akira S, Medzhitov R, Iwasaki A: Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* 2003, 198: 513-20.

58. Krug A, French AR, Barchet W, et al. TLR9-dependent recognition of MCMV by IPC and DC generates coordinated cytokine responses that activate antiviral NK cell function. *Immunity*. 2004; 21(1): 107-19.
59. Moseman EA, Liang X, Dawson AJ, et al. Human plasmacytoid dendritic cells activated by CpG oligodeoxynucleotides induce the generation of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol*. 2004; 173(7): 4433-42.
60. Ito T, Wang YH, Liu YJ. Plasmacytoid dendritic cell precursors/type I interferon-producing cells sense viral infection by Toll-like receptor (TLR) 7 and TLR9. *Springer Semin Immunopathol* 2005, 26: 221-9.
61. Bilsborough J, George TC, Norment A, et al. Mucosal CD8alpha+ DC, with a plasmacytoid phenotype, induce differentiation and support function of T cells with regulatory properties. *Immunology*. 2003; 108(4): 481-92.
62. Bayley-Bucktrout SL, Caulkins SC, Goings G, Fischer JAA, Dzionek A, and Miller SD. Cutting edge: central nervous system plasmacytoid dendritic cells regulate the severity of relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol*. 2008, 180: 6457-61
63. Pashenkov M, Huang YM, Kostulas V, Haglund M, Sodestrom M, and Link H. Two subsets of dendritic cells are present in human cerebrospinal fluid. *Brain* 2001, 124: 480-92.
64. Kwidzinski E, Bechmann I. IDO expression in the brain: a double-edge sword. *J Mol Med* 2007, 85: 1351-9.
65. Rudick RA, Lee JC, Simon J, et al. Defining interferon B response status in multiple sclerosis patients. *Ann Neurol* 2004; 56: 548-55.

66. Johnson KP, Brooks BR, Cohen JA, et al. Copolymer 1 reduces rate and improves disability in relapsing-remitting multiple sclerosis: results of a phase III multicenter, double-blind placebo-controlled trial. The Copolymer 1 Multiple Sclerosis Study Group. *Neurol* 1995; 45 (7): 1268-76
67. The Interferon B Multiple Sclerosis Study Group. Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. Clinical results of a multicenter, randomized, double-blinded, placebo-controlled trial. *Neurol* 1993; 43: 655-61
68. Jacobs LD, Cookfair DL, Rudick RA, et al. Intramuscular interferon beta-1a for disease progression in relapsing multiple sclerosis. The Multiple Sclerosis Collaborative Research Group (MSCRG). *Ann Neurol* 1996; 39: 285-94.
69. Randomized double-blind, placebo-controlled study of interferon B-1a in relapsing/remitting multiple sclerosis. PRISMS (Prevention of Relapses and Disability by Interferon beta-1a Subcutaneously in Multiple Sclerosis) Study Group. *Lancet* 1998, 352: 1498-504.
70. Rudick RA, Simonian NA, Alam JA, et al. Incidence and Significance of neutralizing antibodies to interferon beta-1<sup>a</sup> in multiple sclerosis. The Multiple Sclerosis Collaborative Research Group (MSCRG). *Neurol* 1998; 50: 1266-72.
71. Weinstock-Guttman B, Ramanathan M, Zivadinov R. Interferon-B treatment for relapsing multiple sclerosis. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2008; 8 (9): 1435-47.

72. Goodin DS, Cohen BA, O'Connor P, Kappos L, Stevens JC. Assessment: The use of natalizumab (Tysabri) for the treatment of multiple sclerosis (an evidence-based review): Report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurol* 2008; 71: 766-73.
73. Steinman RM, Banchereau J. Taking dendritic cells into medicine. *Nature* 2007, 449: 419-26.
74. Polman C H, Reingold S C, Edan G, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the 'McDonald Criteria'. *Ann Neurol*. 2005, 58: 840-846.
75. McDonald W I, Compston A, Edan G, et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the international panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2001, 50: 121-7.
76. Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology*. 1983; 33: 1444-52.
77. Puccioni-Sohler M, Lavrado FP, Bastos RR, Brandão CO, Papaiz-Alvarenga R. Multiple sclerosis: clinical and laboratorial correlation. *Arq Neuropsiquiatr*. 2001; 59: 89-91.
78. Goverman J. Autoimmune T cell responses in the central nervous system. *Nature Rev Immun* 2009, 9: 393-407.
79. Brandão CO, Ruocco HH, Farias AS, Oliveira C, Cendes F, Damasceno BP, Santos LMB. Intrathecal Immunoglobulin G Synthesis and Brain Injury by Quantitative MRI in Multiple Sclerosis. *Neuroimmunomodulation* 2006; 13: 89-95.

80. Axtell R C, de Jong B A, Boniface K, van der Voort LF, et al. T helper type 1 and 17 cells determine efficacy of interferon- $\beta$  in multiple sclerosis and experimental encephalomyelitis. *Nat Med* 2010; 16: 406-13.
81. Shinohara M, Kim JH, Garcia V and Cantor H. Engagement of the Type-1 interferon receptor on dendritic cells inhibits T helper 17 cell development: Central role of intracellular Osteopontin. *Immunity* 2008, 29, 68-78.
82. Villadangos JA and Young L. Antigen-Presentation Properties of Plasmacytoid Dendritic Cells. *Immunol* 2008, 29: 352-361.
83. Schwab N, Zozulya A L, Kieseier B C et al. An imbalance of two functionally and phenotypically different subsets of plasmacytoid dendritic cells characterizes the dysfunctional immune regulation in multiple sclerosis. *J Immunol* 2010; 184: 5368-74.

## Anexo 1: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa aprovando o trabalho.



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

[www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html](http://www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html)

CEP, 05/03/09.  
(Grupo III)

**PARECER CEP:** N° 038/2009 (Este n° deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)  
**CAAE:** 0028.0.146.000-09

### I - IDENTIFICAÇÃO:

**PROJETO: “CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS T HELPERS 17 NOS PACIENTES COM ESCLEROSE MÚLTIPLA”.**

**PESQUISADOR RESPONSÁVEL:** Felipe Von Glehn Silva.

**INSTITUIÇÃO:** Hospital das Clínicas/UNICAMP

**APRESENTAÇÃO AO CEP:** 03/02/2009

**APRESENTAR RELATÓRIO EM:** 05/03/10 (O formulário encontra-se no *site* acima)

### II - OBJETIVOS

Avaliar os níveis de linfócitos T helpers 17 (CD4+ CD45RO+ IL-17+) no líquido e sangue de pacientes com esclerose múltipla acompanhados no ambulatório de neurologia do HC-Unicamp, comparar os níveis séricos com controles sadios, analisar os níveis séricos e líquóricos das citocinas IL-17 e IL-23 e correlacionar o tratamento com respostas dos níveis séricos de células Th 17 e citocinas IL-17 e IL-23.

### III - SUMÁRIO

Estudo observacional, longitudinal, descritivo e comparativo dos níveis séricos de linfócitos Th17 e citocinas IL-17 e IL-23 de 20 pacientes com EM do HC-Unicamp e controles, em dois momentos: inclusão no estudo e após 6 meses. Será necessário a coleta de sangue periférico e de líquido apenas nos pacientes com EM. Critérios de inclusão e exclusão adequados.

### IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Após respostas às pendências, o projeto encontra-se adequadamente redigido e de acordo com a Resolução CNS/MS 196/96 e suas complementares, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

### V - PARECER DO CEP

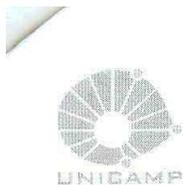
O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

---

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP  
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126  
Caixa Postal 6111  
13083-887 Campinas - SP

FONE (019) 3521-8936  
FAX (019) 3521-7187  
cep@fcm.unicamp.br

- 1 -



## V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

## VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

## VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na II Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 17 de fevereiro de 2009.

*Prof. Dra. Carmem Sílvia Bertuzzo*  
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
FCM / UNICAMP

## Anexo 2 – Ficha de Atendimento Ambulatorial.

Ambulatório de Doenças Desmielinizantes do SNC – Ficha de E.M.

Nome: \_\_\_\_\_ HC: \_\_\_\_\_

Idade: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_ Gênero: Masc Fem Tel.: \_\_\_\_\_

HD: Síndrome Clínica Isolada EM surto-remissão  
EM secund. progressiva EM primar. progressiva  
EM progressiva com surtos Doença Devic

Critérios McDonald revisado 2005: \_\_\_\_\_

Surtos (data/ descrição): \_\_\_\_\_

Evidências Clínicas Objetivas: \_\_\_\_\_

RNM - Disseminação espaço: 1 lesão Gd+ ou 9 lesões hipersinal em T2

1 lesão justacortical 3 lesões periventriculares

1 lesão infratentorial Lesão medular \_\_\_\_\_

- Disseminação tempo: 1 lesão Gd+ 3 meses após evento inicial

1 lesão hipersinal em T2 após 30 dias do surto inicial

Potencial Evocado Visual: \_\_\_\_\_

Líquor: Bandas Oligoclonais: \_\_\_\_\_, Índice IgG: \_\_\_\_\_

HTLV I/II: \_\_\_\_\_; Anti-Schistosoma: \_\_\_\_\_; Anti-Cisticercos: \_\_\_\_\_; Anti-Aqua4: \_\_\_\_\_;

Medicações em uso ou já utilizadas (período/ critério de falha):

. Imuno-modulador: Acetato de Glatirâmer \_\_\_\_\_

Interferon  $\beta$  1a 30 $\mu$ g \_\_\_\_\_

Interferon  $\beta$  1a 44 $\mu$ g \_\_\_\_\_

Interferon  $\beta$  1b 250 $\mu$ g \_\_\_\_\_

Efeitos Colaterais: \_\_\_\_\_

Imunossupressor: Azatioprina; Metotrexato; Ciclofosfamida;

Mitoxantrone; Micofenolato; Natalizumab;

Dose/ período de uso/ efeitos colaterais: \_\_\_\_\_

ICAP - Sintomas/ Incapacidades (se presente, descrever medidas gerais e farmacológicas):

Fadiga \_\_\_\_\_

Cognitivo \_\_\_\_\_

Mobilidade \_\_\_\_\_

Disfunção Vesical \_\_\_\_\_

(Estudo de Urodinâmica) \_\_\_\_\_

Evolução: \_\_\_\_\_

---

---

---

---

---

Exame Físico: \_\_\_\_\_

---

---

---

---

---

---

Sistemas Funcionais para Escala de Kurtzke:

- Piramidais: \_\_\_\_\_
- Cerebelares: \_\_\_\_\_
- Tronco Cerebral: \_\_\_\_\_
- Sensitivas: \_\_\_\_\_
- Vesicais: \_\_\_\_\_
- Intestinais: \_\_\_\_\_
- Visuais: \_\_\_\_\_
- Mentais: \_\_\_\_\_

EDSS: \_\_\_\_\_

Conduta: \_\_\_\_\_

---

---

Examinador: \_\_\_\_\_

Anexo 3 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), conforme resolução 196/96.

**Projeto: Caracterização de células T helpers 17 em Pacientes com Esclerose Múltipla.**

Pesquisador Responsável: Felipe von Glehn

Data: \_\_\_\_\_

Justificativa e Objetivos: A Esclerose Múltipla (EM) é uma doença inflamatória auto-imune, que acomete adultos jovens. A incidência de tal doença em nosso meio vem aumentando, causando preocupação nos especialistas. Acredita-se atualmente que as lesões causadas pela Esclerose Múltipla sejam resultadas de uma agressão das nossas células de defesa contra o próprio organismo, gerando os surtos e a piora da doença. Este processo de auto-agressão, por que ele ocorre e quais células de defesa estão alteradas, é pouco compreendido. Por esta razão, estamos realizando este trabalho de pesquisa, para estudar que células estão envolvidas, estudando o processo inflamatório no líquido e sangue dos pacientes que aceitarem a participação. Os resultados podem ajudar na criação futura de novos métodos diagnósticos e tratamentos. Os pacientes serão estudados em 2 momentos, no início do estudo e 6 meses após, durante o acompanhamento normal que já realiza no ambulatório de EM.

Procedimentos: O paciente deverá, em data pré-determinada de retorno, se encaminhar ao ambulatório de neurologia da UNICAMP / HC para a retirada de 10 cc do líquido (obtida pela punção lombar) e 10cc do sangue para os estudos. Não é necessário estar em jejum e nem interromper medicações utilizadas.

Risco e Desconforto: A coleta do líquido será realizada nas costas (região lombar). A dor que acompanha a punção lombar é semelhante aquela da coleta de sangue. O desconforto será mínimo pois será realizada com anestesia local por profissional treinado e devidamente habilitado para a realização de punção lombar. Após submeter-se a punção lombar, o paciente deverá permanecer em repouso absoluto em casa, por 48 horas, e aumentar a ingestão de líquidos. Este repouso é importante para evitar dor de cabeça após a punção, impossibilitando a realização das atividades habituais. Se houver dor, mesmo com o repouso de 48 horas, o paciente deverá permanecer em repouso por mais alguns dias e ingerir a medicação prescrita pelo seu médico. Este tipo de dor de cabeça não traz qualquer prejuízo ao paciente mas necessita de repouso para desaparecer.

A coleta do líquido por utilizar agulha apresenta os riscos inerentes ao procedimento. São descritas, raramente, intercorrências da punção, como dormências transitórias, dor local e infecção. Entretanto, a incidência destas complicações é baixa. O material é descartável e as agulhas atuais (modelo 22Gx 3.5 = 70x7) são mais finas e de excelente qualidade. Caso ocorra qualquer desconforto após o procedimento, o paciente deverá contactar a equipe de atendimento do HC - UNICAMP e a equipe de pesquisa, que orientarão as medidas a serem tomadas para aliviar os sintomas, sem nenhum custo.

Benefícios: Melhor entendimento da Esclerose Múltipla para ajudar na criação futura de novos métodos diagnósticos e terapêuticos. Não existe benefício imediato para o paciente.

Esclarecimento : Todas as dúvidas e perguntas do paciente quanto aos assuntos relacionados com a pesquisa e o tratamento serão esclarecidas pelos pesquisadores.

Recusa ou descontinuação da participação: Durante o decorrer do estudo informaremos ao paciente o andamento da pesquisa, podendo este deixar de participar da pesquisa a qualquer momento, sem prejuízo no atendimento que recebe pelo HC – UNICAMP, caso decida não colaborar com a equipe, pois a participação do paciente é voluntária.

Sigilo: As informações recebidas durante e depois do estudo e a privacidade dos pacientes serão mantidas em sigilo. Os resultados serão sempre analisados em grupo, estatisticamente, não sendo possível identificar de forma individual qualquer paciente. Caso tenha alguma dúvida deverá procurar a Dr. Felipe von Glehn no telefone (19) 3521-7754, (19) 9769-0777

Gastos adicionais: Se houverem gastos adicionais (seringas, agulhas descartáveis, material de curativo...) estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

Armazenamento de Material Biológico: Após o estudo realizado, geralmente sobra alguma quantidade de líquido e soro, que tem a capacidade de ser avaliada em novas pesquisas futuras, sem a necessidade de realizar procedimentos de punção, com todos os seus riscos e desconfortos. Eu **autorizo não autorizo** o estoque de meu material biológico para estudos futuros aprovados pelo Comitê de Ética da UNICAMP.

Eu confirmo que Felipe von Glehn me explicou o objetivo do estudo, os procedimentos aos quais serei submetido e os riscos, desconforto e possíveis vantagens advindas desse projeto de pesquisa. Eu li, e/ou me foi explicado, assim como compreendi e recebi uma cópia deste formulário de consentimento e estou de pleno acordo em participar do estudo.

Paciente ou Responsável: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_

RG: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Assinatura : \_\_\_\_\_

Responsabilidade do pesquisador. Eu expliquei a \_\_\_\_\_ o objetivo do estudo, os procedimentos requeridos e os possíveis riscos e vantagens que poderão advir do estudo, usando o melhor do meu conhecimento. Eu me comprometo a fornecer uma cópia desse formulário de consentimento ao participante ou responsável.

---

Felipe von Glehn CRM-SP: 114233  
Email.: [fglehn@terra.com.br](mailto:fglehn@terra.com.br) Tel.: (19) 9769-0777 / 3521-7754

Outros Membros da Equipe:

1) Carlos Otávio Brandão - Tel:(19) 3521-7754 .2) Benito Damasceno - Tel:(19) 3521-7754

3) Leonilda dos Santos - Tel:(19) 3521-6262 .4) Alfredo Damasceno - Tel:(19) 3521-7754

5) Comitê de Ética em Pesquisa Tel:(19) 3521-8936

Email.: [cep@fcm.unicamp.br](mailto:cep@fcm.unicamp.br)

Rua Tessália Vieira de Camargo, 126 – Caixa Postal 6111  
13083-887 Campinas-SP

Qualquer intercorrências médicas, ligar para qualquer um dos membros da equipe.

## Anexo 4: Critérios de McDonald revisados 2005 para Esclerose Múltipla.

Apresentação Clínica	Necessidade de dados adicionais
<p>. 2 ou mais surtos<sup>a</sup> e 2 ou mais lesões clínicas objetivas</p> <p>• 2 ou mais surtos<sup>a</sup> e 1 lesão clínica objetiva</p>	<p>• Nenhuma</p> <p>• Disseminação no espaço por: - RNM (critérios Barkhof/ Tintoré<sup>b</sup>) ou - Líquor positivo<sup>d</sup> e RNM com 2 ou mais lesões características EM ou - Esperar um segundo surto<sup>a</sup> que implique outra lesão objetiva.</p>
<p>• 1 surto<sup>a</sup> e 2 ou mais lesões clínicas objetivas</p>	<p>• Disseminação no tempo por: - RNM (critérios revisão 2005<sup>b</sup>) ou - Esperar um segundo surto<sup>a</sup></p>
<p>• 1 surto<sup>a</sup> e 1 lesão clínica objetiva (Síndrome Clínica Isolada).</p>	<p>• Disseminação no espaço por: - RNM (critérios Barkhof/ Tintoré<sup>b</sup>) ou - Líquor positivo<sup>d</sup> e RNM com 2 ou mais lesões características EM E . Disseminação no tempo por: - RNM (critérios revisão 2005<sup>b</sup>) ou - Esperar um segundo surto<sup>a</sup></p>
<p>• Progressão neurológica insidiosa sugestiva de EM (EM primariamente progressiva).</p>	<p>• 1 ano de progressão da doença (retrospectivamente ou prospectivamente determinada) e - 2 dos seguintes: a. RNM crânio positivo (pelo menos 9 lesões em T2 ou 4 lesões em T2 mais Potencial Evocado Visual +). b. RNM medula positiva (pelo menos 2 lesões em T2) c. Líquor positivo<sup>d</sup></p>

Obs.: Se os critérios são preenchidos e não existe nenhuma outra explicação para o quadro clínico, o diagnóstico é EM. Se a suspeita é grande, mas não preenche os critérios, o diagnóstico fica como EM possível. Se outra condição justificar o quadro clínico, o diagnóstico não é EM.

<sup>a</sup>.Surto é definido como episódio de distúrbio neurológico visto, seja por relato subjetivo, seja por observação objetiva, que dura mais de 24 horas, causado, na essência, por lesão inflamatória e desmielinizante do SNC.

<sup>b</sup>.Critérios disseminação no tempo por RNM (Polman) consiste em detecção de lesão na RNM captando gadolínio, pelo menos 3 meses após o surto, em local diferente do evento inicial ou detecção de nova lesão em T2 quando comparadas com imagens feitas 30 dias após o evento inicial.

<sup>c</sup>.Critério de disseminação no espaço de Barkhof/ Tintoré consiste em 3 dos 4 critérios: 1 lesão gadolínio positiva ou 9 lesões com hipersinal em T2; pelo menos 1 lesão justacortical; pelo menos 1 lesão infratentorial; pelo menos 3 lesões periventriculares. Obs.: As lesões medulares contribuem para o número de lesões em T2, gadolínio positiva e como lesão infratentorial.

<sup>d</sup>.Líquor positivo: presença de bandas oligoclonais determinadas por focalização isoelétrica, diferentes de bandas no soro ou por index de IgG aumentado.

**Plasmacytoid Dendritic Cells are Increased in Cerebrospinal Fluid During Multiple Sclerosis Relapse**



Journal:	<i>Multiple Sclerosis</i>
Manuscript ID:	MSJ-10-0200.R1
Manuscript Type:	Short Report
Date Submitted by the Author:	02-Jun-2010
Complete List of Authors:	<p>Santos, Leonilda; UNICAMP, Neuroimmunology Unit, Dept Genetics, Evolution and Bioagents, Biology Institute                      Longhini, Ana; UNICAMP, Neuroimmunology Unit, Dept Genetics, Evolution and Bioagents, Biology Institute                      von Glehn, Felipe; UNICAMP, Neuroimmunology Unit, Dept Genetics, Evolution and Bioagents, Biology Institute                      brandao, carlos; UNICAMP, Neuroimmunology Unit, Dept Genetics, Evolution and Bioagents, Biology Institute University of Campinas                      de Paula, Rosemeire; UNICAMP, Neuroimmunology Unit, Dept Genetics, Evolution and Bioagents, Biology Institute University of Campinas                      Pradella, Fernando; UNICAMP, Neuroimmunology Unit, Dept Genetics, Evolution and Bioagents, Biology Institute                      da Silva, Vânia; UNICAMP, Neuroimmunology Unit, Dept Genetics, Evolution and Bioagents, Biology Institute University of Campinas                      Moraes, Adriel; UNICAMP, Neuroimmunology Unit, Dept Genetics, Evolution and Bioagents, Biology Institute                      Sartorelli, Juliana; UNICAMP, Neuroimmunology Unit, Dept Genetics, Evolution and Bioagents, Biology Institute University of Campinas                      farias, alessandro; UNICAMP, Neuroimmunology Unit, Dept Genetics, Evolution and Bioagents, Biology Institute University of Campinas                      Oliveira, Elaine; UNICAMP, Neuroimmunology Unit, Dept Genetics, Evolution and Bioagents, Biology Institute University of Campinas                      Damasceno, Alfredo; UNICAMP, Dept of Neurology, University of Campinas                      damasceno, benito; UNICAMP, Dept of Neurology, University of Campinas                      Balashov, Konstantin; UMDNJ-RWJMS, Neurology</p>
Keywords:	Multiple sclerosis, Relapsing/remitting, Beta-interferon
Abstract:	Plasmacytoid dendritic cells (pDCs) have both stimulatory and regulatory effects on T cells. Due to their capacity to produce large

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

	amounts of type I interferon and to activate regulatory T cells, pDCs may play a critical role in controlling the immune response in multiple sclerosis. In the present study, we provide evidence that MS patients in relapse have a higher percentage of pDCs in CSF than do patients in remission or those with non inflammatory neurological disease.



For Peer Review

2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## Plasmacytoid Dendritic Cells are Increased in Cerebrospinal Fluid During Multiple Sclerosis Relapse

Ana Leda F. Longhini<sup>1\*</sup>, Felipe von Glehn<sup>1,2 \*</sup>, Carlos Otávio Brandão<sup>1</sup>, Rosemeire F.O. de Paula<sup>1</sup>, Fernando Pradella<sup>1</sup>, Vânia D. Ramos da Silva<sup>1</sup>, Adriel S. Moraes<sup>1</sup>, Juliana C. Sartorelli<sup>1</sup>, Alessandro S. Farias<sup>1</sup>, Elaine C. Oliveira<sup>1,3</sup>, Alfredo Damasceno<sup>2</sup>, Benito P. Damasceno<sup>2</sup>, Konstantin E Balashov<sup>4</sup> and Leonilda M.B.Santos<sup>1</sup>

Neuroimmunology Unit, Dept Genetics, Evolution and Bioagents, Biology Institute University of Campinas – UNICAMP (1); Dept of Neurology, University of Campinas - UNICAMP (2); FATEC-Sorocaba (3), SP Brazil; Robert Wood Johnson Medical School, New Brunswick, NJ (4).

Keywords: Plasmacytoid dendritic cells, CSF, multiple sclerosis

- The authors contribute equally to this article

Address for correspondence: Leonilda M. B. Santos Ph.D. – Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes do Instituto de Biologia da UNICAMP, Campinas, SP Brazil, CEP 13083-970, phone: 55.19.35216263; FAX 55.19.35216276 Email: leonilda@unicamp.br

2  
3  
4 **Abstract**  
5  
6  
7

8 Plasmacytoid dendritic cells (pDCs) have both stimulatory and regulatory effects on T  
9 cells. Due to their capacity to produce large amounts of type I interferon and to activate  
10 regulatory T cells, pDCs may play a critical role in controlling the immune response in  
11 multiple sclerosis. In the present study, we provide evidence that MS patients in relapse  
12 have a higher percentage of pDCs in CSF than do patients in remission or those with  
13 non-inflammatory neurological disease.  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

2  
3  
4  
5  
6 **Introduction**  
7  
8  
9

10 The pathogenesis of multiple sclerosis is mainly driven by central nervous system -  
11 invading encephalitogenic Th1 and/ or Th17 cells, which are affected by plasmacytoid  
12 dendritic cells (pDCs). This pDC has taken on particular emphasis due to its importance  
13 in stimulating or down regulating T effectors cells in demyelinating diseases [1].  
14  
15  
16  
17  
18

19 The pDCs are present in the CSF, leptomeninges and demyelinating lesions of patients  
20 with MS [2] and secrete large amounts of type I interferon which stimulates the  
21 mobilization of activated inflammatory cells [3]. On the other hand, pDCs can induce  
22 the activation of regulatory T cells to down regulate the inflammatory response [4].  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29 Moreover, the use of type I interferon as an immunomodulator in the treatment of MS  
30 patients has proved beneficial for patients with the relapsing / remitting (RRMS) form  
31 of MS, and the production of this cytokine by the pDCs may suggest an important  
32 immunomodulatory function by these cells.  
33  
34  
35  
36  
37

38 In the present study, the concentration of pDCs in the CSF and peripheral blood of MS  
39 patients during relapsing and remitting phases of the disease was determined, and  
40 compare to what is present in other non-inflammatory neurological diseases (OND).  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47

48 **Patients and methods**  
49  
50  
51  
52

53 Peripheral venous blood (5 ml) and CSF (5-10 ml) samples were collected from  
54 patients with RRMS defined by the McDonald revised criteria [5]. The MS patients  
55 were divided into two groups: relapsing (seven patients) and in remission (eleven  
56 patients). Moreover, samples were collected from 8 patients with other  
57  
58  
59  
60

2  
3  
4 non-inflammatory neurological diseases. Relapse was defined as recent onset (within  
5  
6 1-7 days) of clinical neurological symptoms, without any clinical or laboratorial sign of  
7  
8 infection at the time of lumbar puncture. All included patients agreed to participate in  
9  
10 the study, which was approved by the University of Campinas Committee for Ethical  
11  
12 Research and signed a term of Consent. The clinical characteristics of the patients are  
13  
14 presented in Table 1.

15  
16  
17 Among the relapse group described in Table 1, three patients were using interferon beta  
18  
19 (two for 3 years and one for 5 years). In the remitting group, three were also using  
20  
21 interferon beta (one for 1,5 years, the second for 2 years and the third for 3 years). No  
22  
23 patient was using corticosteroids or other immunosuppressive drugs at the time of  
24  
25 investigation.  
26  
27

28  
29 The group with OND consisted of eight patients with no clinical evidence of any  
30  
31 inflammatory process in the CNS. Two patients had had an ischemic stroke, two  
32  
33 patients had pseudotumor cerebri, one had Leber hereditary optic neuropathy, one had  
34  
35 epilepsy, one had normal pressure hydrocephalus and one patient had post trauma  
36  
37 headache.  
38  
39

#### 40 41 42 **Flow Cytometry Analysis** 43

44  
45  
46  
47  
48 The percentage of pDCs was determined by staining the cells from the CSF and  
49  
50 peripheral blood with anti-human BDCA2-APC (Miltenyi Biotec, USA) and  
51  
52 anti-human CD4-PE (BD Biosciences, USA). Data were acquired using a BD  
53  
54 FACSCanto cytometer (BD Biosciences) and analyzed using FACSDiva software (BD  
55  
56 Biosciences).  
57  
58  
59  
60

## Results and Discussion

The pDCs are elevated in the CSF of patients with the relapse phase of MS (Fig 1). Since there are no differences in the number of these cells in the peripheral blood or in the total number of cells in the CSF of the same patient, pDCs must be selectively increased in the CNS during the relapse phase of disease. As far as we know, this is the first observation of the increase of percentage of pDCs in the CSF of MS patients studying different phases of the disease. A previous study reported an elevated concentration of dendritic cells, mainly pDCs, in patients with infections and other inflammatory neurological diseases, including MS, but no mention is made of the variation in different phases of the disease [6]

The fact that some patients were being treated with interferon beta in the two groups, makes it difficult to determine whether the effect observed is influenced by the treatment.

The ambivalent function of pDCs has been observed in the experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) a model of studying MS. A recent report shows that they promote priming of autoimmune Th17 in EAE, whereas depletion of pDC prior to induction of the disease decreases its severity [7]. Another recent study has demonstrated that clinical signs of EAE are exacerbated considerably if the pDCs are depleted during the peak period of the disease. Thus, pDC depletion significantly enhances the activation of CNS cells and cytokines production such as IL-17 and IFN- $\gamma$ , but not peripheral CD4 T cells [1]. The tolerogenic property of pDCs has been associated with the expression of indoleamine 2, 3 dioxygenase (IDO). IDO is an enzyme involved in tryptophan catabolism. Its immunosuppressive effect is linked to

2  
3  
4 the reduction of local tryptophan concentration and to the activation of regulatory T  
5  
6 cells [8].

7  
8 Although the exact function of pDCs in CNS needs to be elucidated in future studies,  
9  
10 the presence of pDCs during the relapse phase indicates an important role of these cells  
11  
12 in the inflammatory response in MS.  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19

### 20 **Acknowledgments**

21  
22 The authors would like to acknowledge the financial support from FAPESP and  
23  
24 CAPES. We thank Dr. Alexandre E. Nowill from CIPOI – UNICAMP.  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

2  
3  
4  
5  
6  
7  
8 **Reference:**  
9

- 10 1. Bayley-Bucktrout SL, Caulkins SC, Goings G, et al. Cutting Edge: Central  
11 Nervous System Plasmacytoid Dendritic Cells Regulate the Severity of  
12 Relapsing Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J Immunol* 2008; 180:  
13 6457-6461.  
14
- 15 2. Lande R, Gava V, Serafini B, et al. Plasmacytoid dendritic cells in multiple  
16 sclerosis: intracerebral recruitment and impaired maturation in response to  
17 interferon-beta. *J Neuropathol Exp Neurol* 2008; 67: 388-401.  
18
- 19 3. Gilliet, M., Cao, W. & Liu, Y. J. Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic  
20 acids in viral infection and autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol* 2008; 8:  
21 594-606.  
22
- 23 4. Moseman EA, Liang X, Dawson AJ, et al. Human plasmacytoid dendritic cells  
24 activated by CpG oligodeoxynucleotides induce the generation of CD4+CD25+  
25 regulatory T cells. *J Immunol* 2004; 173: 4433-4442.  
26
- 27 5. Polman C H, Reingold S C, Edan G, et al. Diagnostic criteria for multiple  
28 sclerosis: 2005 revisions to the 'McDonald Criteria'. *Ann Neurol* 2005; 58,  
29 840-846.  
30
- 31 6. Pashenkov M, Huang YM, Kostulas V, et al. Two subsets of dendritic cells are  
32 present in human cerebrospinal fluid. *Brain* 2001; 124: 480-492.  
33
- 34 7. Isaksson M, Ardesjo B, Ronnblom L, et al. Plasmacytoid DC promote priming  
35 of autoimmune Th17 cells and EAE. *Eur J Immunol* 2009; 39: 2925-2935.  
36
- 37 8. Kwidzinski E, Bechmann I. IDO expression in the brain: a double-edge sword. *J*  
38 *Mol Med* 2007; 85: 1351-1359.  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

**Table I. Demographic and baseline clinical characteristics of patients and controls**

	<b>Patients No.</b>	<b>Age, years*</b>	<b>Sex F / M</b>	<b>EDSS***</b>	<b>Time from first relapse, years*</b>	<b>CSF cell concentration/<math>\mu</math>l*</b>	<b>OC Band Presence</b>
<b>RRMS - relapses</b>	7	34 (30 - 47)	6 / 1	2 (1,5 - 5,5)	5 (1 - 8)	6 (0 - 17)	6+ / 1-
<b>RRMS - remission</b>	11	34 (26 - 61)	10 / 1	2 (0 - 6,0)	3 (1 - 8)	3 (1 - 23)	6+ / 5-
<b>OND***</b>	8	46 (30 - 64)	6 / 2			2 (0 - 5)	

\*Median (range)

\*\*Other Neurological Diseases

\*\* Expanded Disability Status Score

For Peer Review

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

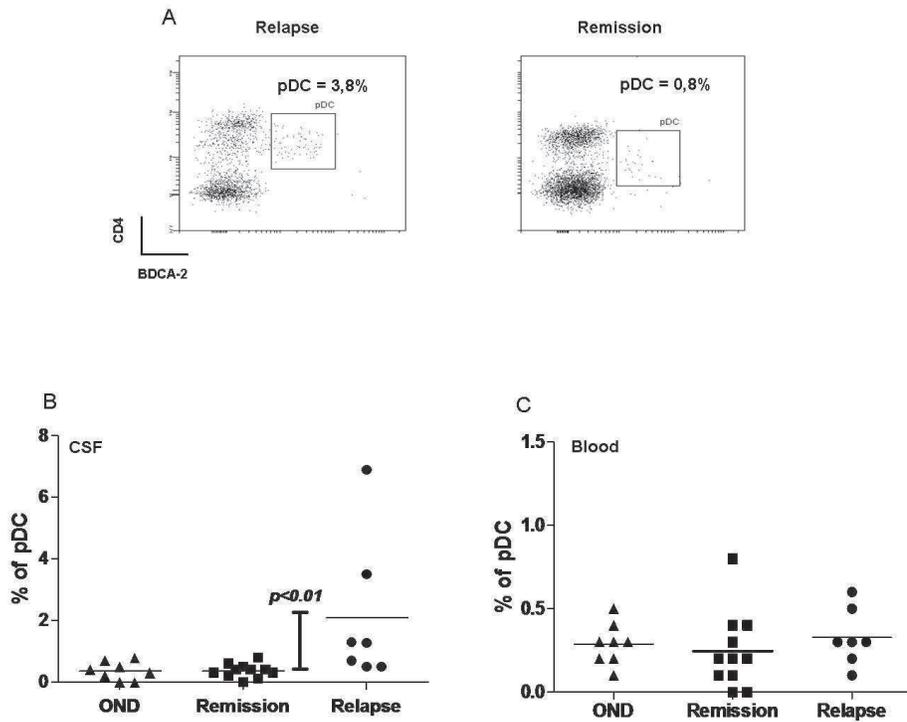


Figure I. Concentration of pDCs among others mononuclear cells in CSF and peripheral blood. (A) CD4 and BDCA2 expression by CSF cells, with results representative of MS patients in relapse (n=7) and in remission (n=11). (B) Concentration of pDCs in CSF, with data points representing individuals; (C) Concentration of pDCs in peripheral blood, with data points representing individuals. The p value was determined using unpaired T-test.  
375x283mm (96 x 96 DPI)

2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11 **Figure I.** Concentration of pDCs among others mononuclear cells in CSF and  
12 peripheral blood. (A) CD4 and BDCA2 expression by CSF cells, with results  
13 representative of MS patients in relapse (n=7) and in remission (n=11).  
14 (B) Concentration of pDCs in CSF, with data points representing individuals;  
15 (C) Concentration of pDCs in peripheral blood, with data points representing  
16 individuals. The *p* value was determined using unpaired T-test.  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60