

O ENVOLVIMENTO DA VIA DA QUINURENINA EM UM MODELO DE ENCEFALOMIELITE AUTOIMUNE EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS

Nathalie Savedra Gomes¹

Cristiano Ricardo Jesse²

Micheli Stéfani Zarzecki³

Resumo:

A encefalomielite autoimune experimental (EAE), é um modelo que mimetiza a esclerose múltipla (EM) em roedores, esse modelo é caracterizado por uma resposta auto-imune contra as proteínas do sistema nervoso central. Já se sabe que a via da quinurenina (VQ) pode estar envolvido com processos inflamatórios presentes no nosso organismo. Portanto, esse trabalho teve como objetivo investigar o envolvimento da VQ em um modelo EAE em camundongos. Os animais foram pesados e observados diariamente para sinais clínicos de EAE. Os níveis de interferon- (IFN-) e interleucina-17 (IL-17) foram medidos usando kits ELISA nos tecidos: córtex pré-frontal, hipocampo, medula espinhal, baço e linfonodo. O tratamento com o inibidor daIDO (INCB024360, enzima limitante na VQ) reduziu significativamente a gravidade da doença quando comparado ao grupo veículo/EAE. Os animais que foram induzidos no modelo de EAE mostraram uma diminuição do peso corporal em comparação com o grupo controle. No modelo de EAE os animais tiveram um aumento nos níveis de citocinas inflamatórias (IFN- e IL-17) no córtex pré-frontal, hipocampo, medula espinhal, baço e linfonodo comparadas ao grupo controle. Houve uma diminuição significativa nos níveis de citocinas inflamatórias induzida pelo INCB024360/EAE em comparação ao grupo Veículo/EAE. Os resultados deste estudo sugerem que o tratamento com um inibidor daIDO demonstrou efeito farmacológico na EAE, portanto pode ser um potencial alvo terapêutico para o tratamento de pacientes com EM.

Palavras-chave: doenças neurodegenerativas; quinureninas; neuroproteção

Modalidade de Participação: Iniciação Científica

O ENVOLVIMENTO DA VIA DA QUINURENINA EM UM MODELO DE ENCEFALOMIELITE AUTOIMUNE EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS

¹ Aluno de graduação. nathaliegomes82@gmail.com. Autor principal

² Docente. cristianojesse@unipampa.edu.br. Orientador

³ Aluno de pós-graduação. michelizarzecki@gmail.com. Co-orientador



O ENVOLVIMENTO DA VIA DA QUINURENINA EM UM MODELO DE ENCEFALOMIELE AUTOIMUNE EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS

1. INTRODUÇÃO

A encefalomielite autoimune experimental (EAE), é um modelo que mimetiza a esclerose múltipla (EM) em roedores, esse modelo é caracterizado por uma resposta auto-imune contra as proteínas do sistema nervoso central (SNC), que culmina em infiltrado inflamatório, gliose, lesão da bainha de mielina e morte neuronal (MCFARLAND e MARTIN, 2007; GOVERMAN, 2009; HAFLER, 2004).

A patogênese da doença é caracterizada pela ativação de células mononucleares, predominantemente de células TCD4+ e CD8+, que migram através da barreira hematoencefálica (BHE) para o SNC e são reativados pela apresentação das células gliais do cérebro e da medula espinhal. Este tráfico de células é um processo fortemente regulado que está associado com a ativação das células T (GOVERMAN, 2009) pela BHE.

A EM é uma doença inflamatória desmielinizante mais comum do SNC, durante o curso da EM, os antígenos virais ou infecciosos ativam as células T auto-reativas na periferia, que apresentam similaridade molecular com o antígeno do SNC (SOSPEDRA e MARTIN, 2005), diferenciam-se em células T *helper* tipo 1 (TH1) ou T *helper* tipo 17 (TH17), migram através da BHE e induzem lesões distribuídas ao longo do SNC (MCFARLAND e MARTIN, 2007).

Em resumo, a EM causa incapacidade neurológica em adultos jovens, afetando cerca de dois milhões de pessoas no mundo (MCFARLAND e MARTIN, 2007; OMS). No Brasil, há 35 mil portadores e cerca de 13 mil em tratamento, de acordo com o DATASUS. Embora fatores genéticos e ambientais também estejam implicados na patogênese da EM (BARANZINI et al, 2010), existe uma incerteza sobre a fisiopatologia subjacente da EM e, embora a pesquisa indique que a EM possui uma patogênese imuno mediada, os alvos de resposta imunológica não estão definidos (SRIVASTAVA et al., 2012), portanto sua etiologia permanece obscura.

A EM é uma doença auto-imune multifatorial do SNC para a qual não se conhece atualmente nenhuma cura. Atualmente, os fármacos mais utilizados para o tratamento da EM incluem medicamentos que atuam inibindo a resposta inflamatória. No entanto, estas terapias são frequentemente associadas com efeitos adversos para o corpo, e o mais importante, não mudam efetivamente o curso da doença. Neste contexto se faz necessário o estudo de novos mecanismos, que possam estar envolvidas na patogênese da EM, e que possam tornar-se alvo para o tratamento desta doença.

A via da quinurenina (VQ) é uma rota central no metabolismo do triptofano (TRP) na maioria dos tecidos de mamíferos, inclusive no cérebro (BEADLE et al, 1947). No cérebro, o catabolismo de TRP ocorre principalmente nos astrócitos e na microglia (GRANT et al., 2000). Embora alguns neurônios também possuem indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO)(MILLER et al., 2004). Em condições fisiológicas normais, o metabolismo do TRP ocorre principalmente no fígado através do TDO como a enzima limitante no primeiro processo da via. Em casos de inflamação, infecção ou estresse oxidativo, que ativam a enzima IDO (principal enzima na via) em vários tecidos inclusive no cérebro (HEYES et al., 1993).

A degradação do TRP através da VQ ocorre principalmente no sangue e nos tecidos linfóides (MOFFETT e NAMBOODIRI 2003). A atividade da enzima IDO é aumentada por citocinas pró-inflamatórias, como o interferon- γ (IFN- γ) (CARLIN et al., 1987) e inibidas pela citocinas anti-inflamatórias, como a interleucina-4 (IL-4) (MUSSO et al., 1994). Já se sabe, que alguns metabolitos da VQ apresenta-se com papel de neuroproteção ou neurotóxico, 3-hidroxiquinurenina (3-HK) e o ácido quinolínico (QUIN) derivados de microgliais são neurotóxicos enquanto o ácido quinurênico (KYNA) gerado por astrócitos é neuroprotetor. Portanto, esse trabalho teve como objetivo investigar o envolvimento da via da quinurenina em um modelo de encefalomielite autoimune experimental em camundongos.

2. METODOLOGIA

As experiências foram conduzidas utilizando camundongos fêmeas C57BL/6, os animais foram mantidos em grupos de seis animais por gaiola, mantidos sob temperatura controlada (22 ± 1 ° C) com um ciclo de 12 h claro/escuro, com acesso livre à água e comida antes dos experimentos. Todos os protocolos foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética Animal da Universidade Federal do Pampa (Número de protocolo da CEUA: 034/2017).

A EAE foi induzida por imunização subcutânea (s.c.) nos músculos com 200 μ l de uma emulsão contendo 200 μ g de péptido MOG35-55 e 500 μ g de extrato H57Ra de Mycobacterium tuberculosis (Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA) em óleo adjuvante incompleto de Freund (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA). Este procedimento foi repetido após 7 dias para aumentar a incidência de EAE, conforme descrito anteriormente (STROMNES E GOVERMAN, 2006). Além disso, os animais receberam 300 ng de toxina Pertussis (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) i.p. no dia 0 e dia 2 pós-imunização. Os animais receberam o inibidor da IDO (INCB024360) na dose de 200 mg/kg (per oral, p.o.).

Os sinais clínicos de EAE foram avaliados de acordo com as seguintes pontuações: 0, sem sinais de doença; 1, perda de tom na cauda; 2, paresia dos membros posteriores; 3, paralisia dos membros posteriores; 4, tetraplegia; e 5, moribundos e/ ou morte.

Os camundongos foram pesados e observados diariamente para sinais clínicos de EAE por até 25 dias pós-imunização. Os camundongos que não desenvolveram a doença foram excluídos do estudo.

Os níveis de interferon- γ (IFN- γ) e interleucina-17 (IL-17) foram medidos usando kits ELISA, de acordo com as recomendações do fabricante.

3. RESULTADOS e DISCUSSÃO

O tratamento com o inibidor da IDO (INCB024360, enzima limitante na VQ) reduziu significativamente a gravidade da doença quando comparado ao grupo veículo/EAE. (Figura 1A e 1B).

Os animais que foram induzidos no modelo de EAE mostraram uma diminuição do peso corporal em comparação com o grupo controle. O tratamento com INCB024360 (inibidor da IDO) foi capaz de melhorar esse parâmetro nos 25 dias de tratamento (Figura 1C).

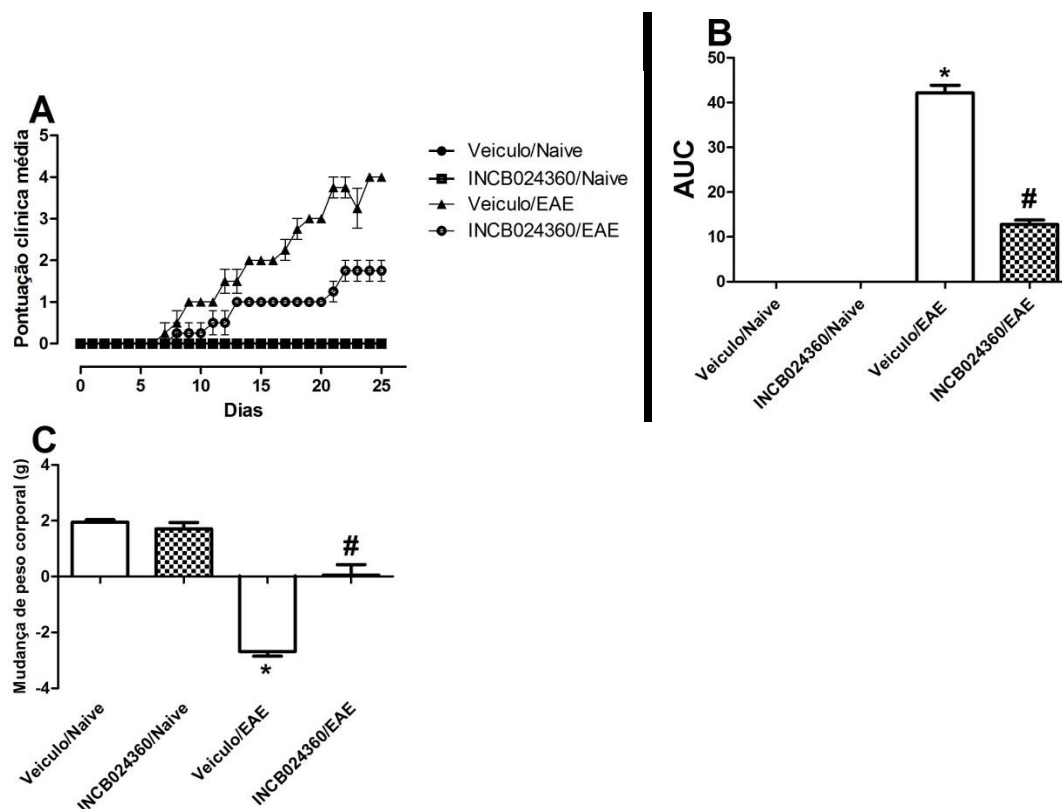


Figura 1. O inibidor da IDO (INCB024360) melhora os sinais clínicos induzidos pela EAE em camundongos. Pontuação clínica média (A), área abaixo da curva (AUC) (B) e mudança de peso corporal (C) em um modelo de EAE induzido pela imunização com péptido MOG35-55/CFA e toxina pertussis. Os valores foram analisados por ANOVA de 2 vias e Teste de comparação múltipla de Bonferroni. Cada valor é expresso em média $\pm$ S.E.M. ($n = 6$). * $P < 0,05$ quando comparado com Veículo/Naive e # $P < 0.05$ quando comparado com INCB024360/Naive.

No modelo de EAE os animais tiveram um aumento nos níveis de citocinas inflamatórias (IFN- γ e IL-17) no córtex pré-frontal, hipocampo, medula espinhal, baço e linfonodo comparadas ao grupo controle. Houve uma diminuição significativa nos níveis de citocinas inflamatórias induzida pelo INCB024360/EAE em comparação ao grupo Veículo/EAE. O aumento das citocinas foi significativamente evitado pelo tratamento com o composto INCB024360 (Tabela 1).

As células TH1 são caracterizadas por sua expressão de IFN- γ enquanto a TH17 produz principalmente IL-17 (BETTELLI et al., 2008). A patogênese da EM/EAE é um processo complexo, envolvendo células autoagressivas TH1 e TH17, macrófagos, células dendríticas, astrócitos e microglia, bem como uma gama de mediadores inflamatórios produzidos por essas células (GOVERMAN, 2009; HAFLE, 2004). Nossas descobertas abrem opções importantes para o desenvolvimento de terapias clinicamente relevantes para o manejo da EM, bem como para outras doenças imunes em que as células TH1 e TH17 desempenham um papel fundamental.

Tabela 1. O Inibidor da IDO (INCB024360) diminui a produção de citocinas inflamatórias na EAE induzida pela imunização com péptido MOG35-55/CFA e toxina pertussis em camundongos.

(pg/mg proteína)	Veiculo		INCB024360	
	Naive	EAE	Naive	EAE
<i>Córtex pré-frontal</i>				
IFN- γ	21.1 $\pm$ 1.02	91.8 $\pm$ 5.11 ^a	19.7 $\pm$ 0.95	28.9 $\pm$ 2.01 ^b
IL-17	9.17 $\pm$ 0.56	48.8 $\pm$ 1.01 ^a	12.3 $\pm$ 1.22	17.8 $\pm$ 0.96 ^b
<i>Hipocampo</i>				
IFN- γ	28.9 $\pm$ 1.44	124.8 $\pm$ 6.89 ^a	32.8 $\pm$ 1.49	44.2 $\pm$ 2.31 ^b
IL-17	14.8 $\pm$ 1.71	60.2 $\pm$ 3.29 ^a	18.7 $\pm$ 1.20	21.8 $\pm$ 1.35 ^b
<i>Medula espinhal</i>				
IFN- γ	34.8 $\pm$ 2.10	178.8 $\pm$ 8.10 ^a	37.8 $\pm$ 2.11	48.9 $\pm$ 2.88 ^b
IL-17	24.4 $\pm$ 1.37	59.7 $\pm$ 1.99 ^a	30.7 $\pm$ 3.17	34.4 $\pm$ 2.91 ^b
<i>Baço</i>				
IFN- γ	78.5 $\pm$ 6.01	247.8 $\pm$ 5.74 ^a	89.7 $\pm$ 5.41	102.8 $\pm$ 9.11 ^b
IL-17	44.1 $\pm$ 2.38	127.9 $\pm$ 3.01 ^a	50.8 $\pm$ 4.19	55.9 $\pm$ 4.91 ^b
<i>Linfonodo</i>				
IFN- γ	67.9 $\pm$ 5.10	177.8 $\pm$ 8.54 ^a	80.1 $\pm$ 7.49	85.7 $\pm$ 6.71 ^b
IL-17	37.8 $\pm$ 2.10	97.7 $\pm$ 5.67 ^a	42.8 $\pm$ 2.63	47.7 $\pm$ 2.31 ^b

Os valores foram analisados por ANOVA de 2 vias e Teste de comparação múltipla de Bonferroni. Cada valor é expresso em média $\pm$ S.E.M. (n =6). a P < 0,05 quando comparado com Veiculo/Naive, b P < 0.05 quando comparado com Veiculo/EAE, c P < 0.05 quando comparado com INCB024360/Naive.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados deste estudo sugerem que o tratamento com um inibidor da IDO demonstrou efeito farmacológico na EAE, portanto pode ser um potencial alvo terapêutico para o tratamento de pacientes com EM.

5. REFERÊNCIAS

BARANZINI, S.E.; et al. Genome, epigenome and RNA sequences of monozygotic twins discordant for multiple sclerosis. *Nature*, v. 464: p. 1351–6, 2010.

BEADLE, G.W.; MITCHELL, H.K.; NYC, J.F. Kynurenine as an intermediate in the formation of nicotinic acid from tryptophane by neurospora. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 33, p.155–8, 1947.

BETTELLI, E.; KORN, T.; OUKKA, M.; KUCHROO, V.K. Induction and effector functions of T(H)17 cells. *Nature*, v. 453, p. 1051–1057, 2008.

CARLIN, J.M.; BORDEN, E.C.; SONDEL, P.M. & BYRNE, G.I. Biologic-response-modifier-induced indoleamine 2,3-dioxygenase activity in human peripheral blood mononuclear cell cultures. *J Immunol*, v. 139, p. 2414–2418, 1987.

ELLNER, J.; KRAUS, J.; AWAD, A.; MILO, R.; HEMMER, B.; STUVE, O. The increasing incidence and prevalence of female multiple sclerosis – a critical analysis of potential environmental factors. *Autoimmun Rev*, v.10, p. 495–502, 2011.

FROHMAN, E.M.; RACKE, M.K.; RAINE, C.S. Multiple sclerosis – the plaque and its pathogenesis. *N Engl J Med*, v. 354, p.942–55, 2006.

GOVERMAN, J. Autoimmune T cell responses in the central nervous system. *Nat Rev Immunol*, v. 9, n. 6, p. 393, 2009.

GRANT, R.S.; NAIF, H.; ESPINOSA, M. & KAPOOR, V. IDO induction in IFN-gamma activated astroglia: a role in improving cell viability during oxidative stress. *Redox Rep*, v. 5, p. 101–104, 2000.

HAFLER, D.A. Multiple sclerosis. IFN-g, TNF-a. *Clin Invest*, v. 113, p.788–94, 2004.

HEYES, M.P. et al. A mechanism of quinolinic acid formation by brain in inflammatory neurological disease. Attenuation of synthesis from L-tryptophan by 6-chlorotryptophan and 4-chloro-3-hydroxyanthranilate. *Brain*, v. 116, p. 1425–1450, 1993.

MCFARLAND, H.F.; MARTIN, R. Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity. *Nat Immunol*, v. 8, p. 913, 2007.

MCPARTLAND, J.M.; GLASS, M.; PERTWEE, R.G. Meta-analysis of cannabinoid ligand binding affinity and receptor distribution: interspecies differences. *Br J Pharmacol*, v. 152, p. 583–93, 2007.

MILLER, C.L. Expression of the kynurenine pathway enzyme tryptophan 2,3-dioxygenase is increased in the frontal cortex of individuals with schizophrenia. *Neurobiol Dis*, v. 15, p. 618–629, 2004.

MOFFETT, J.R.; NAMBOODIRI, M.A. Tryptophan and the immune response. *Immunol Cell Biol*, v. 81, p. 247–265, 2003.

MUSSO, T., et al. Interleukin-4 inhibits indoleamine 2,3-dioxygenase expression in human monocytes. *Blood*, v. 83, p.1408–1411, 1994.

SOSPEDRA, M.; MARTIN, R. Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol*, v. 23, p. 683–747, 2005.

SRIVASTAVA, R.; ASLAM, M.; KALLURI, S.R., et al. Potassium channel KIR4.1 as an immune target in multiple sclerosis. *N Engl J Med*, v. 367, n. 2, p.115-123, 2012.

STROMNES, I.M.; GOVERMAN, J.M. Active induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nat Protoc*, v. 1, p. 1810–1819, 2006.