



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROLOGIA  
MESTRADO EM NEUROLOGIA

**PATRICIA BOTELHO SCHIAVONI DE OLIVEIRA**

**AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO E PRODUÇÃO DE CITOCINAS EM  
CULTURAS DE CÉLULAS T ATIVADAS DE PACIENTES COM  
NEUROMIELITE ÓPTICA RECORRENTE-REMITENTE**

RIO DE JANEIRO  
2012

**PATRICIA BOTELHO SCHIAVONI DE OLIVEIRA**

**AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO E PRODUÇÃO DE CITOCINAS EM  
CULTURAS DE CÉLULAS T ATIVADAS DE PACIENTES COM  
NEUROMIELITE ÓPTICA RECORRENTE-REMITENTE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurologia do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Neurologia, área de concentração Neurociências.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cleonice Alves de Melo Bento

RIO DE JANEIRO  
2012

O48 Oliveira, Patricia Botelho Schiavoni de.  
Avaliação da proliferação e produção de citocinas em culturas de células T  
ativadas de pacientes com neuromielite óptica recorrente-remitente / Patricia  
Botelho Schiavoni de Oliveira, 2012.  
56f ; 30 cm

Orientador: Cleonice Alves de Melo Bento.  
Dissertação (Mestrado em Neurologia) - Universidade Federal do Estado do  
Rio de Janeiro, área de concentração Neurociências, Rio de Janeiro, 2012.

1. Sistema nervoso central. 2. Neuromielite óptica. 3. Citocinas 4. Células T -  
Proliferação. I. Bento, Cleonice Alves de Melo. II. Universidade Federal do  
Estado do Rio de Janeiro (2003). Centro de Ciências Biológicas e da Saúde.  
Curso de Mestrado em Neurologia, área de concentração Neurociências. III.  
Título.

CDD – 612.82

**PATRICIA BOTELHO SCHIAVONI DE OLIVEIRA**

**AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO E PRODUÇÃO DE CITOCINAS EM  
CULTURAS DE CÉLULAS T ATIVADAS DE PACIENTES COM  
NEUROMIELITE ÓPTICA RECORRENTE-REMITENTE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurologia do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Neurologia, área de concentração Neurociências.

Aprovada em: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cleonice Alves de Melo Bento  
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro - UNIRIO

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vera Carolina Bordallo Bittencourt  
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro - UNIRIO

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Landi Veivi Guillermo Costila  
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro - UNIRIO

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Claudia Cristina Ferreira Vasconcelos  
Universidade Gama Filho - UGF

## **DEDICATÓRIA**

Dedico a meus familiares e amigos, pelo apoio em todos os momentos.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus e a Nossa Senhora pela vida maravilhosa que me deram e por sempre iluminarem o meu caminho.

Aos meus pais Nilo Sérgio (in memorian) e Alice, pelo amor, carinho e zelo dedicados a mim e por sempre acreditarem nos meus sonhos.

Ao meu esposo Adilson Carlos, pelo companheirismo e apoio em todos os momentos.

Ao meu bebê, que ainda encontrando-se em meu ventre, já participa de alguma forma desta nova etapa.

A minha tia e madrinha Alcinda e minhas tias Alzira (in memorian) e Maria Helena pelo carinho e incentivo.

A minha orientadora Dr<sup>a</sup>. Cleonice Alves de Melo Bento, pela sua amizade, dedicação, colaboração e compreensão.

A Prof<sup>a</sup>: Regina Maria Papais Alvarenga e aos demais professores do curso de mestrado, aos quais devo minha formação.

Ao Dr. Ulisses Cerqueira Linhares, por motivar-me a realizar este curso, pelo apoio e amizade.

Aos amigos do Laboratório de Imunopatologia e Imunofisiologia dos Linfócitos T (LILIT), Joana, Morgana, Priscila, Thaís, Thaíssa, Bruna, Régis, Vera e Landi, pela colaboração, amizade e por todos os momentos em que convivemos.

Aos meus colegas da turma de mestrado 2010.2, pela amizade e por tudo que compartilhamos juntos.

E a todos que de certa forma contribuíram para essa conquista.

“A mente que se abre a uma nova idéia,  
jamais voltará ao tamanho original”

Albert Einstein

## RESUMO

Neuromielite Óptica (NMO) é uma desordem inflamatória autoimune do sistema nervoso central (SNC), caracterizada pelo ataque imune à bainha de mielina dos neurônios dos nervos ópticos e da medula espinhal, causando assim ataques simultâneos ou sequenciais de neurite óptica (NO) e mielite transversa (MT). Apesar de alguns pacientes apresentarem curso monofásica, a maioria tem a forma recorrente da doença com ataques repetidos de MT e/ou NO, designada NMO recorrente remittente (NMO-RR). Devido ao reconhecimento recente da NMO como uma doença distinta da esclerose múltipla, poucos estudos têm sido dedicados a avaliar o comportamento das células T de pacientes com NMO-RR. Portanto, o objetivo do presente estudo foi analisar aspectos funcionais das células T de pacientes com NMO-RR durante a fase de remissão clínica e correlacionar tais eventos imunes com os déficits neurológicos. Para os nossos experimentos, células mononucleares do sangue periférico (CMSP), obtidas de indivíduos saudáveis e de pacientes com NMO-RR na remissão clínica, foram estimuladas em cultura com ativador policlonal de células T humanas, a fitohemaglutinina. Após 3 dias de cultura a proliferação e a produção de citocinas foram avaliadas através da captura de timidina tritiada e pela técnica ELISA, respectivamente. Nossos resultados demonstraram que, quando comparado ao grupo controle, a proliferação e a produção de citocinas relacionadas ao fenótipo Th1, IL-2 e IFN- $\gamma$ , foram significativamente inferiores nas culturas de células de pacientes com NMO-RR. Em contraste, um domínio do fenótipo relacionado ao fenótipo Th17 foi observado nas culturas dos pacientes com NMO-RR. Esse domínio fenotípico inflamatório não foi relacionado, a princípio, a uma deficiência na produção de citocinas anti-inflamatórias IL-10 e TFG- $\beta$ . Interessantemente, a liberação de IL-21 e IL-6 pelas células T policlionalmente ativadas correlacionou diretamente com o grau de déficit neurológico. Em resumo, apesar de preliminares, nossos resultados sugerem o envolvimento de citocinas relacionadas ao fenótipo Th17 na imunopatogênese da NMO-RR.

Palavras-chave: Neuromielite óptica. Citocinas. Proliferação das células T.



## ABSTRACT

Neuromyelitis optica (NMO) is an autoimmune, inflammatory disorder of the central nervous system (CNS) in which the immune system attacks myelin of the neurons located at the optic nerves and spinal cord, thus producing a simultaneous or sequential optic neuritis (ON) and transverse myelitis (TM). Although the disease can be monophasic, the majority of the patients have a relapsing form of the disease with repeated attacks of TM and/or ON, designed recurrent remittent NMO (RR-NMO). Due the recent recognition of NMO as a distinct disease from multiple sclerosis, few studies have been dedicated to evaluate de T cell behavioral in patients with RR-NMO. Therefore, the objective of this study was to analyze the functional aspects of T cells, such as proliferation and cytokine profile, in RR-NMO patients during clinical remission and correlate them with neurological disability. For our experiments, peripheral blood mononuclear cells, obtained from healthy individuals and from patients with NMO-RR in clinical remission, were stimulated in cultures with human T cell polyclonal activator, the phytohemagglutinin. After 3 days, the proliferation and cytokine content were analyzed through [<sup>3</sup>H] thymidin up-take and ELISA technique, respectively. Our results demonstrated that, as compared with control group, the proliferation and production of Th1-related cytokines, IL-2 and IFN- $\gamma$ , were significantly lower in cell cultures from NMO-RR patients. In contrast, a dominant Th17-related phenotype was observed in cell cultures from NMO-RR patients. This dominant inflammatory phenotype was not related, at primarily, to damage in the production of anti-inflammatory cytokines IL-10 and TFG- $\beta$ . Interestingly, the IL-21 and IL-6 release by polyclonally-activated T cells correlated directly with neurological disabilities. In summary, although preliminary, our results suggest na involvement of Th17-related cytokines in the immunopathogenesis of NMO-RR.

Key words: Neuromyelitis optica. Cytokines. T cell proliferation.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1	Espectro da Neuromielite óptica .....	16
Figura 1	Resposta proliferativa e viabilidade celular em culturas de CMSP derivadas de pacientes com NMO-RR .....	31
Figura 2	Produção de citocinas relacionadas ao fenótipo Th1 em culturas de CMSP de pacientes com NMO-RR .....	33
Figura 3	Produção de citocinas relacionadas ao fenótipo Th2 em culturas de CMSP de pacientes com NMO-RR .....	33
Figura 4	Produção de citocinas relacionadas ao fenótipo Th17 em culturas de CMSP de pacientes com NMO-RR .....	34
Figura 5	Produção de citocinas relacionadas às células T reguladoras em culturas de CMSP de pacientes com NMO-RR .....	35
Figura 6	Correlação entre a produção de IL-6 e IL-21 com o EDSS nos pacientes com NMO-RR .....	36

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características dos indivíduos .....	31
----------	--------------------------------------	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APCs - Células apresentadoras de antígenos  
AQP4 - Aquaporina 4  
CD20 - Marcadores de diferenciação 20  
CMSP - Células mononucleares do sangue periférico  
CTL - Linfócitos T citotóxicos  
DCs - Células dendríticas  
DNA - Ácido desoxirribonucleico  
EDSS - Escala expandida do estado de incapacidade  
EM - Esclerose múltipla  
EM-RR - Esclerose múltipla recorrente-remitente  
HLA - Antígenos leucocitários humanos  
IgG-AQP4 - Imunoglobulina do tipo G anti-aquaporina 4  
IgG-NMO - Imunoglobulina do tipo G na neuromielite óptica  
IgM - Imunoglobulina do tipo M  
IL - Interleucina  
IL-1 $\beta$  - Interleucina 1 beta  
INF- $\beta$  - Interferon beta  
MHC - Moléculas de histocompatibilidade principal  
MTA - Mielite transversa aguda  
NK - Assassinas naturais  
NMO - Neuromielite óptica  
NMO-RR - Neuromielite óptica recorrente-remitente  
NO - Neurite óptica  
OS-EM - Esclerose múltipla óptico-espinhal asiática  
RM - Ressonância magnética  
RNA - Ácido ribonucleico  
SNC - Sistema nervoso central  
TCD4 - Linfócitos T CD4  
TCD8 - Linfócitos T CD8  
TCR - Receptor de células T  
TGF- $\beta$  - Fator beta de crescimento transformado  
Th17 - Células T helper 17

TLR - Receptores do tipo toll

TNF- $\alpha$  - Fator alfa de necrose tumoral

Treg - Linfócitos T reguladores

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
1.1	CONSIDERAÇÕES GERAIS .....	14
1.2	CURSO E PROGNÓSTICO .....	14
1.3	DIAGNÓSTICO CLÍNICO E LABORATORIAL .....	17
1.4	FATORES DE RISCO .....	17
1.5	TRATAMENTO .....	18
1.6	PATOLOGIA E IMUNOPATOGENESE .....	19
1.7	O SISTEMA IMUNE .....	20
1.7.1	<b>Introdução ao Sistema Imune</b> .....	20
1.7.2	<b>Ativação e diferenciação dos linfócitos T efetores</b> .....	21
1.7.3	<b>Os linfócitos T reguladores</b> .....	24
2	<b>OBJETIVOS</b> .....	26
2.1	GERAL .....	26
2.2	ESPECÍFICOS .....	26
3	<b>METODOLOGIA</b> .....	27
3.1	SELEÇÃO DOS PACIENTES .....	27
3.2	CULTURAS DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO E ESTÍMULO .....	27
3.3	TESTE DE VIABILIDADE .....	28
3.4	ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR .....	28
3.5	DETERMINAÇÃO DE CITOCINAS .....	29
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	29
4	<b>RESULTADOS</b> .....	31
4.1	ANÁLISE DA RESPOSTA PROLIFERATIVA E VIABILIDADE CELULAR EM CULTURAS DE CMSP DE PACIENTES COM NMO-RR .....	31
4.2	ANÁLISE DO PERFIL DE CITOCINA EM CULTURAS DE CÉLULAS T ATIVADAS DE PACIENTES COM NMO-RR .....	32
4.3	CORRELAÇÃO ENTRE O PERFIL DE CITOCINA E O EDSS DOS PACIENTES COM NMO-RR .....	35
5	<b>DISCUSSÃO</b> .....	37
6	<b>CONCLUSÕES</b> .....	41
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	42
	<b>ANEXO A - Expanded Disability Status Scale (EDSS)</b> .....	51

<b>ANEXO B - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa CEP-UNIRIO .....</b>	<b>52</b>
<b>ANEXO C - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido .....</b>	<b>55</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A neuromielite óptica (NMO) é uma doença desmielinizante inflamatória do sistema nervoso central (SNC) que foi por muitas décadas considerada uma variante da esclerose múltipla (EM) (ARGYRIOU; MAKRIS, 2008). O reconhecimento da NMO como nova condição nosológica e não uma variante clínica da EM passou pela mudança de um paradigma na concepção do diagnóstico das doenças desmielinizantes. Contribuíram decisivamente para isto estudos de grupos ocidentais e asiáticos, a introdução da ressonância magnética (RM) nos critérios de diagnóstico e, mais recentemente, a identificação de um auto-anticorpo detectado na maioria dos pacientes com NMO, a IgG anti-aquaporina 4 (AQP4) (LUCCHINETTI *et al.*, 2002; LENNON *et al.*, 2004; 2005).

A doença afeta predominantemente o nervo óptico e a medula espinhal e caracteriza-se clinicamente por dois eventos índices, neurite óptica (NO) e mielite transversa aguda (MTA), ocorrendo simultaneamente ou separados no tempo por dias, meses ou anos, com curso monofásico (NMO-monofásica) ou recorrente (NMO-RR) (PITTOCK *et al.*, 2006; WINGERCHUK *et al.*, 2006).

Devido ao pouco tempo de reconhecimento como uma nova entidade nosológica, estudos sobre o comportamento do sistema imune desses indivíduos estão faltando, principalmente dentro do compartimento das células T.

### 1.2 CURSO E PROGNÓSTICO

Conhecida como Doença de Devic, a NMO foi originalmente descrita como uma doença do SNC caracterizada por mielite subaguda associada à amaurose bilateral de evolução grave, monofásica e curso fatal (MIYAZAWA; FUJIHARA; ITOYAMA, 2002). Recentes estudos imunopatológicos e de imagem, porém, tem sugerido que até 90% dos pacientes com NMO segue um curso de recaídas e remissão (NMO-RR) de mielite transversa e/ou neurite óptica e a maioria desses apresenta imagem de ressonância magnética (RM) com lesões atípicas para EM.



Estudos demonstraram que a NMO pode se apresentar de diferentes formas. A neurite óptica bilateral e mielite simultâneas ocorrem em quase um terço dos casos monofásicos e raramente nos indivíduos com a forma RR (Quadro 1). Quando a neurite óptica bilateral e a mielite ocorrem dentro de 1 mês, usualmente aponta geralmente para NMO-monofásica. Aproximadamente 20% dos pacientes com NMO-monofásica têm monoparesia ou paraparesias grave permanentes. Pacientes com a forma recorrente têm maior chance de recuperação motora após o início do evento de mielite transversa, com melhora gradual sendo observado em semanas. Tipicamente a NMO-RR tem curso pior do que a EM, sendo os eventos índices mais severos que em pacientes com EM-RR (WINGERCHUK *et al.*, 1999; 2007). Após 5 anos da doença, 50% dos pacientes com NMO-RR serão incapazes de andar sem ajuda e 32% morrem de falha respiratória secundária à lesão aguda da medula espinhal (LENNON *et al.*, 2005). Alguns fatores são preditivos de pior prognóstico nos pacientes com NMO, tais como a presença de outras doenças auto-imunes, elevada frequência de ataques nos primeiros 2 anos da doença e pobre recuperação motora seguindo cada evento índice (KIRA, 2011). O prognóstico é ainda pior em pacientes de ancestralidade africana. Finalmente, sintomas neurológicos indicando envolvimento fora dos nervos ópticos e medulares podem ocorrer em até 15% dos pacientes com NMO e esses tendem a se manifestar como encefalopatia, disfunção tronco-cerebral (vômitos, perda auditiva, fraqueza facial, neuragia trigemial, diplopia, ptose e nistagmo). Alguns podem também apresentar náuseas e anormalidades hipotalâmicas (POPPE *et al.*, 2005; PITTOCK *et al.*, 2006). A maioria dos pacientes com sintomas no tronco-cerebral e hipotálamo tem RM cerebral e IgG-AQP positivos. Disfunções endócrinas, conhecidas como síndrome de Vernant, tais como amenorréia secundária, galactorréia com hiperprolactemia, hipotireoidismo e diabetes insipidus também podem ser observadas.

<p>1- Doença de Devic: neurite óptica bilateral monofásica e mielite aguda, sendo a clínica estritamente confinada às lesões nessas áreas. Não há lesões cerebrais na RM fora dos nervos ópticos.</p>
<p>2- NMO-R: pacientes têm ataques repetidos de neurite óptica unilateral ou bilateral e mielite com lesões principalmente confinadas aos nervos ópticos e medula-espinhal. Afeta principalmente mulheres e tem o seu início numa idade mais avançada (início mais tardio) e tem maior frequência de desordens auto-imunes associadas a auto-anticorpos séricos e eventos índices menos severos, porém de pior prognóstico. Nesse grupo também se enquadram pacientes que apresentam sinais tronco-encefálicos menores tal como diplopia, náusea, disartria e disfagia.</p>
<p>3- NMO-R com lesões cerebrais assintomáticas não semelhantes às lesões clássicas da EM (principalmente hipotálamo e tronco cerebral). Usualmente são pacientes com sorologia positiva para IgG-NMO.</p>
<p>4- NMO-R com lesões cerebrais assintomáticas semelhantes à EM e são IgG-NMO positivos e compreendem 10% das NMO-R.</p>
<p>5- NMO-R com lesões cerebrais sintomáticas. Podem apresentar sintomas cerebrais tais como: distúrbios de consciência, agitação, labilidade emocional, em associação aos sintomas do tronco cerebral: desordem nos movimentos dos olhos, fraqueza facial, náuseas e disartria. O exame histopatológico dessas lesões revela mudanças típicas das descritas na medula de pacientes com NMO.</p>
<p>6- NMO-R com doenças auto-imunes: ocorre em até 1 terço das pacientes com NMO, e apresentam sintomas de outras doenças auto-imunes ou soropositividade para outras doenças auto-imunes.</p>
<p>7- Neurite óptica recorrente isolada ou mielite aguda recorrente isolada (síndrome de alto risco para NMO).</p>

Quadro 1: Espectro da Neuromielite óptica

### 1.3 DIAGNÓSTICO CLÍNICO E LABORATORIAL

A NMO definida de acordo com Wingerchuck e colaboradores (2006) é uma doença clinicamente diagnosticada em pacientes que apresentam ao menos dois eventos agudos, neurite aguda e mielite (considerados critérios absolutos) com o apoio de alguns achados laboratoriais tais como: 1) RM de crânio normal no início da doença, ou lesões que não preencham critério de EM; 2) Análise de imagem da medula espinhal revelando uma lesão que se estende por mais de 3 segmentos vertebrais; 3) pleocitose ( $> 50$  leucócitos/mm<sup>3</sup> ou  $\geq 5$  neutrófilos/mm<sup>3</sup>) e 4) sorologia positiva para IgG-NMO anti-AQP4.

Infelizmente, a positividade sorológica para IgG-AQP4 não é critério definitivo de NMO, desde que tanto casos de pacientes com EM clássica com positividade para IgG-AQP4 (5-10%) quanto pacientes com diagnóstico definitivo de NMO e IgG-AQP4 negativos tem sido descritos.

### 1.4 FATORES DE RISCO

Devido ao pouco tempo de reconhecimento como nova condição patológica, poucos trabalhos têm sido publicados sobre fatores de risco para a NMO. Com relação ao haplotipo do HLA, estudos têm demonstrado uma associação entre o alelo HLA-DP $\beta$ 1\*0501 com suscetibilidade à forma da NMO no Japão, conhecida como *optic-spinal MS asyan* (OS-EM) (FUKASAWA *et al.*, 2000). Em caucasianos, o HLA-DR $\beta$ 3 tem sido associado com elevado risco a NMO (BRUM *et al.*, 2009).

A correlação entre a incidência de NMO e doenças infecciosas também foi assunto de alguns estudos científicos e foi revisto por Kira (2011). Alguns autores têm demonstrado a ocorrência de doenças virais e bacterianas precedendo ou se manifestando em associação com NMO. Numa série de estudos da clínica Mayo, infecções virais prévias antecedente foram identificadas em 30% dos pacientes com NMO-monofásica e em 23% dos pacientes com a forma recorrente (WINGERCHUK *et al.*, 1999). Em outros estudos, o agente infeccioso foi identificado. O primeiro caso foi de um paciente brasileiro cuja NMO abriu após infecção com o vírus da caxumba (MARQUES,

1943). Mononucleose infecciosa aguda precedeu em 3 semanas a ocorrência de NMO num homem de 29 anos (WILLIAMSON, 1975), e casos de infecção pelo vírus varicella zoster têm sido descritos precedendo a ocorrência de NMO (DOUTLIK *et al.*, 1975; CHUSID *et al.*, 1979; AL-DEEB *et al.*, 1994; MERLE; SMADJA; CORDOBA, 1998). Finalmente, infecção com *Helicobacter pylori* parece ser mais frequente em indivíduos que desenvolvem NMO e que são positivos para IgG anti-AQP4 do que em pacientes com esclerose múltipla convencional (LI *et al.*, 2009).

Acredita-se que infecções pré-existentes podem em parte contribuir para o desenvolvimento de NMO via semelhança molecular entre a proteína AQP4 bacteriana com a isoforma humana. Outra razão, não excludente, para existir uma associação entre doenças infecciosas e o desenvolvimento da NMO pode estar atrelada aos efeitos pró-inflamatórios dos produtos microbianos capazes de favorecer maior permeabilidade da barreira hemato-encefálica, permitindo assim livre acesso das células do sistema imune ao parênquima do SNC.

## 1.5 TRATAMENTO

Como revisto por Okamoto e colaboradores (2008), apesar de não existir um tratamento ótimo para a NMO, pulsoterapia com metilpredinisona por 5 dias consecutivos é ainda a primeira linha de tratamento nas recidivas. Porém, frequentemente, terapia com corticóides não está associado com pronta melhora clínica, ou mesmo controle na progressão dos ataques de mielite. A plasmaferese é útil na recuperação dos ataques agudos, mas não previne as recaídas adicionais. Tratamento profilático utilizando terapia imunomoduladora padrão usada em EM, tal como interferon-beta (IFN- $\beta$ ) e acetato de glatiramer, tem eficácia limitada. Nesse caso as opções podem ser a azatioprina mais predinisona (oral) por 18 meses. Alguns artigos revelam algum benefício clínico com o uso de mitoxantrone e rituximab (anticorpo anti-CD20). Entretanto, pacientes com uma forma muito agressiva da NMO podem apresentar recaída mesmo na ausência de células B, indicando que outros mecanismos imunes devam participar na patogênese da NMO.

O melhor entendimento dos mecanismos moleculares e celulares envolvidos na imunopatogênese da NMO contribuirá no desenvolvimento de novas e mais efetivas terapias.

## 1.6 PATOLOGIA E IMUNOPATOGENESE

Estudos têm demonstrado que na mielite transversa, a doença neurológica é causada por um processo inflamatório que leva a necrose da substância cinzenta e branca da medula-espinhal com fibrose vascular. Lesões crônicas são caracterizadas por gliosi, degeneração císticas, cavitação e atrofia tanto da medula espinhal quanto dos nervos ópticos (LUCCHINETTI *et al.*, 2002; KIRA, 2011).

Estudos anátomo-patológicos realizados em pacientes com NMO post-mortem têm sugerido que no início há um infiltrado perivascular proeminente de polimorfonucleares, linfócitos B e poucos linfócitos T (LUCCHINETTI *et al.*, 2002; SAKUMA *et al.*, 2004; CORREALE; FIOL, 2004). Além dos infiltrados inflamatórios, as lesões apresentaram deposição marcante de anticorpos, principalmente IgM, e fragmentos das proteínas do sistema complemento, num padrão de roseta perivascular característico (SCOLDING, 2005; KIRA, 2011). Seguindo o foco perivascular há intensa desmielinização e necrose que coalescem dando origem a grandes lesões com dano axonal. A matéria cinzenta medular pode ser diretamente ou indiretamente afetada pela extensão das lesões na matéria branca adjacente. Essas áreas de necrose são comumente vistas na medula-espinhal e menos frequentemente observadas nos nervos ópticos.

Recentemente, células Th17, produtora de citocinas inflamatórias interleucina-17 (IL-17), IL-6 e IL-21, têm ganhado muita atenção nos estudos das bases celulares das doenças auto-imunes (GRAEBER; OLSEN, 2012). No contexto da NMO, no entanto, apenas dois estudos foram conduzidos na tentativa de delinear a participação dessas células na gênese das lesões medulares. Estudo publicado por Ishizu e colaboradores (2005) demonstrou não apenas níveis elevados de IL-17 no líquido de pacientes japoneses com OS-EM, como identificou uma correlação direta entre os níveis locais de IL8 e IL-17 com a extensão das lesões medulares durante os ataques, independente do status sorológico para IgG anti-AQP4.

A produção *in situ* de IL-8 deve garantir a infiltração local de neutrófilos, que têm sido relacionadas à gravidade das lesões. O nível de mieloperoxidases, enzimas secretadas por neutrófilos ativadas capazes de danificar diferentes células da glia, foi elevado no soro desses pacientes, especialmente durante as crises clínicas de mielite. Finalmente, dentre as citocinas dosadas nesse estudo, apenas a IL-8 mostrou correlação significativa com a pontuação do EDSS (ANEXO A), escala para medir o nível de incapacidade neurológica. Por outro lado, a extensão das lesões medulares na RM correlacionou-se significativamente não apenas com os níveis de IL-8 como também os de IL-17. Entretanto, estudo recente por Uzawa e colaboradores (2010) em amostras de líquido de pacientes com NMO na fase ativa da doença revelou níveis significativamente superiores de IL-6 e IL-8. Quando as mesmas citocinas foram avaliadas no soro desses pacientes, apenas os níveis de IL-6 foram significativamente elevados em pacientes com NMO.

Em resumo, os achados obtidos em ambos estudos com pacientes asiáticos com NMO sugerem o envolvimento de citocinas relacionadas a resposta Th17 na patogênese da OS-EM. Entretanto, nenhum estudo foi ainda conduzido em pacientes com NMO do ocidente, particularmente no Brasil.

## 1.7 O SISTEMA IMUNE

### 1.7.1 Introdução ao Sistema Imune

O sistema imune é formado por células cuja principal função é identificar micro-organismos invasores e eliminá-los ou confiná-los. De maneira geral, os componentes celulares do sistema imune são classificados em duas grandes categorias: as células da imunidade natural (fagócitos e degranuladores) e da imunidade específica (os linfócitos T e B). Enquanto a primeira frente de combate ao patógeno numa resposta imune primária é executada pelas células da imunidade natural, particularmente os fagócitos, um controle eficiente desses invasores depende da ação imune tardia executada pelos linfócitos T e B. A capacidade da resposta imune específica, e particularmente as respostas efetoras mediadas pelos linfócitos T, em eliminar com sucesso o invasor depende das habilidades funcionais

de alguns subtipos de células da imunidade natural, particularmente as células dendríticas (DCs - *dendritic cells*).

### 1.7.2 Ativação e diferenciação dos linfócitos T efetores

Os linfócitos T dividem-se segundo a expressão de duas moléculas de superfície. Dessa forma, existem os linfócitos TCD4<sup>+</sup> e os TCD8<sup>+</sup>. Os linfócitos TCD4<sup>+</sup> são as células mais importantes da resposta imune, uma vez que regulam a função de todas as outras células do sistema imune no combate às bactérias intra- e extracelulares, fungos, protozoários e helmintos. Ademais, as células T CD4<sup>+</sup> são igualmente importantes para que os linfócitos TCD8<sup>+</sup> atuem na resposta contra vírus.

As funções executadas pelos linfócitos T, embora sejam fundamentais, dependem de sinais cognitivos e solúveis liberados por células apresentadoras de antígenos (APC - *antigen presenting cells*), particularmente das células dendríticas (DCs, *dendritic cells*).

Como APCs, as DCs são capazes de fagocitar, processar e apresentar os antígenos peptídicos acoplados às moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC - *major histocompatibility complex*) aos linfócitos T.

Na dinâmica dos primeiros eventos envolvidos na ativação da resposta imune específica, as DCs imaturas são capazes de, inicialmente, internalizar e processar antígenos proteicos, mas possuem pouca capacidade de ativar células T naíves ou virgens. No entanto, a partir do reconhecimento com agonistas imunogênicos, particularmente com diferentes ligantes dos receptores do tipo toll (TLR - *Toll-like receptors*), essas DCs se tornam APCs eficientes (WATTS *et al.*, 2007).

*In vivo*, a partir da estimulação antigênica adequada, as DCs adquirem mobilidade e migram para os gânglios linfáticos regionais ou tecidos linfóides associados às mucosas, local no qual será iniciada a ativação dos linfócitos T. Durante a migração, as DCs amadurecem e passam a expressar diferentes moléculas de superfície necessárias não apenas para apresentação do antígeno como também para uma adequada ativação e diferenciação dos linfócitos T.

Durante a sinapse imune estabelecida entre a DC e os linfócitos T CD4<sup>+</sup>, o primeiro sinal é determinado pela apresentação de peptídeos antigênicos acoplados

às moléculas do MHC de classe II aos linfócitos T expressando os receptores de célula T (TCR - *T cell receptor*) antígeno-específicos (DUSTIN *et al.*, 2006). O segundo sinal se dá pela ligação de moléculas da família B7 (CD80/CD86), expresso na superfície das DCs ao CD28, proteína expressa constitutivamente na superfície dos linfócitos T. Esse sinal é independente do tipo de antígeno, mas em associação aos sinais bioquímicos induzidos através do TCR, a IL-2 é produzida, secretada e reconhecida através do IL-2 $\alpha\beta\gamma$ R pelos linfócitos TCD4<sup>+</sup> antígeno-específicos, garantindo assim a linfoproliferação (DUSTIN *et al.*, 2006; HENRICKSON; VON ADRIAN, 2007).

Seguindo a expansão clonal, um terceiro sinal ainda é necessário para uma completa ativação das células TCD4<sup>+</sup>. Esse terceiro sinal é principalmente mediado através da secreção de citocinas pelas DCs conduzindo os linfócitos T ativados à diferenciação em diferentes fenótipos capazes de secretar padrões diferentes de citocinas que regulam e coordenam vários ramos da resposta imune.

Nesse sentido, a secreção de IL-12 pelas DCs induz a diferenciação das células T CD4<sup>+</sup> em linfócitos T auxiliar 1 (Th1 - *T helper 1*) (FAZILLEAU *et al.*, 2007; HENRICKSON; VON ADRIAN, 2007). A diferenciação em Th1 depende da indução pela IL-12 do fator de transcrição T-bet (*T-box transcription factor*) (ZHU; YAMANE, H.; PAUL, 2010). Esse fenótipo é responsável pela secreção de grandes quantidades de IFN- $\gamma$  e IL-2 e realizam a chamada resposta imune celular, por ativar fagócitos, células assassinas naturais (células NK - *natural killer*) e os linfócitos T CD8<sup>+</sup>. O IFN- $\gamma$  não apenas aumenta o poder microbicida dos fagócitos (neutrófilos e macrófagos), a função lítica das células NK, como também induz linfócitos B humanos a produzir IgG1 e IgG3 (MCKINSTRY; STRUTT; SWAIN, 2010). A resposta imune celular é fundamental para o combate a microorganismos que causem infecções intracelulares (obrigatórios ou facultativos).

O controle de infecções virais é mediado pelos linfócitos TCD8<sup>+</sup>. Essas células reconhecem antígenos peptídicos apresentados via MHC de classe I pelas APCs, particularmente DCs. Uma vez ativados, esses linfócitos adquirem uma função citotóxica (CTL - *cytotoxic T lymphocytes*) sendo então capazes de conduzir as células infectadas à morte apoptótica através da secreção coordenada dos produtos estocados nos grânulos citoplasmáticos dos CTLs, particularmente granzimas e perforinas (COQUERELLE; MOSER, 2010). Como os CTLs também



secretam citocinas como o IFN- $\gamma$ , esses linfócitos são capazes de amplificar as respostas Th1, sendo assim também chamados de Tc-1 (Tc-1 - *T cytotoxic 1*) (OBAR; LEFRANÇOIS, 2010). Os linfócitos Th1 ativados pelas DCs maduras, por sua vez, também auxiliam as células T CD8<sup>+</sup> através da secreção de IL-2, permitindo assim uma ativação eficiente e manutenção de memória nos Tc-1 (HUSTER, BOISSONAS; BUSH, 2006).

Por outro lado, na presença de níveis elevados de IL-4, os linfócitos TCD4<sup>+</sup> se diferenciam em Th2, através da indução de um programa de diferenciação envolvendo o fator de transcrição GATA-3 (GATA-3 - *trans-acting T-cell-specific transcription factor*) (ZHU; YAMANE; PAUL, 2010). Esses linfócitos medeiam resposta imune humoral através da secreção de IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13 permitindo assim a ativação dos linfócitos B produtores de IgE (ZHU; YAMANE; PAUL, 2010). A resposta dos linfócitos Th2 está envolvida no combate às infestações por helmintos e na patogênese das reações de hipersensibilidade do tipo I (MAKANI; JEN; FINN, 2008; ZHU; YAMANE; PAUL, 2010).

Mais recentemente, a secreção de duas citocinas, a IL-1 $\beta$  e a IL-23, pelas DCs maduras têm sido implicadas na indução de Th17 em humanos, através da indução do fator de transcrição ROR- $\gamma$ t (ROR- $\gamma$ t - *retinoic acid-related orphan receptor  $\gamma$ t*) (GUTCHER; BECHER, 2007). As células Th17 produzem não apenas IL-17 como também IL-21, TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ , que dentre muitas funções destaca-se a capacidade de induzir as células imunes e parenquimatosas a secretar IL-8, principal quimiocina envolvida no recrutamento de neutrófilos para a área de infecção (MIOSSEC, 2009). Ademais, as células Th17 também induzem os linfócitos B a secretarem diferentes isotipos de IgG (ANNUNZIATO *et al.*, 2007). A resposta imune mediada por células Th17 vem sendo associada ao combate às bactérias extracelulares e fungos (MATSUZAKI; UMEMURA, 2007). No entanto, as células Th17 têm sido ligadas ao surgimento de doenças imunomediadas (GRAEBER; OLSEN, 2012), como as doenças auto-imunes que podem ser facilitadas pelo possível déficit funcional ou quantitativo das células T reguladoras.

### 1.7.3 Os linfócitos T reguladores

Como todo sistema, a resposta imune necessita ser rotineiramente regulada, caso contrário, sua atuação, mesmo que seja contra invasores indesejáveis, eleva o risco do desenvolvimento de doenças imunomediadas (COSTANTINO; BAECHER-ALLAN; HAFLEER, 2008). Nesse sentido, sabe-se, por exemplo, que respostas Th1 e, principalmente Th17, exacerbadas estão envolvidas na gênese de doenças autoimunes (GRAEBER; OLSEN, 2012), enquanto as citocinas secretadas pelas células Th2 são protagonistas nas reações alérgicas mediadas pela IgE (MCKINSTRY; STRUTT, T.M.; SWAIN, 2010). Assim, muitos trabalhos têm demonstrado que o controle das respostas imunes é fundamental e é particularmente executado pelos linfócitos T reguladores (VIGNALI; COLLISON; WORKMAN, 2008).

Com base na expressão de determinados marcadores, os linfócitos T reguladores constituem uma população diversa, com algumas características em comum, como a hiporresponsividade a estímulos antigênicos e funções imunossupressoras (SAITO *et al.*, 2007). Dentre eles se destacam dois principais subtipos: os linfócitos reguladores do tipo 1 (Tr-1) e, os mais recentemente descobertos, os linfócitos TCD4<sup>+</sup> naturais (nTreg) (ALUVIHARE; KALLIKOURDIS; BETZ, 2004; SAITO *et al.*, 2007).

As nTreg são primariamente originadas no timo e expressam grandes quantidades da cadeia  $\alpha$  do receptor para IL-2 (CD25) na superfície e, no citosol, o fator transcricional FoxP3 (FoxP3 - *forkhead winged helix*) (SHEVACH *et al.*, 2006). Em humanos, essas células ainda expressam os marcadores de membrana CD45RO, CD62L, GITR (GITR - *glucocorticoid induced TNF receptor*) (SHEVACH *et al.*, 2006) associada a não-expressão do receptor para IL-7 (CD127) (LIU *et al.*, 2006). Quando ativadas pelas DCs, as nTregs suprimem a proliferação e a função dos linfócitos TCD4<sup>+</sup> ou TCD8<sup>+</sup> efetores por diferentes mecanismos, como por exemplo através da secreção das citocinas anti-inflamatórias IL-10 e TGF- $\beta$  (TGF- $\beta$  - *transforming growth factor- $\beta$* ) (DIECKMANN *et al.*, 2001; LEVINGS; SANGREGORIO; RONCAROLO, 2001; PICCIRILLO; SHEVACH, 2001; STEPHENS *et al.*, 2001; GROHMANN *et al.*, 2002; WING *et al.*, 2002; FALLARINO *et al.*, 2003; NAKAMURA *et al.*, 2004; LEE *et al.*, 2009).

Apesar de ter uma origem central, muitos artigos têm demonstrado que células do tipo nTreg-símiles podem ser induzidas a partir de linfócitos TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>

virgens quando ativados pela DCs na presença de TGF- $\beta$  (FANTINI *et al.*, 2004; POLANCZYK *et al.*, 2006; TAI *et al.*, 2008). Recentemente, alguns trabalhos sugeriram as Tregs induzidas (iTregs) podem representar a clássica população de linfócitos Th3 (XU; KITANI; STROBER, 2010).

Os linfócitos Tr-1 constituem outra subpopulação que tem sido implicada na regulação da resposta imune (ALUVIHARE; KALLIKOURDIS; BETZ, 2004). A diferenciação dessa subpopulação depende da secreção de IL-10 pelas DCs tolerogênicas que expressam a enzima indoleamina-2,3-dioxigenase (IDO) (MAHNKE; ENK, 2005; PENNA; GIARRATANA; AMUCHASTEGUI, 2005). Até o presente momento, não existem marcadores de superfície ou intracelulares identificados em linfócitos T que se diferenciaram em Tr-1, exceto sua capacidade de secretar TGF- $\beta$  e principalmente IL-10 quando ativados via TCR (RONCAROLO *et al.*, 2001; LEVINGS; SANGREGORIO; SARTIRANA, 2002). Apesar da maioria desses linfócitos serem TCD4<sup>+</sup>, linfócitos TCD8<sup>+</sup> Tr-1-símiles já foram descritos (STEINBRINK *et al.*, 1999).

No contexto da imunoregulação, as citocinas IL-10 e TGF- $\beta$  inibem tanto a expressão de moléculas co-estimuladoras e a secreção de citocinas inflamatórias pelas DCs imunogênicas, quanto agem diretamente sobre os linfócitos T efetores, suprimindo a proliferação e suas funções efetoras (GROUX *et al.*, 1997; STROBL; KNAPP, 1999).

Diante dos conhecimentos atuais da heterogeneidade na diferenciação dos linfócitos T, faltam trabalhos centrados na investigação dessas diferentes subpopulações nos pacientes com NMO, o que pode nos fornecer pistas valiosas quanto aos distúrbios imunes implicados na doença. Conseqüentemente, um melhor conhecimento das bases moleculares da NMO pode ajudar no desenvolvimento de novas e mais eficazes imunoterapias.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

Avaliar *in vitro* o comportamento funcional das células T de pacientes com NMO-RR na remissão clínica.

### 2.2 ESPECÍFICOS

1 - Analisar o nível de proliferação das células T seguindo estimulação policlonal em culturas de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de pacientes com NMO-RR e comparar com indivíduos saudáveis (grupo controle);

2 - Avaliar a viabilidade das células T policlionalmente ativadas nas culturas de CMSP de pacientes com NMO-RR e indivíduos saudáveis;

3 - Caracterizar o perfil de citocina nos sobrenadantes das culturas de CMSP contendo linfócitos T policlionalmente ativados obtidos de pacientes com NMO-RR e indivíduos saudáveis; e

4 - Correlacionar os níveis de citocinas produzidos *in vitro* com o grau de déficit neurológico nos pacientes com NMO-RR.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 SELEÇÃO DOS PACIENTES

Para o nosso estudo 20 pacientes (2 homens e 18 mulheres; idade média  $40,7 \pm 15.1$  anos) com diagnóstico de neuromielite óptica recorrente-remitente (NMO-RR) foram recrutados a partir do serviço de Neurologia do Hospital da Lagoa (RJ), coordenado pela investigadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Regina Maria Papais Alvarenga, Médica neurologista e professora Associada de Neurologia da UNIRIO. O grau de incapacidade neurológica foi avaliado a partir da avaliação da pontuação do EDSS pela Dr<sup>a</sup> Regina Alvarenga no momento em que o estudo foi realizado. Todos os pacientes estavam em remissão clínica e nenhum recebia qualquer tratamento com drogas imunomoduladoras, tal como IFN- $\beta$ , por ao menos 1 mês. Com relação a sorologia para anticorpos anti-aquaporina-4 (AQP4), 18/20 pacientes fizeram o teste e apenas 8/18 foram positivos para IgG anti-AQP4 (dados obtidos do prontuário médico). As características dos indivíduos estudados estão apresentados na Tabela 1. Como controle, amostras de sangue periférico foram colhidos de 20 indivíduos saudáveis pareados quanto à idade, sexo, cor e índice de massa corpórea.

Independente do grupo (paciente ou controle), nós excluimos indivíduos tabagistas crônicos, com alto consumo de álcool ou com obesidade mórbida, condições conhecidas em alterar o status funcional do sistema imune.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa da UNIRIO (ANEXO B) e as amostras do sangue periférico de cada participante só foram colhidas após cada indivíduo ter dado o seu acordo por escrito, através da assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (ANEXO A).

#### 3.2 CULTURAS DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO E ESTÍMULO

Para o nosso estudo 20mL de sangue periférico foram colhidos utilizando agulhas e seringas estéreis contendo heparina. O plasma e as células mononucleares de sangue periférico (CMSP) foram obtidas através de centrifugação do sangue total sobre um gradiente de densidade Fycoll-Hypaque. As CMSP foram

colhidas, lavadas três vezes com solução de HANK e então resuspensas em 1mL de RPMI-1640. O número de células viáveis foi calculado através do método de exclusão do azul de Trypan usando uma câmara de Neubauer.

Para os experimentos funcionais,  $1 \times 10^6$  CMSP/mL viáveis foram cultivadas em placas de 96 poços de fundo chato em 0,2mL de meio RPMI 1640 completo ou numa placa de 24 poços em 1mL de meio RPMI 1640 completo. O meio RPMI 1640 é considerado completo após a adição de 2mM de L-glutamina (GIBCO, Carlsbad, CA, USA), 10% de soro fetal bovino, 20U/ml de penicilina, 20 µg/ml de estreptomicina e 20mM de tampão HEPES. A fim de induzir a ativação policlonal das células T, todas as culturas de CMSP ( $1 \times 10^6$ /mL) foram mantidas por 3 dias com fitohemaglutinina (PHA, 1µg/mL), tempo correspondente ao pico de resposta das células T à PHA. Todas as culturas de células foram incubadas em uma estufa úmida a 37°C em atmosfera a 5% de CO<sub>2</sub>.

### 3.3 TESTE DE VIABILIDADE

Com objetivo de determinar a viabilidade celular, culturas de CMSP ( $1 \times 10^6$ /mL) foram mantidas em placas de 24 poços na presença ou ausência de PHA (1µg/mL) por 3 dias. Após 24, 48 e 72 horas de cultura, a porcentagem de células vivas/mortas foi avaliada através do teste de exclusão do azul de trypan. Para tanto, no final de cada tempo de cultura (24,48 e 72 horas), alíquotas de 50 µL da suspensão celular foram colocadas em tubos contendo 50 µL do corante azul de trypan (0,4%). As células viáveis (não coradas) e mortas (azuis) foram então contadas em microscópio óptico após 3 a 5 minutos utilizando a câmara de Neubauer. Para verificar a porcentagem (%) de células viáveis a seguinte equação foi aplicada: células viáveis (%) = (número total de células viáveis por mL/ número total de células por mL) x 100.

### 3.4 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

Culturas de CMSP ( $1 \times 10^6$ /mL) foram mantidas por 3 dias na presença de PHA (1µg/mL) e o nível de proliferação das células T foi determinado através da

incorporação do nucleotídeo timidina tritiada ( $[^3\text{H}]$  TdR, 1  $\mu\text{Ci/poço}$ ) adicionado às culturas 8 horas antes do término da incubação (3 dias). As células foram recolhidas utilizando um coletor automático e a incorporação da timidina no DNA foi aferida utilizando líquido de cintilação. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  desvio-padrão da contagem por minute (cpm).

### 3.5 DETERMINAÇÃO DE CITOCINAS

A fim de se dosar o conteúdo de citocinas *in vitro*, sobrenadantes das culturas de CMSP, ativadas ou não com PHA, foram submetidos à técnica ELISA usando kits BD OptEIA seguindo as instruções do protocolo fornecido pelo fabricante (BD, Pharmigen, San Diego). Brevemente, 50 $\mu\text{L}$  dos sobrenadantes (diluídos 1:10) foram adicionados a cada poço contendo anticorpo primário anti-citocina. Após 2 horas de incubação, 100 $\mu\text{L}$  do anticorpo secundário (previamente tratado com a enzima conjugada estreptavidina-horseradish peroxidase) foram adicionados em cada poço e adicionalmente incubados por 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, 100 $\mu\text{L}$  de substrato TMB (3, 3',5,5'-tetrametilbenzidina) foram adicionados aos poços e a reação foi revelada 30 minutos após através da adição de uma solução de parada (ácido fosfórico a 1M). As placas foram lidas a 450nm em leitor de ELISA (Dynex Technologies, USA). Para o nosso estudo, nós dosamos as seguintes citocinas: IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, TGF- $\beta$ , IL-4, IL-21, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-17. Citocinas humanas recombinantes variando de 10-500  $\mu\text{g/mL}$  foram usadas para construir curvas-padrão.

### 3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as análises estatísticas dos ensaios de proliferação e dosagem de citocinas foram conduzidas usando o programa de gráfico GraphPad Prism versão 5.0 para Windows (GraphPad). O teste não-paramétrico U de Mann-Whitney foi utilizado para determinar se os dois grupos (saudáveis x pacientes) eram estatisticamente diferentes para cada variável analisada. A correlação de Spearman foi aplicada para aferir o grau de correlação entre a produção de citocinas em cultura

com a pontuação do EDSS de cada paciente com NMO-RR. A significância em todos os experimentos foi definida como  $p < 0.05$ .



## 4 RESULTADOS

### 4.1 ANÁLISE DA RESPOSTA PROLIFERATIVA E VIABILIDADE CELULAR EM CULTURAS DE CMSP DE PACIENTES COM NMO-RR

A NMO tem sido considerada uma doença de fundo auto-imune cujo envolvimento das células T tem sido pouco explorado. Portanto, nosso primeiro objetivo foi avaliar o comportamento proliferativo das células T desses pacientes em resposta à PHA, um potente ativador policlonal das células T humanas. Como demonstrado na Figura 1A, quando comparado ao grupo controle, o nível de captura de timidina pelas células T ativadas foi significativamente inferior nas culturas obtidas dos pacientes com NMO-RR. A menor expansão policlonal das células T nas culturas dos pacientes com NMO deve estar relacionada à maior morte celular, como observado na Figura 1B.

Tabela 1: Características dos indivíduos

	Controle <sup>1</sup> (n= 20)	NMO <sup>2</sup> (n= 20)
Média de Idade em anos (dp)	38,7 (14,9)	40,2 (15,1)
homens (%)	50	20
EDSS <sup>3</sup> [média (variação)]	NA <sup>4</sup>	5,96 (3-9)
IgG anti-AQP4 positivo (%) <sup>5</sup>	NA	44,4

<sup>1</sup>Indivíduos saudáveis e <sup>2</sup>pacientes com NMO recorrente-remittente na remissão clínica.

<sup>3</sup>Expanded Disability Status Scale.

<sup>4</sup>Não analisado.

<sup>5</sup>Positividade para IgG sérica anti-aquaporin-4 (AQP4). Obtido do prontuário médico.

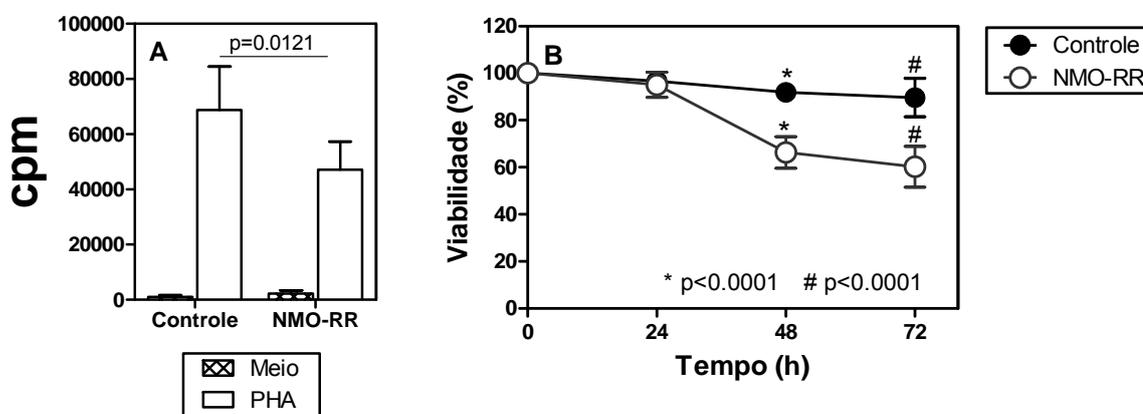


Figura 1: Resposta proliferativa e viabilidade celular em culturas de CMSP derivadas de pacientes com NMO-RR. CMSP ( $1 \times 10^6/\text{mL}$ ) purificadas de pacientes com NMO-RR (n=20)

e de indivíduos saudáveis (controle, n=20) foram mantidas em cultura na ausência (meio) ou na presença do ativador policlonal de células T, a fitohemaglutinina (PHA, 1 µg/ml), por 3 dias. Em (A) temos a proliferação determinada pela captura de timidina radioativa (cpm) e em (B) a porcentagem de viabilidade celular aferida pela contagem de células vivas/mortas em azul de trypan 24, 48 e 72 horas após início da cultura. Os dados apresentados nas figuras destacam a média ± desvio-padrão assim como os valores de *p*.

#### 4.2 ANÁLISE DO PERFIL DE CITOCINA EM CULTURAS DE CÉLULAS T ATIVADAS DE PACIENTES COM NMO-RR

Como descrito na introdução, o tipo de resposta imune específica é principalmente determinado pela rede de citocina produzida pelas células T. Portanto, nosso próximo objetivo foi avaliar o perfil de citocina produzido pelas células T policlionalmente ativadas de pacientes com NMO-RR. É importante ressaltar que não houve produção espontânea de citocinas nos poços sem adição do ativador policlonal de células T (só com meio de cultura). Quando comparado ao grupo controle, níveis significativamente inferiores de citocinas relacionadas ao fenótipo Th1 (IL-2 e IFN- $\gamma$ ) foram detectados nas culturas de células T ativadas de pacientes com NMO-RR (Figura 2). Com relação às citocinas relacionadas ao fenótipo Th2 (IL-4 e IL-5), nenhuma diferença foi observada entre os grupos estudados (controle x NMO-RR) (Figura 3). Por outro lado, níveis significativamente superiores de citocinas relacionada (IL-6) ou definidora do fenótipo Th17 (IL-21) foram detectados nos sobrenadantes das culturas contendo células T ativadas de pacientes com NMO-RR, quando comparado ao grupo controle (Figura 4).

Finalmente, muitos estudos têm indicado que doenças auto-imunes estão associadas a distúrbios funcionais no compartimento das células T reguladoras produtoras de citocinas anti-inflamatórias (KITANI *et al.*, 2003; MCGEACHY; STEPHENS; ANDERTON, 2005; BELKAID, 2007; MAYNARD *et al.*, 2007; LI; FLAVELL, 2008; VIGNALI; COLLISON; WORKMAN, 2008; SHEVACH, 2009). Diante do exposto, nosso próximo objetivo foi quantificar os níveis de citocinas anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- $\beta$ ) nos sobrenadantes das culturas dos grupos controle e de pacientes com NMO-RR. Como demonstrado na Figura 5, no entanto, nenhuma diferença foi observada entre os grupos (controle x NMO-RR) com relação à produção dessas citocinas nas culturas contendo células T ativadas.

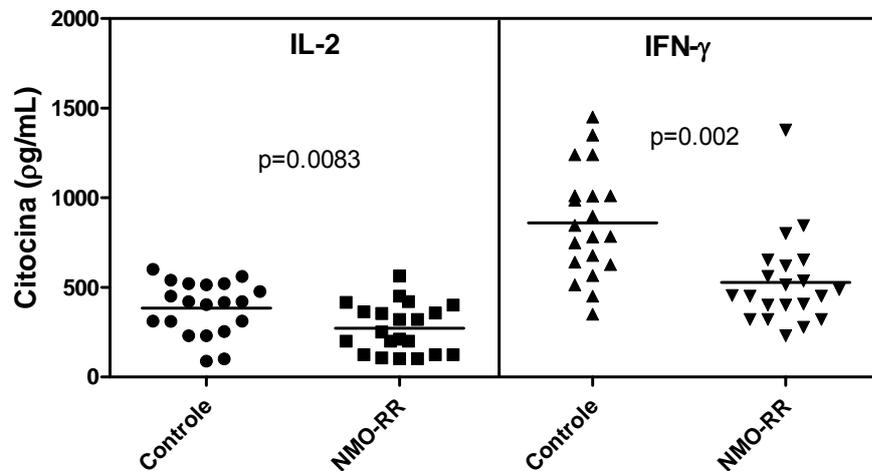


Figure 2: Produção de citocinas relacionadas ao fenótipo Th1 em culturas de CMSP de pacientes com NMO-RR. O ativador policlonal de células T (PHA, 1  $\mu$ g/ml) foi adicionado às culturas de CMSP ( $1 \times 10^6$ /mL) obtidas de pacientes com NMO-RR (n=20) e de indivíduos saudáveis (controle, n=20) e produção de IL-2 e IFN- $\gamma$  foi aferida no final do 3<sup>o</sup> dia através da técnica ELISA, como descrito na metodologia. O gráfico destaca os valores médios de cada citocina em cada grupo estudado e os valores de  $p$  estão indicados na figura.

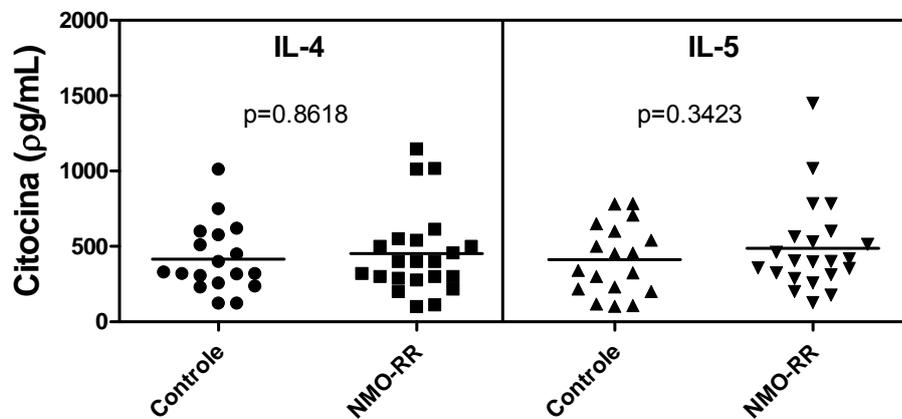


Figure 3: Produção de citocinas relacionadas ao fenótipo Th2 em culturas de CMSP de pacientes com NMO-RR. Culturas de CMSP ( $1 \times 10^6$ /mL) obtidas de pacientes com NMO-RR (n=20) e de indivíduos saudáveis (controle, n=20) foram ativadas por 3 dias na presença de PHA (1  $\mu$ g/ml) e a produção de IL-4 e IL-5 foi avaliada pela técnica ELISA, como descrito na metodologia. O gráfico destaca os valores médios de cada citocina em cada grupo estudado e os valores de  $p$  estão indicados na figura.

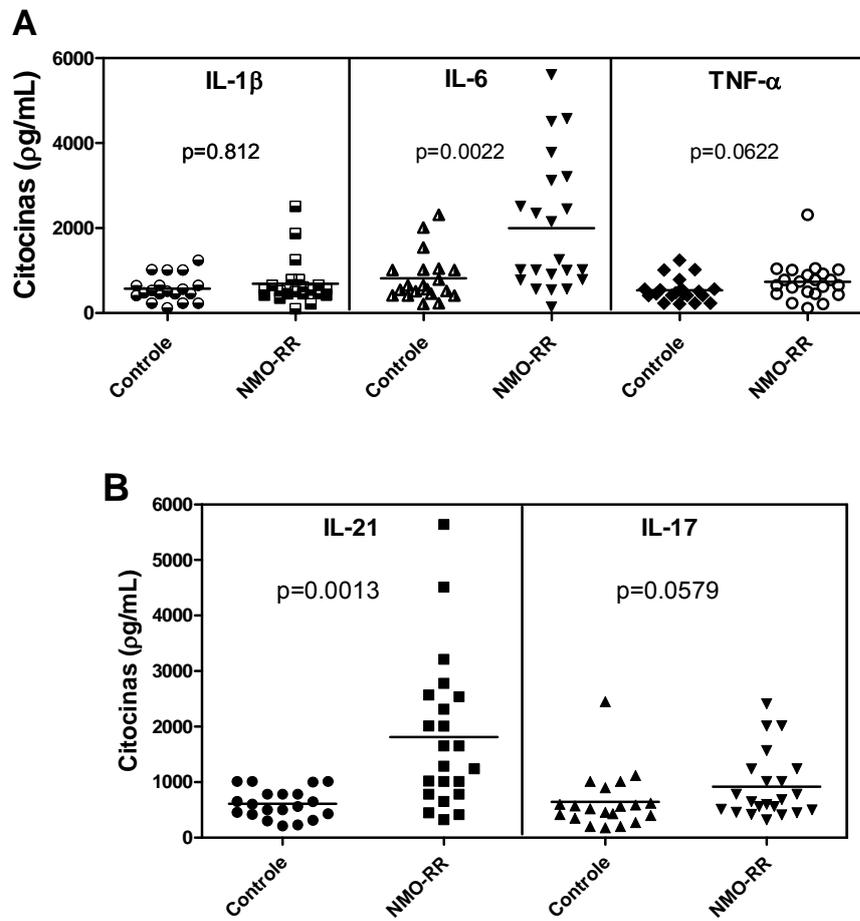


Figure 4: Produção de citocinas relacionadas ao fenótipo Th17 em culturas de CMSP de pacientes com NMO-RR. O ativador policlonal de células T (PHA, 1  $\mu$ g/ml) foi adicionado às culturas de CMSP ( $1 \times 10^6$ /mL) obtidas de pacientes com NMO-RR (n=20) e de indivíduos saudáveis (controle, n=20) e produção de citocinas relacionadas (A) e específicas (B) do fenótipo Th17 foram dosadas nos sobrenadantes pela técnica ELISA, como descrito na metodologia. O gráfico destaca os valores médios de cada citocina em cada grupo estudado e os valores de  $p$  estão indicados na figura.

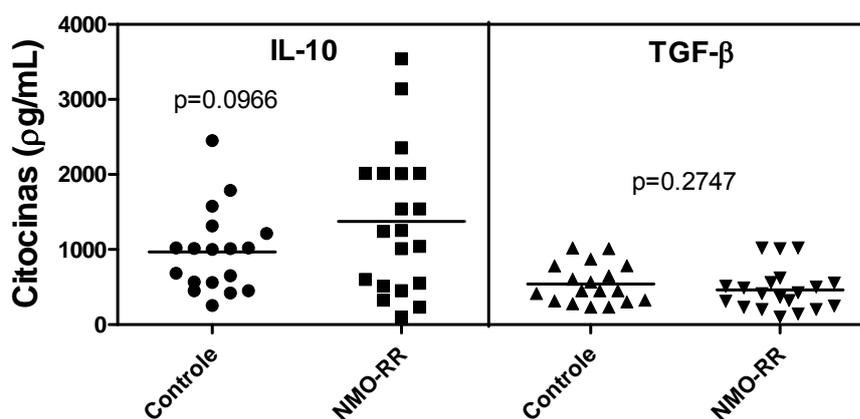


Figure 5: Produção de citocinas relacionadas às células T reguladoras em culturas de CMSP de pacientes com NMO-RR. Culturas de CMSP ( $1 \times 10^6/\text{mL}$ ) obtidas de pacientes com NMO-RR ( $n=20$ ) e de indivíduos saudáveis (controle,  $n=20$ ) foram ativadas por 3 dias na presença de PHA ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) e a produção de IL-10 e TGF- $\beta$  foi avaliada pela técnica ELISA, como descrito na metodologia. O gráfico destaca os valores médios de cada citocina em cada grupo estudado e os valores de  $p$  estão indicados na figura.

#### 4.3 CORRELAÇÃO ENTRE O PERFIL DE CITOCINA E O EDSS DOS PACIENTES COM NMO-RR

Como a NMO é uma doença inflamatória do sistema nervoso central, nosso último objetivo foi relacionar os níveis de citocinas inflamatórias com déficits neurológicos, indicado pelo EDSS. Das citocinas inflamatórias dosadas nos sobrenadantes das culturas contendo células T ativadas de pacientes com NMO-RR, apenas a IL-6 e IL-21 correlacionaram positivamente com a pontuação do EDSS (Figura 6). Ademais, apesar de não termos observado nenhuma diferença na presença de IgG anti-AQP4 com o EDSS do paciente, nós observamos uma tendência dos pacientes com sorologia positiva para IgG0AQP4 em produzir níveis superiores de IL-21 ( $p= 0.097$ ) e IL-6 ( $p = 0.086$ ).

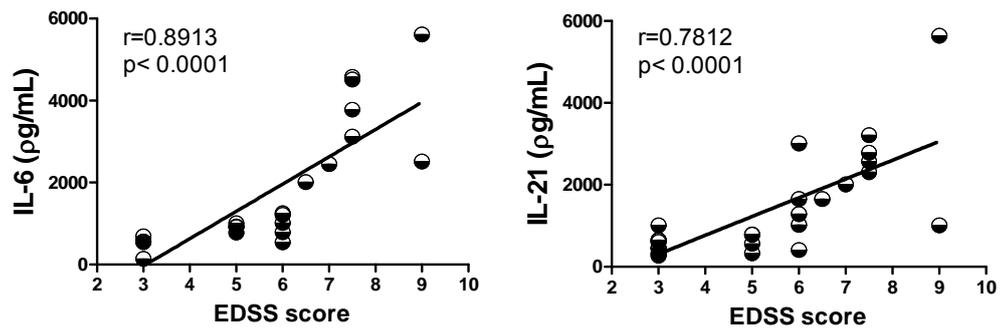


Figura 6: Correlação entre a produção de IL-6 e IL-21 com o EDSS nos pacientes com NMO-RR. A figura destaca a correlação entre a produção *in vitro* de IL-6 e IL-21, liberadas pelas células T ativadas pelo PHA (1 $\mu$ g/mL), e a pontuação do EDSS de cada paciente com NMO-RR.

## 5 DISCUSSÃO

A neuromielite óptica (NMO) é uma desordem inflamatória imuno-mediada do sistema nervoso central (SNC) caracterizada, na maioria dos pacientes, por episódios de mielite transversa e/ou neurite óptica (DEVIC, 1894; WINGERCHUK *et al.*, 2007). Apesar da identificação em 2004 de IgG específicos para diferentes antígenos do SNC (LENNON *et al.*, 2004; PITTOCK *et al.*, 2006), os mecanismos moleculares e celulares da NMO permanecem a serem elucidados. Desde que células T são necessárias para resposta imune humoral mediada pelos linfócitos B (LENNON *et al.*, 2005), estudos sobre o comportamento dessas células nos pacientes com NMO estão faltando, e resultados obtidos pelo nosso estudo, apesar de preliminares, demonstrou domínio do fenótipo Th17 mesmo em pacientes com NMO-RR na remissão clínica. Ademais, a produção *in vitro* de citocinas relacionadas a esse fenótipo foi diretamente relacionada a déficits neurológicos.

Em nosso estudo, a extensão da proliferação das células T em resposta ao PHA, ativador policlonal dos linfócitos T, foi significativamente inferior em culturas de células de pacientes com NMO-RR, quando comparado ao grupo controle, isto é, indivíduos saudáveis. A menor proliferação das células T observada nos pacientes com NMO deve estar relacionada, ao menos em parte, a menor produção de IL-2 em cultura. A IL-2 é uma citocina fundamental na indução de expansão clonal nas células T humanas (MILLS *et al.*, 1993). Estudos também têm demonstrado que menor resposta proliferativa das células T a mitógenos em pacientes com esclerose múltipla (EM) foi relacionada à menor produção de IL-2 (MERRIL *et al.*, 1984; KILLESTEIN *et al.*, 2002). Em nosso estudo, outra razão, não excludente, para menor linfoproliferação em culturas dos pacientes com NMO-RR deve estar relacionada à maior morte celular seguindo ativação com PHA.

Com relação à determinação do fenótipo dominante em culturas de células T policlionalmente ativadas, nós não observamos nenhuma diferença na produção de citocinas relacionadas ao fenótipo Th2, a IL-4 e IL-5, entre os grupos estudados, isto é, indivíduos com NMO-RR e saudáveis. Por outro lado, a produção de IFN- $\gamma$ , citocina relacionada ao fenótipo Th1, foi significativamente inferior nas culturas de pacientes com NMO-RR. Uma possibilidade para menor produção de citocinas relacionadas ao fenótipo Th1 pode estar relacionada à maior tendência desse

fenótipo de sofrer morte celular induzida por ativação através da ativação de caspases via Fas (CD95) (AKKOC *et al.*, 2008).

Em nosso sistema, quando comparado ao grupo controle, níveis superiores de IL-6 e IL-21, associada a uma tendência a liberar mais IL-17, foi observada nas culturas de pacientes com NMO, mesmo na fase de remissão clínica.

A diferenciação e sobrevivência das células Th17 humanas dependem da IL-1 $\beta$  e IL-23 (COSTA; MATTANA; DA SILVA, 2010; MORRISON; BALLANTYNE, 2011). Recente estudo por Wang e colaboradores (2011) demonstraram elevada frequência de células produtoras de IL-17, tanto CD4<sup>+</sup> quanto CD8<sup>+</sup>, associada à elevada produção sistêmica de IL-23 no sangue periférico de pacientes com EM e NMO-RR durante as recaídas. Estudo recente publicado pelo nosso grupo demonstrou que a produção de IL-23 foi superior nas culturas de monócitos de pacientes com NMO-RR ativadas com lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), quando comparado ao grupo controle (LINHARES *et al.*, 2012). Esses resultados sugerem que células apresentadoras de antígenos, tal como monócitos, ativados por produtos microbianos podem executar um papel facilitador na diferenciação dos linfócitos T em Th17 em pacientes com NMO-RR. Apesar de nós não termos observado uma diferença significativa na produção de IL-17, existe a possibilidade de que, durante as crises clínicas, níveis dessa citocina sejam superiores aos observados durante as fases de remissão clínica.

Alguns estudos têm demonstrado que durante as recaídas, citocinas relacionadas ao fenótipo Th17 possam executar um papel importante na patogênese das lesões medulares de pacientes com NMO-RR (MIHARA *et al.*, 2012). A presença do eixo IL-17/IL-8 tem sido documentada no líquido dos pacientes com NMO-RR durante as recidivas (ISHIZU *et al.*, 2005), o que deve aumentar o recrutamento de neutrófilos detectado em quase 60% dos espécimes autopsiadas da medula espinhal nos casos óbito por NMO (KIRA, 2011). O recrutamento de neutrófilos garante a liberação e ação lítica das mieloperoxidases e elastase, duas enzimas produzidas pelos neutrófilos que são capazes de danificar a barreira hemato-encefálica e a formação de extensiva lesão na medula espinhal (KIRA, 2011). Durante as recidivas, enquanto alguns autores têm demonstrado uma relação positiva entre os níveis líquidos de IL-8 com a extensão das lesões medulares na ressonância magnética (ISHIZU *et al.*, 2005), outro estudo mais recente demonstrou uma estreita correlação entre os níveis de IL-6 com a extensão



da mielite (UZAWA *et al.*, 2010). Esses dois estudos, porém, não dosaram os níveis de IL-21 nem no sangue nem no líquor. Recentemente, Wang e colaboradores (2011) demonstraram elevados níveis séricos de IL-21 durante as crises clínicas em pacientes com NMO asiáticos, mas não em pacientes com EM. Em nosso laboratório, estudos conduzidos por outros alunos também têm falhado em detectar níveis elevados de IL-21 nas culturas contendo células T ativadas de pacientes com EM na fase de remissão clínica (manuscrito em preparação). No entanto, faltam dados sobre a rede de citocina em nossas pacientes durante a recidiva.

Apesar da infiltração de neutrófilos ser encontrada na maioria das lesões da medula espinhal de pacientes que vieram a óbito por NMO-RR, intensa deposição de imunoglobulinas e fixação do complemento têm sido descritos em todos os casos da doença (MATIELLO *et al.*, 2007; MIHARA *et al.*, 2012), e, como observado em nosso estudo, aumento relativo de IL-6 e IL-21 pelas células T ativadas *in vitro* de pacientes com NMO-RR deve contribuir para o envolvimento da imunidade humoral durante a fase ativa da doença. Nesse contexto, tanto a IL-21 quanto a IL-6 têm sido descritas como citocinas estimuladoras de células B (SPOLSKI *et al.*, 2009). Mais recentemente, estudo demonstrou que a IL-21 é também produzida por um subtipo de células T CD4<sup>+</sup> conhecido como células T auxiliadoras foliculares, ou Thf. As células Thf são capazes de auxiliar as respostas imunes humorais por induzir a formação de centro germinativo nos folículos dos órgãos linfoides e, conseqüentemente, promover a proliferação das células B, troca de cadeia pesada e hipermutação somática das imunoglobulinas (SPOLSKI; LEONARD, 2009). Esses dados sugerem, portanto, um provável envolvimento do eixo IL-6/IL-21, em adição a dupla IL-17/IL-8, na patogênese da NMO-RR.

Entretanto, nos pacientes estudados aqui, a minoria foi IgG-AQP4 positivos (35,3%), e apenas um leve tendência foi observada entre os níveis de IL-21 e IL-6 e a soropositividade para IgG anti-AQP4. A falta de correlação entre soropositividade para IgG-AQP4 e as citocinas IL-6 e IL-21 pode ser explicada pelo baixo número de pacientes estudados. Entretanto, até o momento não existe uma posição consensual entre a presença de IgG anti-AQP4 e gravidade e curso da doença (KIRA, 2011).

Vários estudos em modelos experimentais e em humanos têm demonstrado que deficiências nos mecanismos de regulação imune são fatores de risco centrais para o desenvolvimento de desordens auto-imunes (KITANI *et al.*, 2003; MCGEACHY; STEPHENS; ANDERTON, 2005; BELKAID, 2007; MAYNARD *et al.*,

2007; LI; FLAVELL, 2008; VIGNALI; COLLISON; WORKMAN, 2008; SHEVACH, 2009; BUCKNER, 2010). Muitos dos mecanismos moleculares envolvidos no controle da resposta imune inflamatória são mediados pela produção de citocinas anti-inflamatórias, tais como IL-10 e TGF- $\beta$ , pelos linfócitos T reguladores (BUCKNER, 2010). Em nosso estudo, no entanto, excessiva produção de citocinas relacionadas ao fenótipo Th17 não foi atrelada à deficiência produção de citocinas anti-inflamatórias. Nenhuma diferença significativa na produção de IL-10 e TGF-  $\beta$  foi observada nas culturas de indivíduos com NMO-RR e saudáveis em nosso estudo. Esse resultado, no entanto, não descarta a possibilidade de uma refratariedade das células Th17 às ações imunossupressoras dessas citocinas durante as crises clínicas.

## 6 CONCLUSÕES

As CMSP dos indivíduos com NMO-RR proliferaram menos em resposta a um ativador policlonal das células T, a fitohemaglutinina. Isso pode estar relacionado tanto a menor produção *in vitro* da citocina IL-2 quanto a menor viabilidade celular.

Quando comparado aos indivíduos saudáveis, níveis inferiores de citocinas relacionadas ao fenótipo Th1 (IFN- $\gamma$  e IL-2), mas não do tipo Th2 (IL-4 e IL-5), foram detectadas nas culturas de CMSP de pacientes com NMO-RR.

Por outro lado, níveis significativamente superiores de citocinas relacionadas ao fenótipo Th17 (IL-6 e IL-21) foram quantificados nos sobrenadantes das culturas de CMSP de pacientes com NMO-RR. Ademais, uma tendência em liberar mais IL-17, citocina típica do fenótipo Th17, foi também observada nas culturas dos pacientes.

Maior tendência de produzir citocinas relacionadas ao fenótipo Th17 em pacientes com NMO não foi atrelada a danos na produção *in vitro* de citocinas anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- $\beta$ ).

Interessantemente, uma relação direta foi observada entre a produção de IL-6 e IL-21 e o EDSS dos pacientes com NMO.

Em resumo, nossos resultados indicam que, mesmo na remissão clínica, as células T de pacientes com neuromielite óptica recorrente-remitente produzem níveis elevados de IL-6 e IL-21 que parecem estar atreladas a incapacidade neurológica.

## REFERÊNCIAS

ARGYRIOU, A.A.; MAKRIS, N. Neuromyelitis optica: a distinct demyelinating disease of the central nervous system. *Acta Neurol Scand*, v. 118, p. 209-217, 2008.

AKKOC, T.; KONING, P. J.; RÜCKERT, B.; BARLAN, I.; AKDIS, M.; AKDIS, C. A. Increased activation-induced cell death of high IFN-gamma-producing T(H)1 cells as a mechanism of T(H)2 predominance in atopic diseases. *J Allergy Clin Immunol*, v. 121, p. 652-658, 2008.

AL-DEEB, S.M.; YAQUB, B.A.; CHOWDHURY, M.A.; AZHAR, M.A.; KABIR, F. Neuromyelitis optica (Devic's disease) following chicken pox. *Trop Doct*, v. 24, p.75-76, 1994.

ALUVIHARE, V.R.; KALLIKOURDIS, M.; BETZ, A.G. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nat Immunol*, v. 5, p. 266-271, 2004.

ANNUNZIATO, F.; COSMI, L.; SANTARLASCIO, V.; MAGGI, L.; LIOTTA, F.; MAZZINGHI, B.; PARENTE, E.; FILÌ, L.; FERRI, S.; FROSALI, F.; GIUDICI, F.; ROMAGNANI, P.; PARRONCHI, P.; TONELLI, F.; MAGGI, E.; ROMAGNANI, S. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med*, v. 204, p. 1849-1861, 2007.

BELKAID, Y. Regulatory T cells and infection: A dangerous necessity. *Nat Rev Immunol*, v. 7, p. 875-888, 2007.

BRUM, D.G.; BARREIRA, A.A.; SANTOS, A.C.; KAIMEN-MACIEL, D.R.; MATIELLO, M.; COSTA, R.M.; DEGHAIDE, N.H.; COSTA, L.S.; LOUZADA-JUNIOR, P.; DINIZ, P.R.; COMINI-FROTA, E.R.; MENDES-JUNIOR, C.T.; DONADI, E.A.. HLA-DRB association in neuromyelitis optica is different from that observed in multiple sclerosis. *Mult Scler*, v.16, p. 21-29, 2009.

BUCKNER, J. H. Mechanisms of impaired regulation by CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) regulatory T cells in human autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol*, v. 10, p. 849-59, 2010.

CHUSID, M.J.; WILLIAMSON, S.J.; MURPHY, J.V.; RAMEY, L.S. Neuromyelitis optica (Devic's disease) following varicella infection. *J Pediatr*, v. 95, p.737-738, 1979.

COQUERELLE, C.; MOSER, M. DC subsets in positive and negative regulation of immunity. *Immunol Rev*, v. 234, p. 317-334, 2010.

CORREALE, J.; FIOL, M. Activation of humoral immunity and eosinophils in neuromyelitis optica. *Neurology*, v. 63, p. 2363-2370, 2004.

COSTA, V.S.; MATTANA, T.C.; DA SILVA, M.E. Unregulated IL-23/IL-17 immune response in autoimmune diseases. *Diabetes Res Clin Pract*, v. 88, p. 222-6, 2010.

COSTANTINO, C. M.; BAECHER-ALLAN, C. M.; HAFLER, D. A. Human regulatory T cells and autoimmunity. *Eur J Immunol*, v. 38, p.921-924, 2008.

DEVIC, E. Myélite subaiguë compliquée de névrite optique. *Bull Med*, v. 8, p. 1033-1034, 1894.

DIECKMANN, D.; PLOTTNER, H.; BERCHTOLD, S.; BERGER, T.; SCHULER, G. Ex vivo isolation and characterization of CD4(+) CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood. *J Exp Med*, v. 193, p. 303-10, 2001.

DOUHLIK, S.; SBLOVA, O.; KRYL, R.; NOVAK, M. Neuromyelitis optica as a parainfectious complication of varicella. *Cesk Neurol Neurochir*, v. 38, p. 238-242, 1975.

DUSTIN, M. L.; TSENG, S. Y.; VARMA, R.; CAMPI, G. T-cell-dendritic cell immunological synapses. *Cur Opin Immunol*, v. 18, p. 512-16, 2006.

FALLARINO, F.; GROHMANN, U.; HWANG, K.W.; ORABONA, C.; VACCA, C.; BIANCHI, R.; BELLADONNA, M. L.; FIORETTI, M. C.; ALEGRE, M. L.; PUC CETTI, P. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol*, v. 4, p. 1206-12, 2003.

FANTINI, M. C.; BECKER, C.; MONTELEONE, G.; PALLONE, F.; GALLE, P. R.; NEURATH M. F. Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+CD25- T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7. *J Immunol*, v. 172, p. 5149-5153, 2004.

FAZILLEAU, N.; MCHEYZER-WILLIAMS, L. J.; MCHEYZER-WILLIAMS, M. G. Local development of effector and memory T helper cells. *Cur Opin Immunol*, v. 19, p. 259-67, 2007.

FUKASAWA, T.; YAMASAKI, K.; ITO, H.; KIKUCHI, S.; MINOHARA, M.; HORIUCHI, I.; TSUKISHIMA, E.; SASAKI, H.; HAMADA, T.; NISHIMURA, Y., TASHIRO, K.; KIRA, J. Both the HLA-DPB1 and DRB1 alleles correlate with risk for multiple sclerosis in Japanese: clinical phenotypes and gender as important factors. *Tissue Antigens*, v.55, p. 199-205, 2000.

GRAEBER, K.E.; OLSEN, N.J. Th17 cell cytokine secretion profile in host defense and autoimmunity. *Inflamm Res*, v.61, p. 87-96, 2012.

GROHMANN, U.; ORABONA, C.; FALLARINO, F.; VACCA, C.; CALCINARO, F.; FALORNI, A.; CANDELORO, P.; BELLADONNA, M. L.; BIANCHI, R.; FIORETTI, M. C.; PUC CETTI, P. CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nat Immunol*, v. 3, p. 1097-101, 2002.

GROUX, H.; O'GARRA, A.; BIGLER, M.; ROULEAU, M.; ANTONENKO, S.; DE VRIES, J. E.; RONCAROLO, M. G. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature*, v. 389, p. 737-742, 1997.

GUTCHER, I.; BECHER, B. APC-derived cytokines and T cell polarization in autoimmune inflammation. *J Clin Invest*, v. 117, p.1119-1125, 2007.

HENRICKSON, S. E.; VON ADRIAN, U. H. Single-cell dynamics of T-cell priming. *Cur Opin Immunol*, v. 19, p. 249-58, 2007.

HUSTER, K. M.; STEMBERG, C.; BUSH, G. H. Protective immunity towards intracellular pathogens. *Curr Opin Immunol*, v. 18, p. 458-64, 2006.

ISHIZU, T., OSOEGAWA, M., MEI, F-J, KIKUCHI, H., TANAKA, M., TAKAKURA, Y. Minohara, M.; Murai, H.; Mihara, F.; Taniwaki, T.; Kira, J. Intrathecal activation of the IL-17/IL-8 axis in opticospinal multiple sclerosis. *Brain*, v. 128, p. 988-1002, 2005.

KILLESTEIN, J.; HINTZEN, R. Q.; UITDEHAAG, B. M.; BAARS, P. A.; ROOS, M. T.; VAN LIER R. A.; POLMAN CH. Baseline T cell reactivity in multiple sclerosis is correlated to efficacy of interferon-beta. *J Neuroimmunol*, v. 133: p. 217-24, 2002.

KIRA, J-I. Neuromyelitis optica and opticospinal multiple sclerosis: mechanisms and pathogenesis. *Pathophysiology*, v. 18, p. 69-79, 2011.

KITANI, A.; FUSS, I.; NAKAMURA, K.; KUMAKI, F.; USUI, T.; STROBER, W. Transforming growth factor (TGF)-beta1-producing regulatory T cells induce Smad-mediated interleukin 10 secretion that facilitates coordinated immunoregulatory activity and amelioration of TGF-beta1-mediated fibrosis. *J Exp Med*, v. 198, p. 1179-1188, 2003.

KURTZE, J. F. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology*, v. 33, n. 11, p. 1444-1452, 1983.

LEE, C. C.; LIN, S. J.; CHENG, P. L.; KUO, M. L. The regulatory function of umbilical cord blood CD4(+) CD25(+) T cell stimulated with anti-CD3/anti-CD28 and exogenous IL-2 or IL-15. *Pediatr Allergy Immunol*, v. 20, p. 624-32, 2009.

LENNON, V.A.; KRYZER, T. J.; PITTOCK, S.J.; VERKMAN, A.S.; HINSON, S.H. IgG marker of optic-spinal multiple sclerosis binds to the aquaporin-4 water channel. *J Exp Med*, v. 202, p. 473-7, 2005.

LENNON, V.A.; WINGERCHUCH, D. M.; KRYZER, T.J.; PITTOCK, S.J.; LUCCHINETTI, C.F.; FUJIHARA, C.F.; NAKASHIMA, I.; WEINSHENKER, B.G. serum autoantibody marker of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis. *Lancet*, v. 364, p. 2106-2112, 2004.

LEVINGS, M. K.; SANGREGORIO, R.; RONCAROLO, M. G. Human CD25(+) CD4(+) T regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function. *J Exp Med*, v. 193, p. 1295-302, 2001.

LEVINGS, M. K.; SANGREGORIO, R.; SARTIRANA, C. Human CD25+CD4+ T suppressor cell clones produce transforming growth factor beta, but not interleukin 10, and are distinct from type 1 T regulatory cells. *J Exp Med*, v. 196, p. 1335-46, 2002.

LI W.; MINOHARA M; PIAO H.; MATSUSHITA T.; MASAKI K.; MATSUOKA T.; ISOBE N.; SU J.J.; OHYAGI Y.; KIRA, J-Y. Association of anti-*Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein antibody response with anti-aquaporin-4 autoimmunity in Japanese patients with multiple sclerosis and neuromyelitis optica. *Mult Scler*, v. 15, p. 1411-1421, 2009.

LI, M. O.; FLAVELL, R. A. Contextual Regulation of Inflammation: A Duet by Transforming Growth Factor-b and Interleukin-10. *Immunity*, v. 8, p. 468-476, 2008.

LINHARES, U.C.; SCHIAVONI, P.B.; BARROS, P.O.; KASAHARA, T.M.; TEIXEIRA, B.; FERREIRA, T.B.; ALVARENGA, R.; HYGINO, J.; VIEIRA, M.M.; BITTENCOURT, V.C.; ANDRADE, R.M.; ANDRADE, A.F.; BENTO, C.A.M. The Ex Vivo Production of IL-6 and IL-21 by CD4(+) T Cells is Directly Associated with Neurological Disability in Neuromyelitis Optica Patients. *J Clin Immunol*, 2012 Sep 5. [Epub ahead of print].

LIU, W.; PUTNAM, A. L.; XU-YU, Z.; SZOT, G. L.; LEE, M. R.; ZHU, S.; GOTTLIEB, P. A.; KAPRANOV, P.; GINGERAS, T. R.; FAZEKAS DE ST GROTH, B.; CLAYBERGER, C.; SOPER, D. M.; ZIEGLER, S. F.; BLUESTONE, J. A. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J Exp Med*, v. 203, p. 1701-1711, 2006.

LUCCHINETTI, C. F.; MANDLER, R. N.; MCGAVERN, D.; BRUCK, W.; GLEICH, G.; RANSOHOFF, R.M.; TREBST, C.; WEINSHENKER, B.; WINGERCHUK, D.; PARISI, J.E.; LASSMANN, H. A role for humoral mechanisms in the pathogenesis of Devic`s neuromyelitis optica. *Brain*, v. 125, p. 1450-61, 2002.

MAHNKE, K.; ENK, A. H. Dendritic cells: key cells for the induction of regulatory T cells? *Curr Top Microbiol Immunol*, v. 293, p.133-150, 2005.

MAKANI, S.S.; JEN, K.Y.; FINN, P.W. New Costimulatory Families: Signaling Lymphocytic Activation Molecule in Adaptive Allergic Responses. *Cur Mol Med*, v. 8, p. 359-364, 2008.

MARQUES, A. Da neuromielite ótica: contribuição clínica e etiológica. *Hospital*, v. 24, p. 49-63, 1943.

MATIELLO, M.; JACOB, A.; WINGERCHUK, D. M.; WEINSHENKER, B. G. Neuromyelitis optica. *Curr Opin Neurol*, v. 20, p.255-60, 2007.

MATSUZAKI, G.; UMEMURA, M. IL-17 as an effector molecule of innate and acquired immunity against infections. *Microbiol Immunonol*, v. 51, p.1139-1147, 2007.

MAYNARD, C. L.; HARRINGTON, L. E.; JANOWSKI, K. M.; OLIVER, J. R.; ZINDL, C. L.; RUDENSKY, A. Y. Regulatory T cells expressing interleukin 10 develop from Foxp3+ and Foxp3-precursor cells in the absence of interleukin 10. *Nat Immunol*, v. 8, p. 931-941, 2007.



MCGEACHY, M. J.; STEPHENS, L. A.; ANDERTON, S. M. Natural recovery and protection from autoimmune encephalomyelitis: Contribution of CD4+CD25+ regulatory T cells within the central nervous system. *J Immunol*, v. 175, p. 3025-3032, 2005.

MCKINSTRY, K. K.; STRUTT, T. M.; SWAIN, S. L. The potential of CD4 T-cell memory. *Immunol*, v. 130, p. 1-9, 2010.

MERLE, H.; SMADJA, D.; CORDOBA, A. Neuromyéélite optique et nécrose rétinienne aigüe bilatérale d'origine zostérienne chez une patiente atteinte du SIDA. *J Fr Ophthalmol*, v. 21, p. 381-386, 1998.

MERRILL, J. E.; MOHLSTROM, C.; UITTENBOGAART, C.; KERMANIARAB, V.; ELLISON, G. W.; MYERS, L. W. Response to and production of interleukin 2 by peripheral blood and cerebrospinal fluid lymphocytes of patients with multiple sclerosis. *J Immunol*, v. 133, p. 931-7, 1984.

MIHARA, M.; HASHIZUME, M.; YOSHIDA, H.; SUZUKI, M.; SHIINA, M. IL-6/IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond)*, v. 122, p.143-59, 2012.

MILLS, G.B., SCHMANDT, R., GIBSON, S., LEUNG, B., HILL, M., MAY, C., SHI, Y.F., BRANCH, D.R., RADVANYI, L., TRUITT, K.E. Transmembrane signaling by the interleukin-2 receptor: progress and conundrums. *Semin Immunol*, v. 5, p. 345-364, 1993.

MIOSSEC, P. IL-17 and Th17 cells in human inflammatory diseases. *Microb Infect*, v. 11, p. 625-630, 2009.

MIYAZAWA, I.; FUJIHARA, K.; ITOYAMA, Y. Eugène Devic (1858-1930). *J Neurol*, v. 249, p. 351-352, 2002.

MORRISON, P. J.; BALLANTYNE, M. C. Interleukin-23 and T helper 17-type responses in intestinal inflammation: from cytokines to T-cell plasticity. *Immunology*, v. 133, p. 397-408, 2011.

NAKAMURA, K.; KITANI, A.; FUSS, I.; PEDERSEN, A.; HARADA, N.; NAWATA, H.; STROBER, W. TGF-beta 1 plays an important role in the mechanism of CD4+CD25+ regulatory T cell activity in both humans and mice. *J Immunol*, v. 172, p. 834-42, 2004.

OBAR, J. J.; LEFRANÇOIS, L. Memory CD8<sup>+</sup> T cell differentiation. *Ann N Y Acad Sci*, v. 1183, p. 251-66, 2010.

OKAMOTO, T.; OGAWA, M.; LIN, Y.; MURATA, M.; MIYAKE, S.; YAMAMURA, T. Treatment of neuromyelitis optica: Current debate. *Therap Adv Neurol Dis*, v. 1, p.43-52, 2008.

PENNA, G.; GIARRATANA, N.; AMUCHASTEGUI, S. Manipulating dendritic cells to induce regulatory T cells. *Microbes Infect*, v. 7, p.1033-1039, 2005.

PICCIRILLO, C. A.; SHEVACH, E. M. Cutting edge: Control of CD8<sup>+</sup> T cell activation by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> immunoregulatory cells. *J Immunol*, v.167, p. 1137-1140, 2001.

PITTOCK, S. J.; WEINSHENKER, B. G.; LUCCHINETTI, C. F.; WINGERCHUK, D. M.; CORBOY J. R.; LENNON V. A. Neuromyelitis Optica brain lesions localized at sites of high Aquaporin 4 expression. *Arch Neur*, v. 63, p. 964-968, 2006.

POLANCZYK, M. J.; CARSON, B. D.; SUBRAMANIAN, S.; AFENTOULIS, M.; VANDENBARK, A. A.; ZIEGLER, S. F.; OFFNER, H. Cutting edge: estrogen drives expansion of the CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cell compartment. *J Immunol*, v.173, p. 2227-2230, 2004.

POLANCZYK, M. J.; HOPKE, C.; VANDENBARK, A. A.; OFFNER, H. Estrogen mediated immunomodulation involves reduced activation of effector T cells, potentiation of Treg cells, and enhanced expression of the PD-1 costimulatory pathway. *J Neurosci Res*, v. 284, p. 370-378, 2006.

POPPE, A.Y.; LAPIERRE, Y.; MELANÇON, D.; LOWDEN, D.; WARDELL, L.; FULLERTON, L.M.; BAR-OR, A. Case report: Neuromyelitis optica with hypothalamic involvement. *Mult Scler*, v.11, p. 617-621, 2005.

RONCAROLO, M. G.; BACCHETTA, R.; BORDIGNON, C.; NARULA, S.; LEVINGS, M. K. Type 1 T regulatory cells. *Immunol Rev*, v. 182, p. 68-79, 2001.

SAITO, S.; SHIMA, A.; NAKASHIMA, A.; SHIOZAKI, A.; ITO, M.; SASAK, Y. What is the role of regulatory T cells in the success of implantation and early pregnancy? *J Assist Reprod Genet*, v. 24, p. 379-386, 2007.

SAKUMA, H.; KOHYAMA, K.; PARK, I.K.; MIYAKOSHI, A.; TANUMA, N.; MATSUMOTO, Y. Clinicopathological study of a myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced demyelinating disease in LEW.1AV1. rats. *Brain*, v. 127, p. 2201-2213, 2004.

SCOLDING, N. Devic's disease and autoantibodies. *Lancet*, v. 4, p. 136-137, 2005.

SHEVACH, E.M. Mechanisms of Foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity*, v. 30, p. 636-645, 2009.

SHEVACH, E. M.; DIPAOLO, R. A.; ANDERSSON, J.; ZHAO, D. M.; STEPHENS, G. L.; THORNTON, A. M. The lifestyle of naturally occurring CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *Immunol Rev*, v. 212, p. 60-73, 2006.

SPOLSKI, R.; LEONARD, W. J. IL-21 and T follicular helper cells. *Intern Immunol*, v. 22, p. 7-12, 2009.

STEINBRINK, K.; JONULEIT, H.; MÜLLER, G.; SCHULER, G.; KNOP, J.; ENK, A. H. Interleukin-10-treated human dendritic cells induce a melanomaantigen-specific anergy in CD8(+) T cells resulting in a failure to lyse tumor cells. *Blood*, v. 93, p. 1634-1642, 1999.

STEPHENS, L. A.; MOTTET, C.; MASON, D.; POWRIE, F. Human CD4(+) CD25(+) thymocytes and peripheral T cells have immune suppressive activity in vitro. *Eur J Immunol*, v. 31, p. 1247-54, 2001.

STROBL, H.; KNAPP, W. TGF-beta1 regulation of dendritic cells. *Microbes Infect*, v. 1, p. 1283-1290, 1999.

TAI, P.; WANG, J.; JIN, H.; SONG, X.; YAN, J.; KANG, Y.; ZHAO, L.; AN, X.; DU, X.; CHEN, X.; WANG, S.; XIA, G.; WANG, B. Induction of regulatory T cells by physiological level estrogen. *J Cell Physiol*, v. 214, p. 456-64, 2008.

UZAWA, A.; MORI, M.; ARAI K.; SATO, Y.; HAYAKAWA, S.; MASUDA, S.; TANIGUCHI, J.; KUWABARA, S. Cytokine and chemokine profiles in neuromyelitis optica: significance of interleukin-6. *Mult Scler*, v.16, p.1443-1452, 2010.

VIGNALI, D. A.; COLLISON, L. W.; WORKMAN, C. J. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol*, v. 8, p. 523-532, 2008.

WANG, H. H.; DAI, Y. Q.; QIU, W., LU, Z. Q.; PENG, F. H.; WANG, Y. G.; BAO, J.; LI, Y.; HU, X.Q. Interleukin-17-secreting T cells in neuromyelitis optica and multiple sclerosis during relapse. *J Clin Neuroscience* v. 18, p.1313-1317, 2011.

WATTS, C.; ZARU, R.; PRESCOTT, A. R.; WALLIN, R. P.; WEST, M. A. Proximal effects of Toll-like receptor activation in dendritic cells. *Cur Opin Immunol.* v. 19, p. 73-8, 2007.

WILLIAMSON, P.M. Neuromyelitis optica following infectious mononucleosis. *Proc Aust Assoc Neurol* v.12, p.153-155, 1975.

WING, K.; EKMARK, A.; KARLSSON, H.; RUDIN, A.; SURI-PAYER, E. Characterization of human CD25+ CD4+ T cells in thymus, cord and adult blood. *Immunol* v. 106, p.190-9, 2002.

WINGERCHUK, D.M.; HOGANCAMP, W. F.; O'BRIEN, P.C.; WEINSHENKER, B. G. The clinical course of neuromyelitis optica (Devic's syndrome). *Neurology*, v. 53, p.1107-1114, 1999.

WINGERCHUK, D.M.; LENNON, V.A.; LUCCHINETTI, C.F.; PITTOCK, S.; WEINCHENKER, B.G. The spectrum of neuromyelitis optica. *Lancet Neurology* v. 6, p. 805-815, 2007.

WINGERCHUK, D.M.; LENNON, V.A.; PITTOCK, S.J.; LUCCHINETTI, C.F.; WEINSHENKER, B.G. Revised diagnostic criteria for neuromyelitis optica. *Neurology* v. 66, p. 1485-9, 2006.

XU, L.; KITANI, A.; STROBER, W. Molecular mechanisms regulating TGF-beta-induced Foxp3 expression. *Mucosal Immunol.* v. 3, p.. 230-8, 2010.

ZHU, J.; YAMANE, H.; PAUL, W. E. Differentiation of effector CD4 T cell populations. *Annu Rev Immunol.* v. 28, p. 445-89, 2010.

## **ANEXO A - Expanded Disability Status Scale (EDSS)**

### **Os sistemas funcionais avaliados no âmbito da escala EDSS.**

---

Funções Piramidais - movimento voluntário

Funções do Tronco Cerebral - movimento dos olhos, sensação e movimento da face, engolir

Funções Visuais (ou Ópticas)

Funções Cerebrais (ou Mentais)- memória, concentração, humor

Funções Cerebelares - coordenação do movimento ou equilíbrio

Funções Sensitivas

Funções Intestinais e Vesicais

Outras Funções - incluindo a fadiga

---

### **A Escala EDSS<sup>1</sup>.**

<b>EDSS</b>	<b>Déficit neurológico</b>
0	Exame neurológico normal
1	Ausência de incapacidade funcional e exame com achados anormais mínimos
2	Incapacidade funcional mínima em apenas um sistema funcional
3	Capaz de andar sem ajuda, mas com incapacidade moderada em um dos sistemas funcionais
4	Capaz de andar sem ajuda pelo menos 500 metros, mas tem incapacidade grave em um dos sistemas funcionais
5	Capaz de andar sem ajuda pelo menos 200 metros, mas a incapacidade é muito grave para estar apto para o trabalho a tempo inteiro
6	Precisa de uma bengala, muleta ou outra ajuda para andar 100 metros, com ou sem pausas
7	Não consegue andar mais de 5 metros, mesmo com ajuda, pode mover a cadeira de rodas e transferir-se sem ajuda
8	Restringido à cadeira, cama ou cadeira de rodas, braços funcionais mas necessita de assistência para a transferência
9	Acamado e totalmente dependente, braços não funcionais, mas pode comer e falar
10	Morte devida à EM (muito raro)

---

<sup>1</sup>Expanded Disability Status Scale (KURTZE, 1983)

## ANEXO B - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa CEP-UNIRIO



### COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP-UNIRIO UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - UNIRIO

#### PARECER CONSUBSTANCIADO

TTDD:232

Assunto: Projetos de Pesquisa – Avaliação.

**Protocolo CEP-UNIRIO:** 0042/2011 **FR** 460879 **CAAE:** 0050.0.313.000-11

**Projeto de Pesquisa:** Avaliação fenotípica e funcional dos Linfócitos T de pacientes com neuromielite óptica.

**Versão do Protocolo e Data:** 09/09/2011.

**Pesquisador(a) Responsável:** Cleonice Alves de Melo Bento.

**Instituição:** Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro - UNIRIO.

#### Sumário do protocolo:

- **Objetivos:** avaliar o perfil imunológico de pacientes com neuromielite óptica (NMO) em resposta a diferentes estímulos antigênicos; avaliar a proliferação dos linfócitos T mediante ativação por diferentes antígenos e patógenos; a frequência de diferentes subpopulações de células T no sangue periférico de pacientes com Neuromielite Óptica; a frequência e a situação funcional das células dendríticas no sangue periférico dos pacientes em questão; o impacto de diferentes neurotransmissores do stress na função in vitro das células T dos pacientes com NMO; quantificar a produção in vivo e in vitro de citocinas relacionadas aos fenótipos inflamatórios e anti-inflamatórios de células T nos pacientes com NMO.

- **Súmula do Projeto:** o projeto tem como foco o estudo da neuromielite óptica, doença desmielinizante do sistema nervoso central. O status funcional de células imunológicas de pacientes será avaliado. Serão utilizados pacientes do Hospital da Lagoa, com critério de inclusão o diagnóstico dos diversos tipos de NMO, e exclusão obesidade mórbida, consumo de álcool e tabaco. Ocorrerá a coleta de 20 mL de sangue para quantificação de células imunológicas e estudo de cultura de células para avaliação de proliferação e viabilidade celular. Para as análises estatísticas serão utilizados testes não paramétricos.

- **Comentários do Relator:** projeto de relevância científica e adequadamente discutido na sua introdução, justificativa e metodologia. Foi descrito o destino da cultura de celular; definição pelo pesquisador do período de tempo para seleção dos pacientes na metodologia e/ou esgotamento amostral; O cronograma está adequado.

- **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido:** está de acordo com as Normas da Resolução 196/96.



**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP-UNIRIO**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - UNIRIO**

- O sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última página do referido Termo.
- O pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

- Informo que a autorização para posterior publicação fica condicionada á apresentação do resumo do estudo proposto á apresentação.

Diante do exposto, o Comitê de ética em Pesquisa da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro – CEP –UNIRIO, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS196/96 e suas complementares, manifesta-se pela aprovação do protocolo de pesquisa proposto.

Emitimos, portanto, parecer que classifica o projeto como **APROVADO**.

Rio de Janeiro, 18 de novembro de 2011.

  
Fabiana Barbosa Assumpção de Souza  
Coordenadora do CEP-UNIRIO

Fabiana B. Assumpção de Souza  
Coordenadora  
CEP - UNIRIO  
PROPG-DPQ

## ANEXO C - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO**  
**Departamento de Microbiologia e Parasitologia**  
**Laboratório de Imunofisiologia e Imunopatologia dos linfócitos T**

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

#### **Título do Projeto:**

**“Avaliação fenotípica e funcional dos linfócitos T de pacientes com neuromielite óptica”**

Investigador Principal: Dra. Cleonice Alves de Melo Bento – Professora de Imunologia da UNIRIO.

Tels.: 2531-7906/ 2558-7586 / 9883-8948

### ***EXPLICAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA AOS PARTICIPANTES***

#### ***1.1- Propósito do estudo***

O propósito desse estudo é avaliar o impacto de diferentes eventos imunes em pacientes com neuromielite óptica (NMO) e compará-los com indivíduos saudáveis. Assim podemos identificar alguns parâmetros que possam estar implicados na NMO.

#### ***1.2- Procedimentos***

Durante a consulta clínica com o médico, uma vez estabelecido o diagnóstico de NMO, o médico fará algumas perguntas de relevância para o nosso estudo. Essas perguntas objetivam avaliar relatos de intercorrências clínicas de relevância imunológica, tais como o número de episódios de surtos ao ano, ocorrência de reações alérgicas e de outras imunopatologias, com definição do tipo de desordem imunológica de fundo auto-imune.

Após a entrevista, e com o consentimento oral e por escrito do paciente, o médico irá colher o volume total de 20 mL de sangue periférico que será utilizado para realizar uma avaliação quantitativa e qualitativa de seu sistema imune.



### ***1.3- Riscos e desconfortos***

A aplicação das perguntas não oferece nenhum tipo de risco ou desconforto. Caso você esteja se sentindo desrespeitado, pode interrompê-lo a qualquer momento. A obtenção do sangue periférico será conduzida por seu médico e utilizará todo o material sob condições adequadas.

### ***1.4- Benefícios***

Os resultados obtidos pelo estudo serão analisados pelo nosso grupo. Estes resultados poderão fornecer informações importantes relacionadas à NMO. Mas, eles podem não lhe trazer benefícios imediatos, desde que são necessários vários anos de estudos em um número elevado de pacientes. No entanto, caso os achados sejam significativos, o seu médico terá acesso a todos eles e poderá, caso julgue necessário, apresentá-los a você.

### ***1.5-Alternativas para a participação***

Sua participação nesse estudo é voluntária. Você poderá interromper a entrevista ou não permitir a coleta de seu sangue a qualquer momento, sem nenhum problema para você. Você também poderá se retirar do estudo a qualquer momento sem nenhum prejuízo quanto ao seu atendimento pela equipe médica hospitalar.

### ***1.6- Custos e compensações***

Você não pagará nada para participar nesse estudo. Você não será pago por estar no estudo.

### ***1.7- Confidenciabilidade***

Este estudo envolve informações confidenciais. Essas informações serão mantidas estritamente confidenciais entre os membros envolvidos na pesquisa. Qualquer publicação científica dos resultados não identificará você.

### ***1.8- Direito para se retirar da pesquisa***

Sua participação é voluntária. Você não é obrigado a participar nessa pesquisa. Você é livre para interromper a qualquer momento sua participação.

### ***1.9- Perguntas ou problemas***

Se você tem alguma pergunta ou problema quanto a esse estudo, entre em contato com Dr<sup>a</sup>. Regina Maria Papais Alvarenga ou Dr<sup>a</sup>. Cleonice Alves de Melo Bento, professora e Imunologista da UNIRIO tel: 2264-2723 ou 2531-7906.

### ***1.10- Consentimento***

Uma vez que você leu (ou lhe foi explicado) e entendeu o propósito desse estudo, os procedimentos que serão realizados, os riscos e benefícios, e você VOLUNTARIAMENTE concorda em fazer parte desse estudo, favor assinar seu nome abaixo:

Nome do Indivíduo entrevistado:

Assinatura do Indivíduo entrevistado:

Eu expliquei o propósito do estudo para o paciente. Ao meu entender, ela entendeu o propósito, procedimentos, riscos e benefícios desse estudo.

Nome do Investigador:

Assinatura do Investigador:

Testemunha:

Assinatura da Testemunha:

Data: