

CONIC-SEMESP

13º Congresso Nacional de Iniciação Científica

Anais do Conic-Semesp. Volume 1, 2013 - Faculdade Anhanguera de Campinas - Unidade 3. ISSN 2357-8904

TÍTULO: ESTUDO DA RESPOSTA FARMACOLÓGICA DE LINFÓCITOS DE PACIENTES PORTADORES DE VITILIGO AO TRATAMENTO IN VITRO COM O IMUNOSSUPRESSOR TACROLIMUS

CATEGORIA: CONCLUÍDO

ÁREA: CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E SAÚDE

SUBÁREA: FARMÁCIA

INSTITUIÇÃO: UNIVERSIDADE BANDEIRANTE ANHANGUERA

AUTOR(ES): CAROLINE LAIS STOPPA, MAURICIO BARBAN

ORIENTADOR(ES): SUSANA NOGUEIRA DINIZ

Realização:



Apoio:



1. RESUMO

Estudo da resposta farmacológica de linfócitos de pacientes portadores de vitiligo ao tratamento *in vitro* com o imunossupressor tacrolimus

O vitiligo é uma doença dermatológica adquirida que apresenta máculas acromicas do tecido cutâneo, de etiopatogenia desconhecida. O portador dessa doença dermatológica pode apresentar alterações no sistema imunológico, geralmente associadas com um fenótipo autoimune. Fatores genéticos estão associados ao desenvolvimento do vitiligo e atualmente fatores epigenéticos têm sido correlacionados com o vitiligo e com doenças autoimunes. O tratamento do vitiligo com imunomoduladores, como o tacrolimus, tem apresentado resultados controversos fazendo-se necessários estudos mais aprofundados sobre a resposta ao tratamento com esse imunossupressor. Neste estudo foram avaliados os efeitos farmacológicos do tratamento *in vitro* com tacrolimus, como proliferação celular e produção de IL-2 pelas metodologias do MTT e ELISA, o que permitiu classificar os pacientes em dois grupos: portadores de vitiligo respondedores e não respondedores ao tratamento *in vitro* com o imunossupressor tacrolimus. Os resultados apresentados sugerem que a avaliação de parâmetros farmacológicos *in vitro* pode ser útil para a predição de resposta clínica ao tratamento com drogas imunossupressoras comumente utilizadas na prática clínica, no caso o tacrolimus. Este processo serviria com objetivo de se avaliar *ex vivo* o impacto do fármaco no paciente, antes mesmo de se iniciar o tratamento.

Palavras-chave: vitiligo, PBMC, imunossupressor, tacrolimus

2. INTRODUÇÃO

Vitiligo é uma doença cutânea sistêmica crônica, multifatorial e poligênica, que ocorre em qualquer parte da pele e/ou mucosas e/ou pêlos e cabelos, caracterizada por máculas acromicas, que atinge 0,5% a 2% da população mundial e ambos os sexos (LERNER & NORDLUND, 1978). A etiologia é pouco conhecida e discutida, sendo a mais aceita atualmente o modelo da autoimunidade, mas existem também causas neurais, genéticas, bioquímica, oxidativas, virais, ambientais e outras que levam a redução funcional e/ou física dos melanócitos e com isso a despigmentação que se traduz na clínica como acromia. Pode acometer o individuo de varias formas,

desde uma única lesão acromica até acromia universal, podendo ser segmentar seguindo as linhas de Blaschko ou sem orientação neural. A doença geralmente começa na infância ou na idade adulta jovem com pico de início entre 10 e 30 anos (HALDER & CHAPELL, 2009). Todas as raças são afetadas pela doença, não havendo estudos que evidenciam maior prevalência entre fototipos cutâneos ou étnia (ORTONNE JP. 2008).

Diversas formas de tratamento são preconizadas para o tratamento do vitiligo tais como: esteróides, PUVA, despigmentação, terapia cirúrgica, laser de UVB, imunomoduladores dentre outros (SIMON, 2005). Inibidores da calcineurina, como o tacrolimus, tem sido utilizado com frequência para o tratamento de pacientes com vitiligo. O mecanismo molecular de inibição ocorre da seguinte maneira: os linfócitos T são ativados através da interação do seu receptor de superfície (receptor da célula T = TCR) com o antígeno na superfície da célula apresentadora de antígeno (APC) via apresentação por MHC classe II. Os sinais de ativação do complexo CD3 levam ao aumento no cálcio intracelular e promovem a síntese da subunidade FNATn (fator nuclear de células T ativadas). O cálcio livre intracelular liga-se a calmodulina, que se liga e ativa a calcineurina. A calcineurina causa a defosforilação da subunidade citoplasmática do FNAT (FNATc) e esse migra para o núcleo e promove a transcrição de várias citocinas, tais como IL-2, IL-3, IL-4, IL-5 e TNF. O tacrolimus bloqueia esse mecanismo normal de ativação inibindo a atividade da calcineurina, não havendo a defosforilação do fator FNAT e conseqüente migração para o núcleo. Assim, na presença desse imunossupressor não há expressão de citocinas como IL-2 (JANEWAY, 2005; ABBAS & LICHTMAN, 2004).

O tacrolimus pode ser usado tópico, oral e intravenoso. O uso tópico é aplicado em diversas doenças dermatológicas, via oral e intravenosa para prevenção de rejeição em transplantados. Em pacientes com vitiligo esse inibidor da calcineurina além de agir na borda da lesão onde se encontram as células T, possuem também efeito antiinflamatório e no sítio de aplicação (SIMON, 2005), reduz o número de células e de citocinas inflamatórias, sendo inclusive mais efetivo de que alguns glicocorticóides na redução da expressão de moléculas de adesão vascular para a diapedese das células (CAPRONI et al., 2006).

A resposta clínica ao tratamento com tacrolimus apresenta resultados variados dependendo de fatores ainda não totalmente elucidados. Trabalhos

demonstram que pacientes com vitiligo tratados com tacrolimus creme 0,03% para crianças de 2 a 15 anos de idade e tacrolimus creme 0,1% para indivíduos maiores de 16 anos de idade, aplicados duas vezes ao dia, para todas as lesões acromicas, apresentam alguma recuperação das lesões em qualquer tipo de pele. Entretanto, observou-se um maior benefício na repigmentação de lesões na cabeça e pescoço mais significantes do que a repigmentação do corpo e extremidades, a despeito da raça do paciente .Nesse trabalho foi sugerido que em áreas tratadas com tacrolimus (FK506) ocorre supressão da expressão da molécula TNF, que estaria envolvida no processo de repigmentação (GRIMES et al., 2004), mas não explica o maior benefício do tratamento em determinadas regiões quando comparadas com outras. Desta maneira, pretende-se realizar estudos mais aprofundados sobre a resposta ao tratamento com esse imunossupressor.

3. OBJETIVOS

Avaliar a resposta ao tratamento *in vitro* com o imunomodulador tacrolimus em células mononucleares do sangue periférico de pacientes portadores de vitiligo

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Isolar e cultivar células mononucleares do sangue periférico de pacientes portadores de vitiligo;
- Determinar a resposta ao tratamento *in vitro* com o imunossupressor tacrolimus de células de pacientes com vitiligo, através da medida de proliferação celular e produção de IL-2
- Correlacionar o padrão de resposta ao tratamento *in vitro* com imunossupressor e a presença de autoanticorpos específicos circulantes nesses pacientes

4. METODOLOGIA

Através de anamnese e exame clínico dermatológico selecionou-se os indivíduos portadores de vitiligo. Estes pacientes foram avaliados no período de setembro de 2012 a fevereiro de 2013 no consultório de dermatologia a Rua Américo Salvador Novelli 154, Sala 704, São Paulo, Capital, local de trabalho do pesquisador e médico dermatologista Dr. Mauricio Barban. Foram colhidos 30 mL de sangue de uma veia periférica, por um técnico de enfermagem no Laboratorio Nasa, SP, em tubos de heparina e em local apropriado e sob supervisionado pelo

pesquisador responsável pelo projeto. Assim que foram colhidas, as amostras foram identificadas com um número, e através de anamnese, foram colhidos os dados clínicos do doador. Os potenciais riscos para os sujeitos, de danos à sua dimensão física, são mínimos o termo de consentimento livre e esclarecido que foi utilizado nessa pesquisa está de acordo com a Resolução 196/ 96 do Conselho Nacional de Saúde/ MS. Este estudo foi aprovado pela comissão de ética em pesquisa com seres humanos da UNIBAN sob o número 283/12 em 19/07/12.

Células mononucleares (PBMC) dos pacientes portadores de vitiligo foram obtidas de sangue periférico heparinizado usando Ficoll – Hypaque (Coppage, 2000), e foram cultivadas em placas de 96 poços com RPMI (Sigma), HEPES 2,9 g/L (Sigma) e Garamicina 30 mg/mL (Schering-Plough), com 10% de soro fetal bovino inativado. O meio RPMI contém vermelho de fenol como indicador de pH, sua variação é de entre 6.6 e 8.0 onde em meio básico apresenta uma cor amarelada enquanto em meio ácido uma cor avermelhada. Isso ocorre porque a molécula de vermelho de fenol ao entrar em contato com um meio ácido, onde tem uma grande concentração de íons H⁺, mantém o seu hidrogênio ligado ao oxigênio do grupo carbonila deixando-o positivo. Os hidrogênios desprovidos de elétrons fazem um ataque eletrofílico no sulfito (SO₃⁺), deixando assim a molécula com um caráter positivo, por isso ocorre à mudança de cor para vermelho. Porém quando entra em contato com meio básico onde há uma carência de íons H⁺, o hidrogênio que está ligado ao oxigênio do grupo carbonila irá romper a ligação deixando para traz seus elétrons e levando assim esse hidrogênio carregado positivamente para o meio deixando a molécula carregada negativamente, por isso ocorrer a mudança de cor para o amarelo.

Para o tratamento com o imunossupressor, células controle não foram ativadas (C) ou foram ativadas com 100ng/μL de fitohemaglutinina (PHA) e 25 ng/mL de tacrolimus foram adicionados à metade da cultura ativada com PHA, e mantidas em meio RPMI completo por 96 h em estufa contendo 5% de CO₂ a 37 °C.

A proliferação celular foi avaliada pelo método de MTT, "CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay", (Promega, Madison, USA) que utiliza tetrazolium (MTS) bio-reduzido pelas células gerando um produto colorido chamado de formazona. A absorbância foi medida a 540 nm em espectrofotômetro. A medida da formazona formada correlaciona diretamente com o número de células viáveis na cultura. A produção de IL-2 foi medida no sobrenadante após 48hs de cultura das

células por ELISA (IL-2 ELISA Kit HU - Invitrogen)., de acordo com instruções do fabricante.

5. DESENVOLVIMENTO

5.1 - Padronização das condições de cultura e tratamento com o imunossupressor tacrolimus.

Para este estudo foram utilizadas células provenientes de pacientes portadores de vitiligo de ambos os sexos, etnias e diferentes idades. Os pacientes foram diagnosticados clinicamente por lesões acromicas diversas de formas, tamanhos e localizações variadas. As células mononucleares do sangue periférico (PBMC – *peripheral blood mononuclear cells*), utilizadas nesse estudo, foram enumeradas de V1 a V6. Após a coleta o sangue foi acamado em 15mL de Ficoll – Hypaque em tubos cônicos de 50mL. Os tubos foram centrifugados a 1700 rpm por 40 minutos em centrífuga sem freio e com aceleração. Após a centrifugação houve a separação dos componentes sanguíneos e então foi coletado o anel de células mononucleadas. Este anel foi adicionado em 10mL de PBS (Phosphate buffered saline) 1X e centrifugado a 1700 rpm por 10 minutos para lavar as células. Este procedimento foi repetido e então foram adicionados 3mL de meio RPMI completo composto por RPMI-1640, enriquecido com glutamina 2 mM, tamponado com bicarbonato de sódio 24 mM, HEPES 20 mM, 10% de soro fetal bovino (SFB) e antibióticos (10000 U/mL de penicilina e 10000 µg/mL de estreptomicina) e Garamicina 30 mg/mL (Schering-Plough). foi feita a contagem das células na câmara de Neubauer.

5.2- Avaliação dos parâmetros farmacológicos do efeito do tratamento com o imunossupressor tacrolimus.

Os parâmetros farmacodinâmicos do efeito do tratamento foram avaliados pela medida de proliferação celular e pela produção de IL-2.

Para avaliar a proliferação celular as PBMC (1×10^5 /mL) foram plaqueadas em uma placa de 96 wells em meio RPMI completo, na ausência (C) e na presença de PHA (PHA) e o imunossupressor tacrolimus (FK). Após 96 h foram adicionados 50 microlitros de “MTT” (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, da

Sigma-Aldrich) em cada poço e incubada na estufa a 5% de CO₂ durante 4 horas à 37° C. Este teste baseia-se na metabolização do MTT pela mitocôndria de células viáveis, que irá liberar a enzima succinato desidrogenase, capaz de converter o sal do tetrazolium, que é hidrossolúvel e de cor amarelada em cristais de Formazan, de cor roxa. A medida da formazona formada correlaciona-se diretamente com o número de células viáveis na cultura.

A produção de IL-2 foi obtida após 48hs de cultura das PBMC (1 X 10⁵/mL) plaqueadas como mostrado anteriormente. O sobrenadante de cultura foi retirado (100ul) e utilizado para quantificação de IL-2 secretada. A quantificação da produção dessa citocina foi feita baseada em uma curva padrão contendo quantidades conhecidas (0 pg/mL – 2000 pg/mL) da citocina e expressa como pg/mL.

6 – RESULTADOS

6.1 - Padronização das condições de cultura e tratamento com o imunossupressor tacrolimus.

Após o isolamento do anel de mononucleares as células foram contadas em camara de Neubauer e obteve-se os resultados apresentados no gráfico 1. Pode-se observar que a recuperação das células apresentou um bom rendimento e foi semelhante entre os indivíduos.

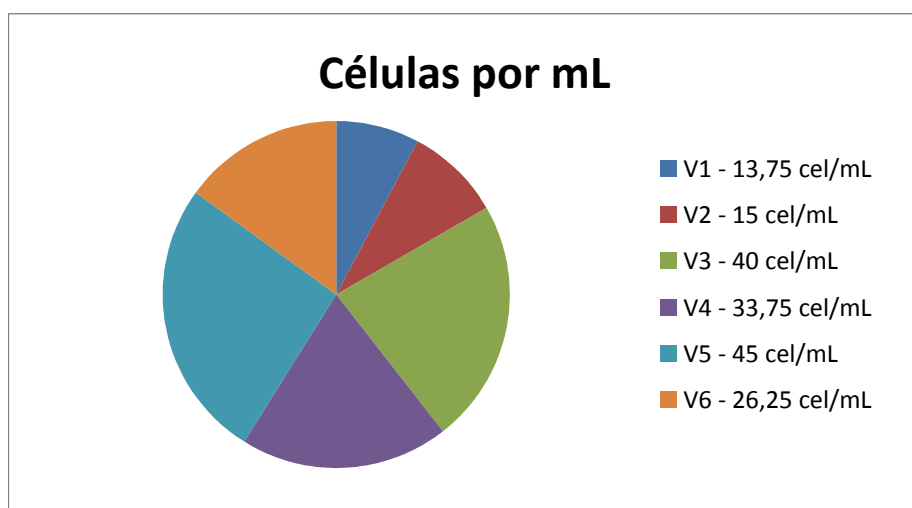


Gráfico 1 – Quantificação de células mononucleares isoladas de sangue periférico de pacientes com vitiligo (V1 a V6) em câmara de Neubauer. Os resultados foram expressos em número de células X 10⁵ /mL.

6.2- Avaliação dos parâmetros farmacológicos do efeito do tratamento com o imunossupressor tacrolimus.

A análise colorimétrica do sobrenadante de cultura mostrou que o meio RPMI se apresentou com pH neutro nos poços controle (C), devido a baixa proliferação dessas células, pH ácido nos poços estimulados (PHA), devido a alta taxa de proliferação das células e nos poços tratados com o imunossupressor tacrolimus (FK), foi observado tanto pH neutro, nas células responsivas ao imunossupressor, indicando a ação do FK no bloqueio da proliferação celular, quanto pH ácido, nas células não responsivas ao imunossupressor, indicando que o FK não inibiu a proliferação celular (Figura 2).

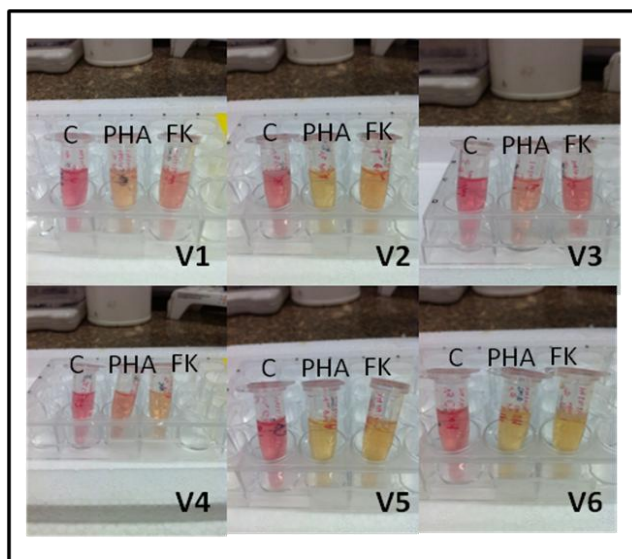


Figura 2 – Coloração do meio de cultura RPMI contendo vermelho de fenol como indicador de pH após 120 h de cultivo de células do sistema imune provenientes de 6 pacientes com vitiligo (V1-V6), sem estímulo, controle (C), estimuladas com mitógeno (PHA) e tratadas com o imunossupressor tacrolimus (FK).

A análise da proliferação celular pelo método do MTT mostrou que o tratamento *in vitro* de linfócitos humanos dos pacientes com vitiligo ativados com o mitógeno fitohemaglutinina (PHA) e o tratados com o imunossupressor tacrolimus inibiu significativamente ($p < 0,05$, teste t de student pareado) a proliferação dos linfócitos de 2 dos 6 indivíduos testados. Por outro lado, a proliferação das células de 4 indivíduos (V2, V4, V5 e V6) não sofreram uma inibição da proliferação quando tratadas com tacrolimus, mostrando que estes indivíduos não responderam ao tratamento com esse fármaco *in vitro*. Isto indica que 23% dos indivíduos testados

responderam ao tratamento, ou seja, seus linfócitos tiveram sua proliferação inibida pelo imunossupressor. Por outro lado, 67% dos indivíduos testados não responderam ao tratamento com o fármaco imunossupressor, quando considerado o parâmetro de proliferação celular (Gráfico 2).

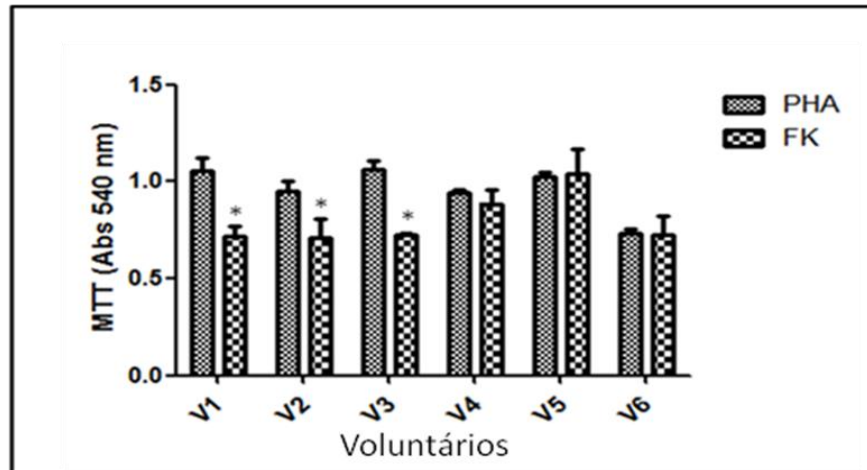


Gráfico 2 – Proliferação de células do sistema imune proveniente de pacientes com vitiligo (V1 a V6) após estímulo com fitohemaglutinina (PHA) e tratamento com o imunossupressor tacrolimus (FK). Os resultados foram expressos em absorbância lida a 540nm em espectrofotômetro após metabolização do MTT.

A avaliação da produção de IL-2 no sobrenadante de cultura dessas células por ELISA demonstrou que o tratamento *in vitro* de linfócitos humanos ativados com o mitógeno fitohemaglutinina (PHA) e tratados com o imunossupressor tacrolimus (FK) inibiu significativamente ($p < 0,05$, teste t de student pareado) a produção de IL-2 no sobrenadante de cultura de três indivíduos (V1, V2 e V3). Por outro lado, os doadores V4, V5 e V6 não tiveram a produção de IL-2 inibida por esse imunossupressor ($p = 0,33$, $p = 0,26$ e $p = 0,35$, respectivamente) (Gráfico 3).

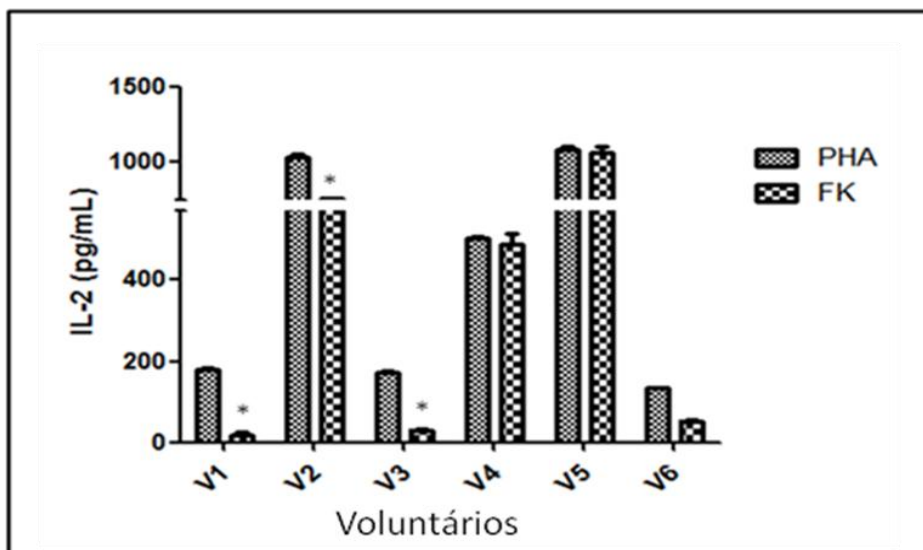


Gráfico 3 – Quantificação da produção de IL-2 no sobrenadante de cultura de PBMC provenientes dos doadores voluntários (V1 a V6) após estímulo com fitohemaglutinina (PHA) e tratamento com o imunossupressor tacrolimus (FK). Os resultados foram expressos em pg/mL. * $p < 0,05$ (teste t student pareado).

Desta forma, através da análise dos efeitos farmacológicos de inibição da proliferação celular e modulação da expressão de IL-2, dois grupos de células foram caracterizados: (1) indivíduos não respondedores e (2) indivíduos respondedores ao tratamento *in vitro* com o imunossupressor. Neste trabalho obtivemos um total de 3 pacientes que se apresentaram com o fenótipo de não respondedores (NR) ao tratamento *in vitro* com o imunossupressor tacrolimus e 3 pacientes com o fenótipo de respondedor (R) ao tratamento (Tabela 1). Nos indivíduos responsivos *in vitro* ao FK506, houve uma produção diminuída das IL-2 mostrando que o FK506 atua no bloqueio da produção da IL-2.

Tabela 1 – Classificação de doadores em respondedores (R) e não respondedores (NR) ao tratamento *in vitro* com FK

Pacientes	<i>in vitro</i>	Pacientes	<i>in vitro</i>
V1	R	V4	NR
V2	R	V5	NR
V3	R	V6	NR

7 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesse estudo foi demonstrado, através da análise dos efeitos farmacológicos de inibição da proliferação celular e da expressão de IL-2, que pacientes portadores de vitiligo foram classificados em dois grupos de indivíduos, os que responderam adequadamente e os que não responderam ao tratamento *in vitro* com tacrolimus, podendo futuramente prever a eficácia da resposta terapêutica antes mesmo de se iniciar o tratamento.

8 – FONTES CONSULTADAS

Abbas AK, Lichtman AH. Basic immunology: functions and disorders of the immune system. 2nd ed. Philadelphia: Saunders; 2004.

Caproni M, Torchia D, Antiga E, Volpi W, Fabbri P. Expression of adhesion molecules in atopic dermatitis is reduced by tacrolimus, but not by hydrocortisone butyrate: a randomized immunohistochemical study. Clin Exp Dermatol. 2006;31:813-7.

Grimes PE, Minus HR *et al.* Determination of optimal topical photochemotherapy for vitiligo. J Am Acad Dermatol 1982; 7(6):771-778.

Halder RM, Chappell JL. Vitiligo update. Semin Cutan Med Surg. 2009;28:86-92.

Janeway C. Immunobiology: the immune system in health and disease. 6th ed. New York: Garland Science; 2005.

Lerner AB, Nordlund JJ. Vitiligo: What is it? Is it important? JAMA. 1978; 239:1183-7.

Ortonne JP, Bahadoran P, Fitzpatrick TB, Mosher DB, Hori Y. Hypomelanoses and Hypermelanoses. In: Freedberg IM, Eisen AZ, Wolff K, Austen KF, Goldsmith LA, editors. Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine. 6th Ed. New York: McGraw Hill 2003, pp. 839-47.

Simon D, Vassina E, Yousefi S, Braathen LR, Simon HU. Inflammatory cell numbers and cytokine expression in atopic dermatitis after topical pimecrolimus treatment. Allergy. 2005;60:944-51