

CÉLULAS DENDRÍTICAS TOLEROGÊNICAS GERADAS COM VITAMINA D₃ MELHORAM A ENCEFALOMIELEITE EXPERIMENTAL AUTOIMUNE (EAE) ATRAVÉS DA INDUÇÃO DE CÉLULAS REGULADORAS: UM MECANISMO DEPENDENTE DA ENZIMA INDOLEAMINA 2,3-DIOXIGENASE



GABRIELA S. SPAGNOL, ADRIEL MORAES, ALESSANDRO S. FARIAS, ANA G. FONTANA, ANA LEDA F. LONGHINI, FERNANDO PRADELLA, LEONILDA M. B. SANTOS, ROSEMEIRE F. O. DE PAULA AND MARIANA P. A. SANTOS.

Laboratório de Neuroimunologia, Depto. de Genética, Evolução e Bioagentes – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas – SP, Brasil.

INTRODUÇÃO

Esclerose múltipla (EM) é a doença de desmielinização do sistema nervoso central (SNC) mais comum nos humanos. Embora a etiologia da EM seja desconhecida, é comumente aceito que a doença resulta de complexas interações entre múltiplos genes e o ambiente. A prevalência crescente da doença em maiores latitudes sugere a forte ligação entre a exposição a luz solar e um maior risco de EM. A deficiência de vitamina D₃ é observada em pacientes com EM e a causa dos baixos níveis desta vitamina é provavelmente devido ao baixo consumo desta e ao menor número de atividades externas, em climas que não são favoráveis para a síntese da vitamina D na pele. Muitos estudos demonstram evidências dos efeitos benéficos do tratamento da vitamina D no modelo experimental da EM, a encefalomielite experimental autoimune (EAE). O efeito regulador da vitamina D₃ resulta da interação entre o hormônio com seu receptor (VDR), o qual é expresso na superfície de células como: células dendríticas, astrócitos, microglia, neurônios e oligodendrócitos. Curiosamente, as células apresentadoras de antígeno (APCs), tais como macrófagos e células dendríticas (DCs, do inglês dendritic cells), expressam o VDR constitutivamente, sugerindo a importância do efeito da vitamina D₃ em eventos tanto da resposta imune inata quanto adaptativa. O presente estudo foi conduzido para investigar o efeito da vitamina D na atividade tolerogênica da DC e o papel da enzima indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO).

MÉTODOS

DESIGN EXPERIMENTAL

Animais e imunização

Ratos com idade de 6 a 8 semanas 15µg/animal pMBP₇₃₋₈₆ em CFA.

Geração de células dendríticas derivadas da medula óssea

Cultivadas em RPMI com 5% de CSF, 10ng/mL G-CSF e 400 ng/mL Vit.D. Troca do meio de cultura a cada 4 dias.

Transferência de células dendríticas

Foram transferidas 2x10⁵ células para o subcutâneo da pata dos ratos um dia antes da imunização.

Citometria de fluxo (FACS)

A análise foi realizada utilizando um FACScan, usando FACSDiva software.

Real Time PCR

TaqMan Primers (IL10, IL12p40, TGFβ1 e βactin) foram utilizados, da Applied Biosystems®, βactin foi utilizado como controle.

Análise Estatística

Análise não paramétrica de variância (Kruskal Wallis and Mann-Whitney) foi utilizada. O valor de p menor de 0.05 foi considerado significativo.

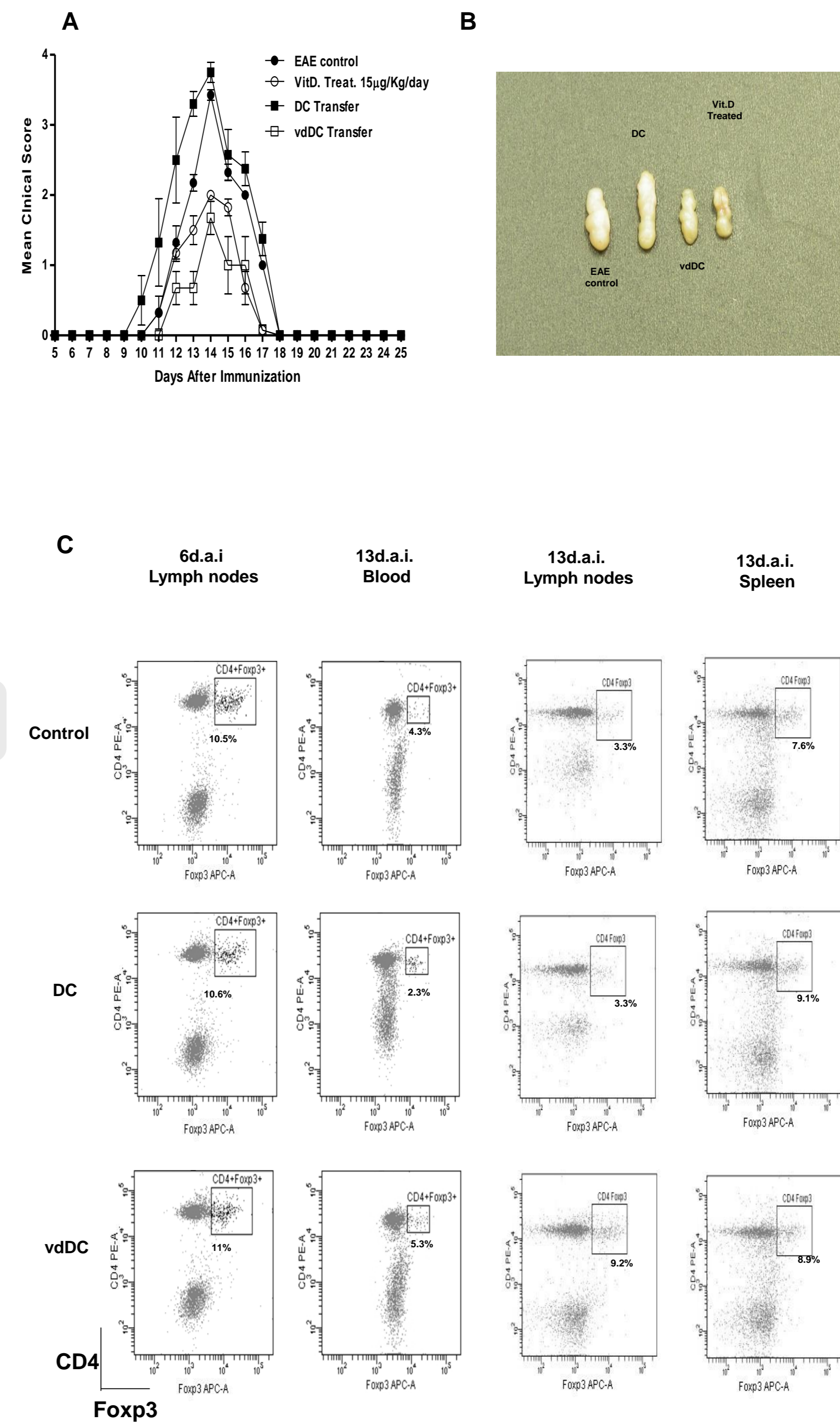
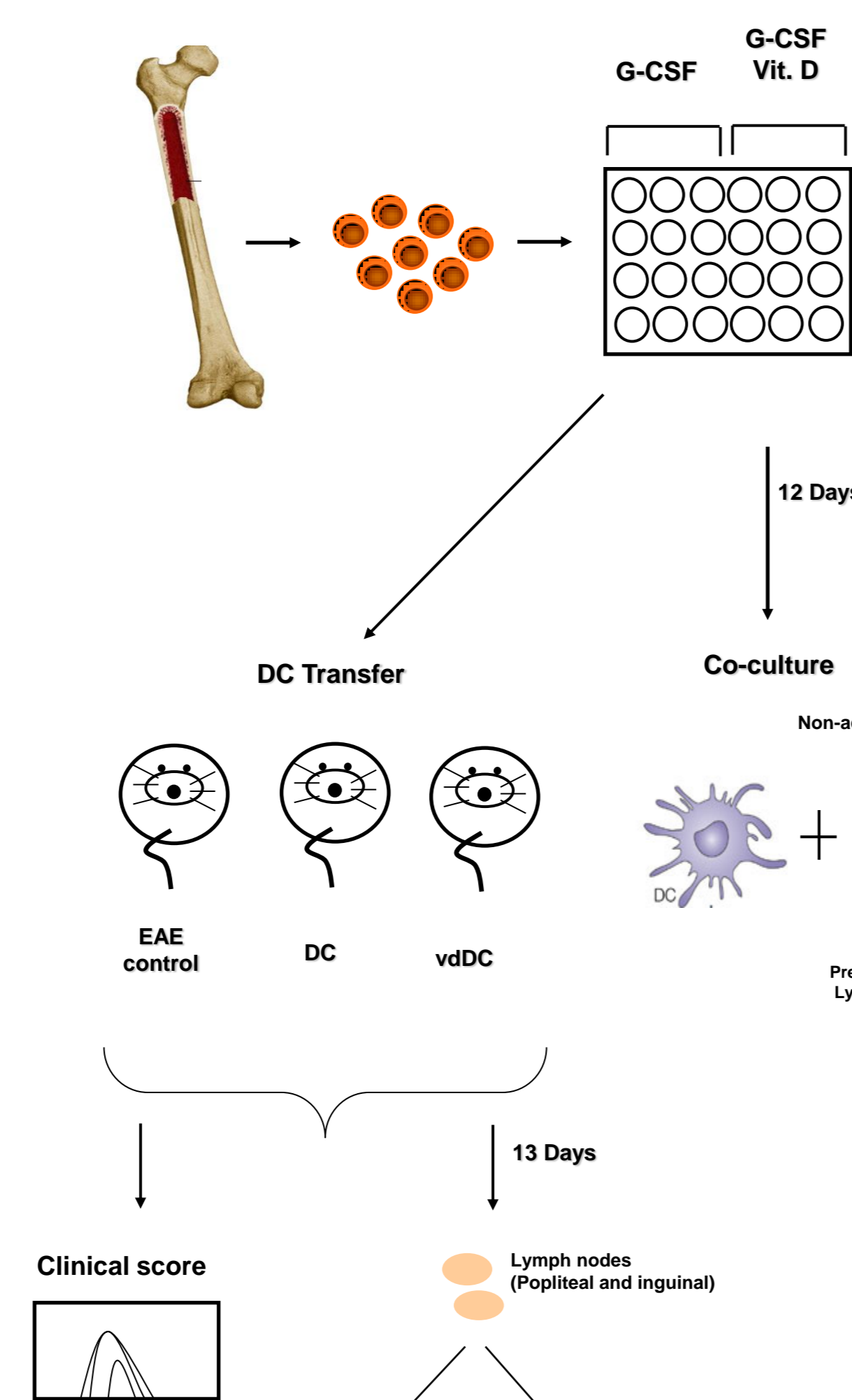
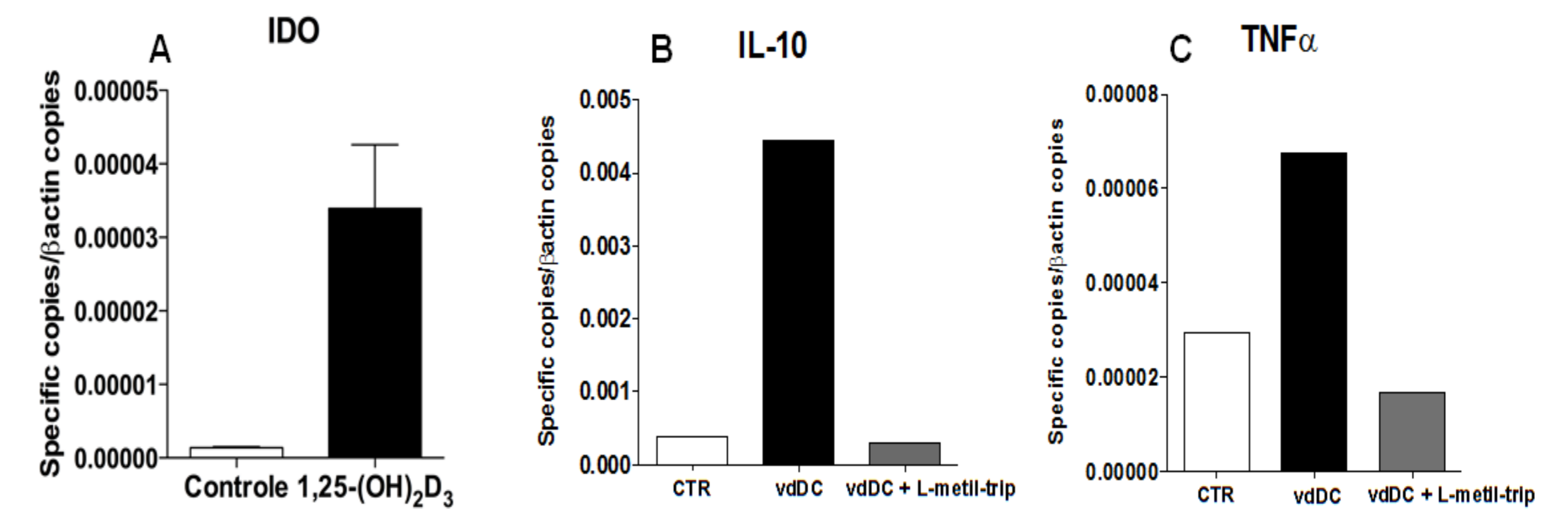


Figura 3

O tratamento com a forma ativa da vitamina D₃ aumenta significativamente a expressão de IDO (A). Além disso, quando o inibidor da IDO (L-metil-triptofano) foi adicionado ao meio de cultura das vdDCs, essas células perderam seu perfil tolerogênico, principalmente por causa da menor expressão de IL10 (B,C).



RESULTADOS

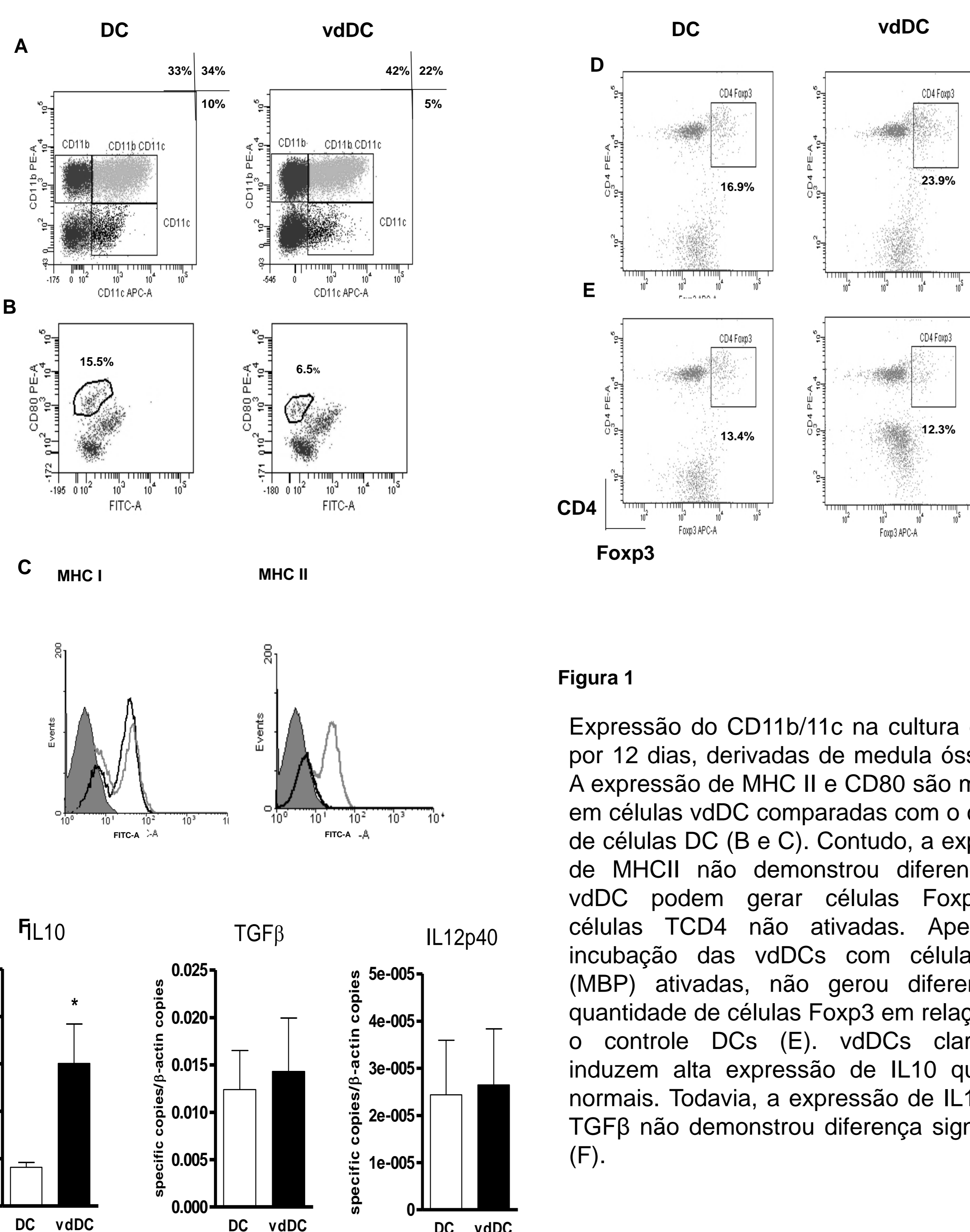


Figura 1

Expressão do CD11b/11c na cultura de DCs por 12 dias, derivadas de medula óssea (A). A expressão de MHC II e CD80 são menores em células vdDC comparadas com o controle de células DC (B e C). Contudo, a expressão de MHCII não demonstrou diferença (C). vdDC podem gerar células Foxp3+ de células TCD4 não ativadas. Apesar da incubação das vdDCs com células CD4 (MBP) ativadas, não gerou diferença na quantidade de células Foxp3 em relação com o controle DCs (E). vdDCs claramente induzem alta expressão de IL10 que DCs normais. Todavia, a expressão de IL12p40 e TGFβ1 não demonstrou diferença significativa (F).

DISCUSSÃO

Nossos resultados fortemente indicam que a vitamina D₃ age nas células dendríticas, o que leva a uma conversão e/ou expansão de células T Foxp3 reguladoras. A expansão das células T reguladoras pode ser explicada, pelo menos em parte, pelo aumento de células produtoras de IL10 e TGFβ₁ presentes no microambiente do linfonodo. Além disso, estudos prévios tem demonstrado que células T reguladoras também produzem altas quantias dessas citocinas, contribuindo para um microambiente rico em IL10 e TGFβ. Nós traçamos como hipótese que o microambiente gerado pelo tratamento com vitamina D mantém o estado tolerogênico das DCs, agindo como um mecanismo de feedback positivo (Figura 4). Nesse estudo também demonstramos, pela primeira vez, que a transferência adotiva de DCs produzidas na presença de vitamina D₃ (vdDCs) modula a resposta autoagressiva na EAE. A supressão da doença é decorrente da ativação de células Treg. O mecanismo no qual DCs tolerogênicas geram Tregs parece ser associado à expressão de IDO por essas células. Esses resultados podem elucidar vários mecanismos da ação da vitamina D₃ na EAE e abre a possibilidade para terapia baseada em DCs-tolerogênicas para desordens autoimunes.

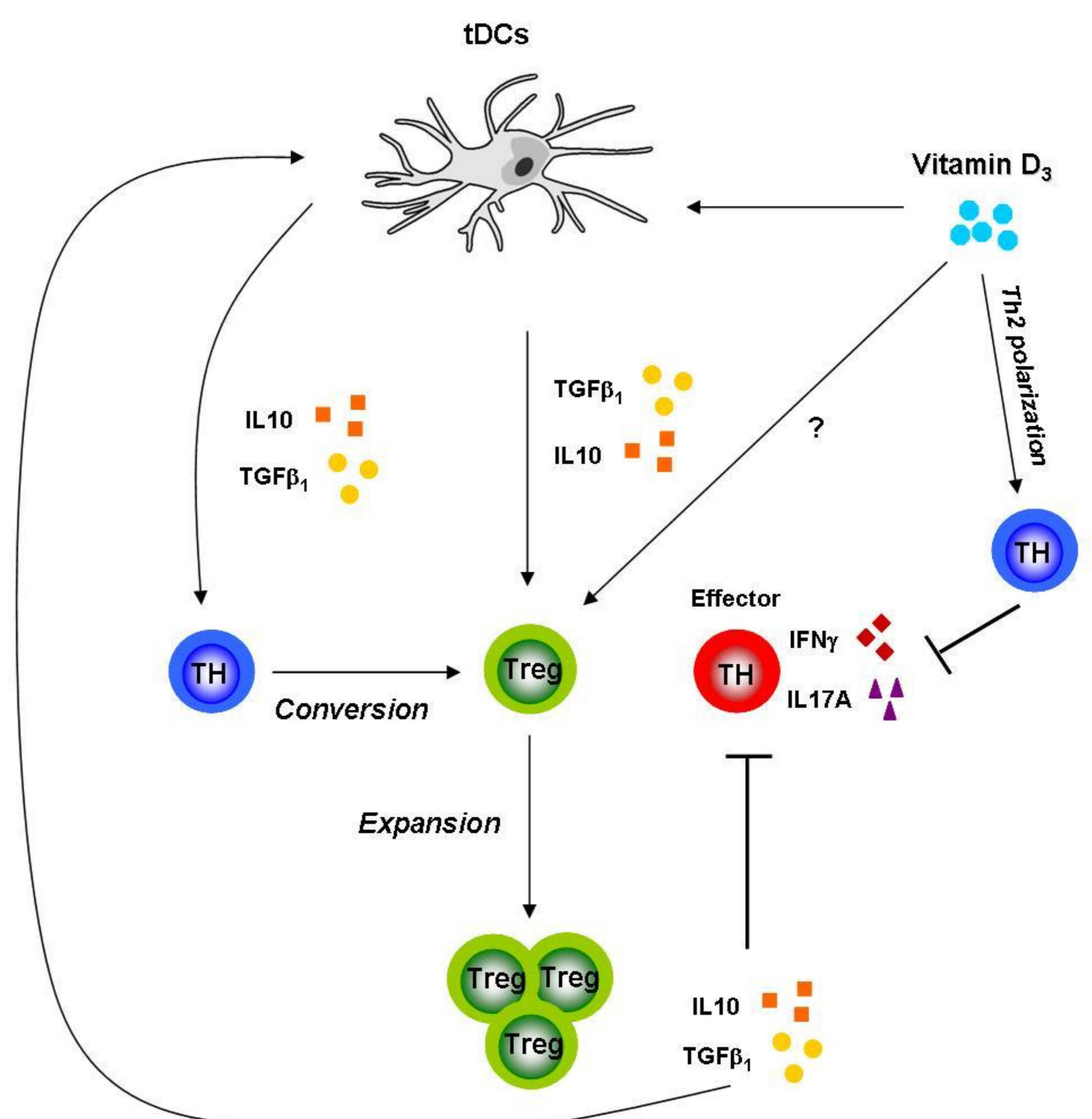


Figura 4

Financial support

