

O reumatologista revisita:

A reação inflamatória autoimune e possibilidades de seu controle (Parte 2)

MECANISMOS DE SINALIZAÇÃO CELULAR E RESPOSTA À INTERLEUCINA-6

A interleucina-6 é um agente mediador essencial para a regulação do sistema imune. Contudo, a produção excessiva desta citocina conduz à inflamação e seu processo inflamatório patológico. Portanto, a regulação da expressão e da atividade da IL-6 deve ser controlada por uma série de mecanismos extraordinariamente precisos, que tenham controle sobre a magnitude e a duração da resposta.

Após a clonagem do gene para IL-6 se descobriu o papel do receptor de IL-6 e sua função na sinalização celular. O receptor de IL-6 (IL-6R) tem uma organização realmente fora do comum, em comparação com outras proteínas receptoras. Contém 468 aminoácidos, repartidos em duas cadeias polipeptídicas: um receptor de IL-6 de 80 kDa e uma glicoproteína transdutora do sinal de 130 kDa (gp130). O receptor de 80 kDa tem 2 variantes: a forma transmembrana (com 30 aminoácidos) e a forma solúvel (com 82 aminoácidos). Enquanto IL-6R tem 6 sítios possíveis de N-glicosilação e 11 resíduos de cisteína, a região intracitoplasmática do receptor não tem domínio tirosina-quinase e não desempenha qualquer papel enzimático na transdução do sinal mediada por IL-6⁽¹⁰⁾.

Esta forma contém um fragmento intracitoplasmático curto, pelo qual pode ligar-se à gp130, antes da estimulação mediada pela ligação ao receptor de IL-6. Estima-se que esta ligação produza um complexo multimérico compreendido por 2 moléculas IL-6, 2 proteínas IL-6R e 2 proteínas gp130.

Para conhecer o mecanismo regulador da inflamação mais a fundo, tornou-se essencial descobrir a regulação da doença e a contribuição do receptor solúvel de interleucina-6 (sIL-6R). Este não apresenta domínios citoplásmicos, também é observado em condições normais no soro, nem no líquido sinovial.

Este receptor solúvel se comporta como agonista e é capaz de transmitir sinais por meio de um processo denominado transsinalização. Este processo ocorre porque

Wiliam Habib Chahade

Editor de Temas de Reumatologia Clínica

(Do trabalho de revisão "A interleucina-6 e a Inflamação" modificado, de J.L. Mateos do Departamento de Informação e Documentação Médica da Thomson Reuters, publicado em Drugs of Today, 44 (suppl. 1): 1-15, 2008).

o receptor solúvel pode formar um complexo estimulante após sua ligação à IL-6, que, por sua vez, associa-se à gp130, dando lugar a esta série de eventos celulares, denominados transsinalização. Embora a relevância deste mecanismo esteja emergindo *in vivo*, existem estudos que demonstram como sIL-6R exerce certa influência sobre a migração, a ativação e a apoptose de leucócitos.

Por outro lado, o mecanismo de transsinalização tem se mostrado fundamental no momento de explicar a regulação patológica de algumas doenças inflamatórias crônicas, como a artrite reumatoide ou a inflamação intestinal. A proteína gp130 tem um domínio transmembrana, que é responsável pela transdução do sinal através da membrana. Diferentemente de IL-6R, que possui um padrão de expressão bem definido, restrito aos hepatócitos e aos leucócitos, a proteína gp130 se expressa de forma generalizada em todos os tecidos, incluindo fibroblastos sinoviais, células endoteliais vasculares e osteoclastos, que integram o conjunto celular das articulações inflamadas em pacientes com artrite reumatoide. Por isso, gp130 também intervém na transdução do sinal de muitos outros componentes da família interleucina-6, dentre outras, LIF, OSM, CNTF, CT-1, IL-11. O fato da molécula gp130 ser utilizada por outras citocinas desta família permite explicar sua redundância funcional. Na presença de IL-6R solúvel, IL-6 pode estimular os fibroblastos sinoviais, as células do endotélio vascular e os osteoclastos, sendo esta molécula implicada de novo no processo inflamatório. Este fenômeno também tem sido observado em outros sistemas de citocinas (IL-3, IL-5,

G-CSF) em que haja o compartilhamento de uma mesma molécula receptora. Uma vez formado este complexo multimérico integrado por IL-6, IL-6R e gp130, precisamente este último produz um sinal de ativação para uma família de tirosina-quinases intracelulares de 120-140 kDa, denominada *Janus* (JAK). Trata-se de um grupo constituído de 4 proteínas (em mamíferos), que são conhecidas como JAK-1, JAK-2 e Tyk-2, amplamente expressas, ao passo que JAK-3 é principalmente de origem hematopoiética. As proteínas JAK, por sua vez, permitem a fosforilação de STAT3 (*signal transducer and activator of transcription*).

A translocação de STAT3 para o núcleo induz uma nova expressão gênica. Ou seja, transcorridos poucos minutos da ativação do receptor de interleucina-6 são produzidas a transfosforilação e a ativação de JAKs. Posteriormente, as porções terminais de gp130 são fosforiladas, provocando a mediação do recrutamento das proteínas STAT3, formando-se um dímero. STAT3 é ativado no citoplasma, mas o local em que realmente exerce sua função é o núcleo. A dimerização de STAT3 ativada permite internalizá-la no núcleo celular. Uma vez no núcleo, STAT3 favorece a transcrição de numerosos genes, incluindo aqueles que codificam para a síntese de proteínas que intervêm na fase aguda da doença. Além de STAT3, existem outros 6 genes STAT, todos localizados em 3 *clusters* cromossômicos, sugerindo que a família STAT tenha evoluído a partir de fenômenos de duplicação gênica. A regulação da síntese de STAT não parece desempenhar um papel importante na regulação do sinal mediado por citocinas. Entretanto, a atividade STAT é regulada principalmente em consequência das modificações pós-transducionais que ocorrem na proteína. As proteínas STAT são ativadas através dos receptores de citocinas, como é o caso da ativação de STAT3, que é produzida a partir de qualquer um dos membros da família IL-6. De fato, todas as proteínas STAT apresentam uma estrutura terciária altamente preservada e dispõem de um domínio comum SH2, através do qual se ligam ao receptor fosforilado da tirosina-quinase. Conforme mencionamos, IL-6 é sintetizada em um amplo número e tipos celulares e, assim, seu receptor é expresso igualmente em diversas células. Estima-se que existam centenas de milhares de moléculas IL-6R presentes em cada célula. Contudo, as células do mieloma múltiplo em seres humanos expressam uma faixa de 10 - 20 - 103 receptores de IL-6, um achado sugestivo de que a interleucina-6 também possa funcionar como um fator de crescimento nos mielomas múltiplos e, portanto, colaborar para a formação de outros tipos de tumores. Além disso,

os linfócitos T e B também expressam receptores para interleucina-6, embora a regulação da expressão de IL-6R apresente diferenças entre ambos os tipos de células. Os sistemas de sinalização de IL-6 são regulados por um mecanismo de *feedback* negativo, pelos supressores de sinalização de citocinas (SOCS, *Suppressors of Cytokine Signalling*) e pelas proteínas inibidoras das proteínas STATs ativas (PIAS). A interação IL-6/IL-6R ativa a STAT3, que estimula a expressão do gene de SOCS-1. A molécula SOCS-1 liga-se, então, ao complexo IL-6/IL-6R através de JAK, atuando como um regulador negativo da transdução dos sinais, mediada por gp130, SOCS-1, SOCS-2 e SOCS-3 são induzidos por várias citocinas, incluindo IL-6, IFN- α , IL-4 e G-CSF e todas geram a mesma resposta: a inibição da via JAK/STAT. SOCS-1 interage diretamente com JAKs e, portanto, inibe sua atividade catalítica (suprime a transdução dos sinais, mediada por gp130), ao passo que SOCS-3 inibe a sinalização ao ligar-se diretamente ao receptor de interleucina-6. Trabalhando em modelos em animais experimentais se observou como os ratos com deficiência de expressão de SOCS-1 mantinham intacto o mecanismo regulador do sinal de IL-6, deixando evidente que SOCS-3 é considerado um inibidor crucial do sinal de IL-6, *in vivo*. A família PIAS é composta de um grupo de proteínas de expressão constitutiva e tem um efeito regulador negativo das STATs. PIAS-3 é associada especificamente à proteína STAT-3 ativada, mas não se associa à STAT-1, levando a um bloqueio de todos os genes (proteínas da fase aguda) cuja transcrição seja mediada por STAT-3. PIAS-3 é uma molécula especialmente bem conhecida, devido a seu papel inibidor da sinalização mediada por IL-6 na linhagem M1 de leucemia mieloide em ratos. A expressão constitutiva das proteínas PIAS torna seu papel fisiológico muito diferente do papel atribuído às proteínas SOCS, cuja indução por citocinas é um processo transitório. Contudo, a relevância funcional de qualquer uma dessas 2 famílias de proteínas ainda precisa ser pesquisada.

Os receptores de citocinas são proteínas transmembranas e, portanto, seguem o modelo típico de proteínas de transporte celular.

São sintetizados no retículo endoplasmático, aglomeram-se formando vesículas e são transportados ao complexo de Golgi, onde são processados, antes de serem finalmente transferidos para a membrana citoplasmática. Contudo, os receptores de citocinas não se encontram ligados permanentemente à superfície celular, pois também experimentam um fenômeno de endocitose. Retirar rapidamente essas citocinas inflamatórias da cir-

culação é uma estratégia essencial para manter o equilíbrio homeostático e não atingir uma situação potencialmente classificada como patológica.

O mecanismo molecular de interiorização de IL-6 foi estudado detalhadamente na década de 1990. Estudos de ligação genética realizados em hepatócitos de ratos e na linhagem tumoral hepática HepG2 revelaram a expressão de 4.500 e 2.000 receptores de IL-6, respectivamente, de afinidade muito alta, tanto nas células hepáticas normais quanto no hepatoma, embora com algumas constantes muito elevadas de dissociação.

Assim, após a ligação de IL-6, este é interiorizado muito rapidamente (30-60 min), dando lugar à depleção quase total dos sítios de ligação à IL-6 na superfície celular.

Desse modo, IL-6 provoca uma estimulação dos sítios de ligação. A síntese de proteínas *de novo* é um processo necessário para substituir todos os sítios de ligação à IL-6, para que, depois da interiorização, receptor e ligante talvez sejam degradados no compartimento lisossômico. Levantou-se a hipótese de que esta endocitose de IL-6 e de seu receptor seja um mecanismo de inibição, portanto, o domínio intracelular de gp130 é crucial neste processo, evitando-se, assim, um acúmulo excessivo de interleucina-6.

Alternativamente, também foi postulado que gp130 possa ser separada do complexo IL-6/IL-6R e reciclada novamente para a superfície da célula em que este multímero se expresse.

Alguns trabalhos mostram que a endocitose não está acoplada à via JAK/STAT. Além disso, anticorpos monoclonais de efeito agonista ou antagonista dirigidos contra gp130 se interiorizam, seguindo cinéticas comparáveis. Este resultado evidenciou que a endocitose de gp130 não é mediada por qualquer outro ligante, descartando, assim, a participação do complexo JAK/STAT. De fato, na maioria dos sistemas, a ativação da família STAT é transitória.

INTERLEUCINA-6 E RESPOSTA IMUNOINFLAMATÓRIA

IL-6 influi muito significativamente no curso da inflamação nos seres humanos. Existem evidências de como IL-6 é capaz de mediar efeitos pró-inflamatórios, que incluem a indução da síntese de moléculas de adesão intercelular e o recrutamento de leucócitos, mas também, de intervir na regulação de processos anti-inflamatórios, como a supressão de citocinas pró-inflamatórias, o fator de necrose tumoral TNF-alfa e IL-1. Uma situação de equilíbrio entre ambos os efeitos da interleucina-6 influirá de-

cisivamente no desenvolvimento da resposta imuno-inflamatória e da doença associada. Concretamente, considera-se que a transinização mediada pela formação do complexo IL-6/sIL-6R possa favorecer o recrutamento de monócitos, uma etapa fundamental na transição da fase aguda para a fase crônica.

INFILTRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS

Em termos gerais, a chegada dos neutrófilos é a primeira reação, chamada *resposta inflamatória*, através da qual as células e as moléculas da imunidade inata se reúnem no sítio afetado. A aglomeração de neutrófilos em um determinado tecido é induzida por mediadores inflamatórios. Estes mediadores – interleucina-6, em particular – causam mudanças nas moléculas de adesão expressas pelo endotélio vascular dos capilares sanguíneos no sítio de inflamação e a seu redor. Afirma-se, então, que o endotélio vascular está ativado. Os mediadores inflamatórios também induzem a expressão de moléculas complementares de adesão nos neutrófilos circulantes. Estas são as mudanças que possibilitam que os neutrófilos do sangue fiquem aderidos ao endotélio ativado e cheguem a infiltrar-se no tecido inflamado. Com base nos dados apresentados anteriormente, durante um episódio inflamatório agudo que é resolvido com êxito, o recrutamento inicial de leucócitos passa necessariamente por um influxo inicial de neutrófilos, que, depois, serão eliminados e substituídos por outra população de células mononucleares. Este padrão de infiltração depende da transinização de IL-6. Embora IL-6 não afete a taxa inicial de infiltração de neutrófilos, existem dados coletados na literatura médica, de pesquisas desenvolvidas em modelos animais (ratos com deleção [KO] para IL-6), que demonstram que IL-6 bloqueia o acúmulo de neutrófilos nos sítios da inflamação.

Assim, o controle que IL-6 exerce sobre a infiltração de neutrófilos é passível de inibição. Visto que as células do estroma são fenótipo gp130+IL6-R- (não apresentam o receptor tipo IL-6R), a atividade biológica da interleucina-6 é governada pela concentração local da forma solúvel de IL-6R. Um aumento significativo nos níveis de sIL-6R está correlacionado ao grau de infiltração de neutrófilos e a sua ativação *in vitro*.

Em humanos, mediada por PCR, quimiocinas inflamatórias (um grande grupo de proteínas que intervêm na atração de leucócitos) e outros agentes quimiotáticos, promovem o deslocamento de IL-6R. O desenvolvimento desse processo de recrutamento de neutrófilos conduz à transinização de IL-6 nas células do tecido resi-

dente e direciona a mudança para o recrutamento de células mononucleares⁽⁴⁰⁾. A esse respeito, estudos *in vitro* confirmam que IL-6 é capaz de induzir os TNF e IL-1, pelo bloqueio dos receptores das quimiocinas CXCL1 (ativação de neutrófilos) e CXCL8 (IL-8, responsável pela mobilização, ativação e degranulação dos neutrófilos). Entretanto, IL-6 ativa diretamente a liberação das quimiocinas CXCL5 e CXCL6 (atração de linfócitos). Recentemente, deu-se destaque especial para a importância do papel regulador de IL-6 na resposta inflamatória, ao se estudar um modelo *in vivo* de infecção bacteriana por *Staphylococcus aureus*. Concretamente, a reconstituição genética de ratos IL-6^{-/-} (previamente com deleção para IL-6) reduziu significativamente o índice de mortalidade, de forma que essa evolução transcorreu simultaneamente a diminuições na neutrofilia e da bacteremia. É possível que o controle de IL-6 nesse tipo de atividades tenha uma importância certamente muito particular durante o desenvolvimento do choque séptico, em que já se comprovou o papel protetor dessa citocina. Contudo, o sucesso dessa resposta, nessas condições, também dependerá do desenvolvimento de uma resposta imune adquirida. Nesse ponto, mais uma vez, IL-6 desempenha uma função predominante, conforme já foi demonstrado *in vivo*. A transsinalização de IL-6 afeta a evolução da inflamação à medida que favorece o recrutamento de células mononucleares. Para que um processo inflamatório seja benéfico, a reação mais precoce deve ser aguda, permitindo a eliminação do agente responsável pelo dano em pouco tempo e dentro da região afetada; tudo isso permitirá a indução da resposta imune. A transição no acúmulo de neutrófilos para monócitos leva a uma destruição eficiente desses agentes patogênicos, por meio da ação combinada do poder destrutivo e fagocitário dos neutrófilos e dos macrófagos, que intervêm durante a resposta inflamatória. Esta progressão de eventos não é direcionada somente para a infiltração das células mononucleares, mas também para o desaparecimento dos neutrófilos.

Os neutrófilos são um tipo de células que desempenham um papel central na defesa do organismo diante de uma ferida ou de uma infecção, por sua capacidade de sintetizar metabólitos oxidados e de liberar diversas enzimas. Contudo, esses agentes podem ser tóxicos para os tecidos circundantes aparentemente normais e chegar a induzir uma doença de natureza inflamatória. Para evitar isso, existe um mecanismo rápido de inibição. Ou seja, além da transição da imunidade natural para a imu-

nidade adquirida ser produzida pelo controle da atração de leucócitos exercido pelas quimiocinas, a ativação da apoptose de leucócitos, inclusive dos neutrófilos, também é bem-sucedida. Qualquer alteração dessa resposta apoptótica pode atrasar a destruição dos neutrófilos e reter monócitos ativos no interior do tecido afetado. Isso se torna evidente no líquido sinovial dos pacientes com artrite reumatóide, em que os linfócitos T isolados da articulação inflamada mostram uma expressão excessiva de alguns reguladores antiapoptóticos, como o Bcl-xL.

Atualmente, há numerosos dados que apontam a interleucina-6 como um dos principais reguladores da apoptose de leucócitos.

Estudos *in vitro* realizados em ratos demonstram que IL-6 é capaz de impedir que os linfócitos T entrem em apoptose, evitando que essas células sofram uma morte celular não fisiológica. Contudo, ao contrário dessa função de resgate, a transsinalização (complexo IL-6/sIL-6R) facilita a apoptose dos neutrófilos. Ainda não se sabe como IL-6 pode regular simultaneamente estes sinais pró ou antiapoptóticos.

Os neutrófilos que entram em apoptose expressam uma nova série de antígenos de membrana, que são reconhecidos por proteínas receptoras situadas sobre a superfície celular dos macrófagos, promovendo a fagocitose.

A fagocitose desses neutrófilos polimorfonucleares que entraram em apoptose favorece a liberação de TGF- β (fator transformador de crescimento beta) e da proteína quimiotática dos monócitos MCP-1 (quimiocina produzida pelas células T ativadas que atrai macrófagos) e a diminuição da produção de IL-8, provocando a ativação das quimiocinas que atraem os monócitos. À medida que ocorre a depleção de neutrófilos no sítio da inflamação, os monócitos saem da corrente circulatória, primeiro acumulando-se e, depois, diferenciando-se em macrófagos inflamatórios, que terminam por completar a fagocitose e destruir os agentes lesivos. Após alguns dias, monócitos e macrófagos migram para os linfonodos locais. Durante esse processo de migração, os monócitos são finalmente diferenciados em células dendríticas. Estas células já podem apresentar os peptídeos antigênicos aos linfócitos e, assim, contribuir para a geração da resposta imune.

As referências bibliográficas serão publicadas no final da 3ª e última parte.