

Inflamação, citocinas, proteínas de fase aguda e implicações terapêuticas

INFLAMAÇÃO

Infeções e injúria tecidual induzem uma cascata complexa de eventos fisiológicos conhecida como resposta inflamatória, que promove proteção aos tecidos, restringindo os danos no local da infecção ou injúria, mas podendo ter efeitos deletérios quando de forma exacerbada. Em geral, uma resposta inflamatória aguda é de curta duração e, além de uma reação local, ocorre também uma reação sistêmica, chamada de resposta de fase aguda (ver a seguir). A resposta local se inicia quando o dano tecidual e endotelial desencadeia vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular. Com o aumento da permeabilidade vascular ocorre extravasamento de leucócitos para os sítios inflamados. Em estágios iniciais da inflamação o tipo celular predominante é o neutrófilo, em fases mais tardias monócitos e linfócitos também migram para o local, amplificando o processo inflamatório. Vários mediadores participam ativamente da resposta inflamatória: 1) quimiocinas realizam quimiotaxia de leucócitos; 2) enzimas plasmáticas, como bradicinina e fibrinopeptídeos, aumentam a permeabilidade vascular; 3) plasminina degrada coágulos em produtos quimiotáticos e ativa proteínas do sistema complemento e seus derivados, como anafilatoxinas que induzem degranulação de mastócitos e conseqüente liberação de histamina, e opsoninas que induzem a opsonização de microrganismos, facilitando a fagocitose; 4) mediadores lipídicos como tromboxanos, prostaglandinas e leucotrienos participam do processo de vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular; 5) citocinas (IL-1, IL-6 e TNF- α) induzem efeitos locais, tais como indução da expressão de moléculas de adesão e de quimiocinas, facilitando a migração de leucócitos, e efeitos sistêmicos como a indução de proteínas de fase aguda, levando a febre.

Em alguns casos o processo inflamatório agudo não é completamente resolvido, levando a inflamação crônica, como é o caso de doenças auto-imunes ou infecções causadas por microrganismos que conseguem evadir a

Angelina M. B. Bilate

Doutora em Imunologia pelo Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da USP. Pós-doutoranda do Laboratório de Imunologia do InCor. Tema da tese: Patogênese da cardiomiopatia chagásica crônica. Seu projeto atual: Análise proteômica para identificação de novos marcadores moleculares envolvidos na progressão da cardiomiopatia chagásica crônica.

resposta imune. Esse tipo de inflamação acontece quando macrófagos e células T são constantemente ativados, levando ao seu acúmulo nos sítios de lesão e significativo dano tecidual. As citocinas liberadas pelos macrófagos cronicamente ativados estimulam a proliferação de fibroblastos, levando ao aumento da produção de colágeno que culmina na fibrose, característica das inflamações crônicas.

PROTEÍNAS DE FASE AGUDA

A reação inflamatória é acompanhada por uma resposta sistêmica conhecida por resposta de fase aguda. Esta resposta é caracterizada por febre, produção de diversos hormônios, leucocitose e produção de proteínas de fase aguda pelo fígado. Citocinas, como IL-1, IL-6, TNF- α , LIF (*leukemia inhibitory factor*) e oncostatina M (OSM) são produzidas no local de inflamação e desempenham papel crucial na resposta de fase aguda, induzindo a produção de proteínas de fase aguda pelos hepatócitos. O pico de produção das proteínas de fase aguda geralmente ocorre entre 12 e 24 horas após o início da resposta inflamatória aguda. Entre as proteínas de fase aguda, destaca-se a proteína C-reativa (PCR), uma vez que seu nível sérico é aumentado aproximadamente 1.000 vezes durante a inflamação aguda. Esta proteína se liga a uma variedade de patógenos, ativa as proteínas do sistema complemento que resulta na deposição de C3b na superfície do microrganismo. Este processo termina por facilitar a fagocitose dos patógenos mediada por fagócitos que expressam receptor para C3b.

CITOCINAS

Citocinas são proteínas de baixo peso molecular produzidas por diferentes tipos celulares do sistema imune. A produção de citocinas é desencadeada quando as células são ativadas por diferentes estímulos, como agentes infecciosos, tumores ou estresse. As citocinas atuam na comunicação entre as células, promovendo a indução ou regulação da resposta imune. As principais características das citocinas são:

1. Uma mesma citocina pode ser produzida por mais de um tipo celular;
2. Uma mesma citocina pode ter diferentes efeitos, dependendo das condições do microambiente – pleiotropismo;
3. Diferentes citocinas podem exercer a mesma função – redundância;
4. As citocinas podem potencializar ou inibir o efeito de outras citocinas – sinergismo ou antagonismo, respectivamente;
5. A maioria das citocinas exerce efeitos parácrinos (ação sobre células presentes nas proximidades das células produtoras da citocina) ou efeitos autócrinos (ação sobre o tipo celular que a produz). Além disso, algumas citocinas exercem efeitos endócrinos, agindo sobre células presentes em outros locais que não os da célula produtora daquela citocina.

Atualmente, já foram descritas mais de 200 diferentes citocinas, pertencentes às famílias de hemato-poietinas, interferons, quimiocinas e TNF. Originalmente, as citocinas e quimiocinas eram nomeadas de acordo com a sua função (como fator de crescimento de células T, agora chamada interleucina-2 (IL-2); proteína quimio-atraente de macrófagos – MCP-1, *macrophage chemo-attract protein-1*, agora chamada de CCL2), mas devido às suas ações pleiotrópicas, a nomenclatura mudou para números para facilitar o entendimento.

O efeito das citocinas se dá após a ligação ao seu receptor específico expresso na superfície da célula-alvo, desencadeando a transdução de sinais no interior da célula. As famílias de receptores são:

1. Superfamília das imunoglobulinas (Ig);
2. Receptores classe I (também conhecidos como família de receptores das hematopoietinas);
3. Receptores classe II (também conhecidos como família de receptores de interferons);
4. Membros da família de receptores de TNF;
5. Receptores de quimiocinas.

A maioria dos receptores de citocinas é composta por subunidades distintas: uma cadeia α envolvida na ligação a citocina e na transdução de sinais e outra cadeia β envolvida na cascata de sinalização. A cadeia α é

associada a uma família de proteínas tirosinas quinases chamada família Janus quinase (JAK, *Janus kinase*), mas a atividade enzimática ocorre somente na presença da citocina. A ligação da citocina induz a associação (dimerização) das cadeias α e β e a ativação das JAKs. A ativação das JAKs leva a fosforilação de resíduos de tirosina que gera sítios para a ligação dos fatores de transcrição STAT (*signal transducers and activators of transcription*). Atualmente já foram descritas seis diferentes STATs envolvidas em vias de sinalização de diversas citocinas. Após a fosforilação mediada por JAK de um resíduo específico de tirosina, STAT é dissociado das subunidades do receptor e é então translocado da membrana para o núcleo onde induz a transcrição de genes específicos. Por exemplo, STAT1 ativa a transcrição do RNAm de IFN- γ enquanto a STAT6 ativa IL-4. O tipo de estímulo determina o tipo de STAT a ser ativado e, conseqüentemente, a citocina a ser produzida. Como exemplo, antígenos de helmintos e alérgenos ativam STAT6 e a produção de IL-4 e antígenos de patógenos intracelulares geralmente ativam STAT4 e STAT1 que induzem a produção de IL-12 e IFN- γ , respectivamente.

Embora diversos tipos celulares possam secretar citocinas, células T, macrófagos e células dendríticas são as principais fontes produtoras de citocinas. Entre as atividades fisiológicas das citocinas, se destacam a ativação da resposta imune celular e humoral, regulação da hematopoiese e controle da proliferação e diferenciação celular (Na Tabela 1 estão descritas as funções das principais citocinas). Durante a resposta imune celular adaptativa ocorre intensa produção de citocinas, porém vale ressaltar que a produção de citocinas não depende do antígeno, ou seja, não é antígeno-específica, portanto, as citocinas agem sobre qualquer tipo celular que tenha o receptor apropriado.

As citocinas desempenham papel fundamental na diferenciação de células T e na ativação dos diferentes subtipos de linfócitos T. A ativação de subpopulações de células T resulta na secreção de diversas citocinas que irão determinar o perfil da resposta imune. A diferenciação de células T CD4+ em linfócitos T *helper* tipo 1 (Th1) ocorre na presença de IL-12 e IFN- γ que irão determinar um perfil inflamatório. A diferenciação em linfócitos T *helper* tipo 2 (Th2) ocorre na presença de IL-4 e determina um perfil antiinflamatório. Atualmente, outras subpopulações de linfócitos T foram descritas de acordo com a sua atividade e padrão de produção de citocinas: linfócitos Th3, caracterizados pela produção de TGF- β , associados a um perfil regulador da resposta imune; linfócitos T CD4+ CD25+ produtores de TGF- β e IL-10, também chamados de células T reguladoras (Treg), devido a sua capacidade de supressão da resposta imune; e

Tabela 1 - Principais citocinas, suas funções e implicações terapêuticas

Citocina	Células produtoras	Alvos e efeitos	Implicação terapêutica
1. Citocinas relacionadas à resposta imune inata			
TNF- α	Macrófagos, células dendríticas, células endoteliais	Vasculatura (inflamação); fígado (indução de proteínas de fase aguda); caquexia; morte celular; ativação de neutrófilos	Anti-TNF- α (Infliximab) e sTNFR:Fc (Etanercept), doenças auto-imunes (em uso)
IL-1	Monócitos, macrófagos, células endoteliais e epiteliais	Vasculatura (inflamação); hipotálamo (febre); fígado (indução de proteínas de fase aguda)	IL1Ra, choque séptico (modelos experimentais); artrite reumatóide (ensaio clínico)
IL-12	Macrófagos, células dendríticas	Ativa células NK, promove a diferenciação de células Th1	IL-12, linfomas; anti-IL-12, doença de Crohn (ensaios clínicos)
IL-6*	Macrófagos, células endoteliais, fibroblastos	Fígado (induz proteínas de fase aguda), promove proliferação de células B e secreção de anticorpos, inibe diferenciação de células Treg	IL-6, câncer (ensaio clínico)
IFN- α	Macrófagos	Induz resposta antiviral, aumenta a expressão de MHC classe I e ativa células NK	IFNrec, hepatite e câncer (em uso)
IL-23	Macrófagos	Promove a diferenciação de células Th17	Anti-IL-23, encefalomielite auto-imune (modelo experimental)
2. Citocinas relacionadas à resposta imune adaptativa			
IL-2	Células T	Induz proliferação de células T e B, ativação de células NK e pode promover morte induzida por ativação	Anti-IL2R (anti-TAC), rejeição de transplantes (modelos experimentais)
IFN- γ	Células Th1, células T CD8+, células NK	Ativa macrófagos, induz a expressão de MHC classe I e classe II, aumenta apresentação de antígenos	Actimmune, doença granulomatosa crônica, osteopetrose (em uso)
IL-5*	Células Th2	Promove diferenciação e ativação de eosinófilos	Anti-IL-5, síndrome hipereosinofílica (ensaio clínico)
IL-4	Células Th2, mastócitos	Promove a diferenciação de células Th2 e mudança de classe de anticorpos para IgE	IL-4, leucemia (ensaio clínico)
IL-17	Células Th17, neutrófilos	Promove inflamação induzindo a produção de citocinas inflamatórias como IL-6, IL-1 e TNF- α em células endoteliais	Anti-IL-17, doenças auto-imunes (modelos experimentais)
IL-10	Macrófagos, células dendríticas, linfócitos Treg	Inibe proliferação de células Th1	IL-10, psoríase e hepatite C (ensaio clínico)
TGF- β	Células T, macrófagos, fibroblastos	Inibe proliferação de células T e B, inibe ativação de macrófagos, promove mudança de classe de anticorpos para IgE e diferenciação de células Treg	TGF- β , câncer (ensaio clínico); anti-TGF- β , leishmaniose (modelo experimental)
3. Citocinas relacionadas à hematopoiese (hematopoiéticas)			
Eritropoetina	Hepatócitos	Produção de eritrócitos	Epogen, estimula produção de eritrócitos (em uso)
IL-11	Macrófagos, células endoteliais, fibroblastos	Produção de plaquetas	Neumega, estimula produção de plaquetas (em uso)
GM-CSF	Células Th1 e Th2, macrófagos e mastócitos	Produção de granulócitos e macrófagos, maturação e ativação de células dendríticas	Leukine, estimula a produção de células mielóides após transplante de medula óssea (em uso)
G-CSF	Macrófagos, células endoteliais, fibroblastos	Produção de neutrófilos	Neupogen, reduz o risco de infecção em pacientes com câncer submetidos à quimioterapia (em uso)

IL, *interleukin*; IFN, *interferon*; TNF, *tumor necrosis factor*; TGF, *transforming growth factor*; G-CSF, *granulocyte colony stimulating factor*; GM-CSF, *granulocyte and macrophage colony stimulating factor*; IL2R, receptor de IL-2; sTNFR:Fc, receptor solúvel de TNF conjugado a porção Fc de IgG; Th1, células T *helper* tipo 1; Th2, células T *helper* tipo 2, Th17, células T *helper* produtoras de IL-17, Treg, células T reguladoras; IFNrec, interferon recombinante; IL1Ra, antagonista do receptor de IL-1. *IL-6 e IL-5 também são consideradas citocinas hematopoiéticas. Adaptada de Goldsby et al., 2000. Immunology W.H. Freeman and Company, New York, USA, 2000. 4 ed. 670p.

células Th17, caracterizadas pela produção de IL-17 e associadas a um perfil inflamatório.

Para a diferenciação das subpopulações de células T, as citocinas utilizam diferentes mecanismos moleculares que irão regular o processo de diferenciação. As citocinas produzidas pelos linfócitos Th1 inibem a produção das citocinas Th2 e vice-versa, por um mecanismo chamado regulação cruzada. Essa regulação cruzada explica a relação inversa frequentemente observada entre produção de anticorpos, estimulada pelos linfócitos Th2, e imunidade celular, desencadeada pelos linfócitos Th1. Recentemente, diversos mecanismos de regulação cruzada foram elucidados: 1) a produção de IL-4 faz com que as células Th2 se tornem menos responsivas a sinalização por IFN- γ e vice-versa; 2) modificações epigenéticas – a ativação do gene de IL-4 induz modificações no DNA da célula Th2 que a impede de ativar o gene do IFN- γ , e ao mesmo tempo, a estimula a produzir mais IL-4. IFN- γ atua da mesma maneira; 3) modificações transcricionais – a expressão do fator de transcrição T-bet induz a diferenciação das células T em Th1 e suprime a diferenciação em Th2, enquanto a expressão do fator de transcrição GATA-3 induz a diferenciação das células Th2 e suprime a diferenciação das Th1. Já foi mostrado que na presença de IFN- γ , as células aumentam a expressão de T-bet e diminuem a expressão de GATA-3, e na presença de IL-4, ocorre o inverso. Já a citocina TGF- β inibe a expressão de T-bet e GATA-3 e induz a expressão de FoxP3, um outro fator de transcrição envolvido na diferenciação de células T reguladoras (Treg). Com isso, inibe a diferenciação de Th1 e Th2, favorecendo a diferenciação de Tregs.

Com os avanços da microscopia com células vivas é possível visualizar dinamicamente a secreção de citocinas durante a sinapse imunológica, processo caracterizado por modificações moleculares e estruturais no sítio de contato entre linfócitos T e células apresentadoras de antígenos (APC, *antigen presenting cell*). Linfócitos T *helper* ativados produzem várias citocinas e algumas, como IL-2 e IFN- γ , são secretadas diretamente na sinapse imunológica, em direção a APC, enquanto outras, como TNF- α e CCL3, são secretadas de maneira multidirecional. Esses variados padrões de secreção de citocinas têm implicação direta no curso de uma resposta inflamatória. A secreção restrita a região da sinapse vai atuar diretamente na comunicação célula-célula, podendo estar relacionada à especificidade da resposta imune adaptativa. Já a secreção multidirecional pode estar relacionada ao recrutamento de outras células inflamatórias, permitindo a manutenção do processo inflamatório. Portanto, o tipo de resposta imune não depende apenas do tipo de citocina produzida, mas

também de como ela é secretada no microambiente.

Como dito anteriormente, as citocinas podem ser induzidas por uma gama de estímulos. Entre eles, estão os agentes infecciosos. Proteínas, lipídeos e açúcares presentes na superfície de diversos microrganismos induzem a secreção de várias citocinas, que irão desencadear uma resposta inflamatória ou alérgica. Entretanto, geralmente a produção de citocinas durante as infecções é exacerbada e acaba por desencadear efeitos deletérios ao hospedeiro. Como exemplo, o choque séptico é resultado da produção descontrolada de TNF- α e IL-1 induzida por endotoxinas ou superantígenos presentes na parede de bactérias gram-negativas ou gram-positivas, respectivamente. Por outro lado, doenças inflamatórias crônicas são desencadeadas devido à persistência do estímulo inflamatório, como é o caso das doenças auto-imunes, em que a presença de um auto-antígeno constantemente reconhecido por linfócitos T dispara a produção contínua de citocinas como TNF- α e IFN- β . Essa produção contínua acaba por perpetuar o processo inflamatório que contribui para o agravamento das lesões auto-imunes. Um outro exemplo de inflamação crônica é a infecção por micobactéria que induz a formação de granuloma, uma massa celular de macrófagos e linfócitos cronicamente ativados.

QUIMIOCINAS

As quimiocinas são pequenos polipeptídeos (90-130 resíduos de aminoácidos) que fazem parte de um subgrupo de citocinas. As quimiocinas controlam a adesão, quimiotaxia e ativação de vários tipos de leucócitos. As quimiocinas desempenham papel fundamental na resposta inflamatória, recrutando células inflamatórias para o local da lesão por quimiotaxia. As quimiocinas também controlam e atuam em diversos processos biológicos como hematopoiese, angiogênese e metástase de tumores.

Mais de 50 quimiocinas e pelo menos 15 receptores já foram descritos. As quimiocinas possuem quatro resíduos conservados de cisteínas e são classificadas de acordo com a posição de dois desses resíduos: 1. subgrupo C-C, onde os resíduos são contíguos; 2. subgrupo C-X-C, onde os resíduos são separados por um outro aminoácido. A ação das quimiocinas é mediada por receptores transmembranais acoplados a proteína G. Os receptores de quimiocinas são classificados da mesma maneira que as quimiocinas: 1. receptores CC (CCRs) que reconhecem quimiocinas CC; 2. receptores CXC (CXCRs) que reconhecem quimiocinas CXC. A maioria dos receptores se liga a mais de uma quimiocina e uma mesma quimiocina pode ligar-se a mais de um

receptor. Após a ligação da quimiocina em seu receptor, ocorre a ativação de proteínas G, iniciando uma cascata de transdução de sinais que gera segundos mensageiros como AMPc (adenosina monofosfato cíclico), IP3 (inositol trifosfato) e cálcio. As vias de transdução de sinais ativadas pelas quimiocinas promovem a ativação de integrinas nos leucócitos, levando a adesão à parede do endotélio, geração de radicais livres por fagócitos, liberação de histamina dos basófilos, e ativação de proteases de neutrófilos.

Assim como as citocinas, as quimiocinas também estão envolvidas na diferenciação de linfócitos Th1 e Th2. Células Th2 expressam CCR3 e CCR4 que não são expressos em células Th1, enquanto que as células Th1 expressam CCR1, CCR3 e CCR5, receptores que as células Th2 não expressam.

IMPLICAÇÕES TERAPÊUTICAS

Com base no conhecimento do papel patogênico das citocinas e quimiocinas em diversas doenças se torna atraente o desenvolvimento de imunoterapias específicas com o objetivo de modular a resposta imune. Com isso, muitas citocinas recombinantes, receptores solúveis e anticorpos monoclonais foram desenvolvidos para o tratamento de doenças auto-imunes, rejeição de transplantados e câncer. Algumas imunoterapias já estão em

uso na clínica enquanto outras estão em fase experimental (Tabela 1) com resultados promissores.

Apesar de algumas imunoterapias para o bloqueio de citocinas apresentarem bons resultados no tratamento de doenças inflamatórias crônicas, a aplicação em doenças agudas como sepse, queimaduras e trauma, onde as citocinas inflamatórias são produzidas em níveis elevados e desencadeiam efeitos danosos, os resultados não foram bem sucedidos. Os mecanismos envolvidos na melhora ou piora clínica após as imunoterapias ainda é assunto de intenso debate. Como as citocinas atuam em uma grande variedade de células, é difícil antecipar todos os efeitos do tratamento com citocinas ou seus bloqueadores. Contudo, o entendimento da imunopatogênese das doenças contribui de maneira significativa para o desenvolvimento de novas abordagens de imunoterapia.

LITERATURA RECOMENDADA

1. Rossi D, Zlotnik A. The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol.* 2000; 18:217-42.
2. Dong C. Diversification of T-helper-cell lineages: finding the family root of IL-17-producing cells. *Nat Rev Immunol.* 2006; 6:329-33.
3. Leonard WJ, O'Shea JJ, JAKS and STATS: Biological implications. *Ann Rev Immunol* 1998; 16:293-322.
4. Ansel KM, Lee DU, Rao A. An epigenetic view of helper T cell differentiation. *Nat Immunol.* 2003; 4:616-23.
5. Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA. *Kuby Immunology.* W.H. Freeman and Company, New York, USA, 2000. 4 ed. 670p.