

Determinação de Anticorpos Anti-Mielina na Esclerose Múltipla

Eduardo Lima*, Joana Guimarães†, Ana Pereira*, Abília Bodas*, Luís Delgado*‡, Maria José Sá*

*Laboratório de Imunologia, Hospital de São João, Porto; †Serviço de Neurologia, Hospital de São João, Porto; ‡Serviço de Imunologia, Faculdade de Medicina, Universidade do Porto

Introdução: A Esclerose Múltipla é uma doença desmielinizante primária de carácter autoimune, envolvendo diferentes mecanismos imunopatológicos. Pensa-se que anticorpos dirigidos contra antígenos da mielina podem estar associados aos danos na mielina ou surgirem devido a estes, pelo que, o seu doseamento poderá constituir um marcador de evolução da doença. No entanto, a positividade desta pesquisa pode levantar dúvidas em termos de valorização clínica dada a descrição destes auto-anticorpos também em indivíduos sem doença. O objectivo deste trabalho foi a avaliação da presença de auto-anticorpos para a mielina em pacientes com o diagnóstico de Esclerose Múltipla, comparativamente a amostras de controlo, avaliando a sua associação com sintomas clínicos em pacientes com diferentes formas clínicas da Esclerose Múltipla.

Métodos: A pesquisa de anticorpos para a mielina foi realizada por uma técnica de imunofluorescência indirecta usando como substrato, nervo periférico de primata (EUROIMMUN®). Foram estudados 34 doentes (14M/11H), observados no serviço de Neurologia do Hospital de São João: 8 com forma monossintomática em surto, 11 com forma Surto/Remissão (SR) em remissão, 11 com forma SR em surto e 4 com forma Primária Progressiva (PP) em remissão. A população de controlo foi constituída por 25 amostras de indivíduos saudáveis (26M/8H).

Resultados: Encontraram-se diferenças significativas nas duas populações em relação à presença de anticorpos para a mielina ($p < 0,001$). A análise dos diferentes tipos clínicos demonstrou uma prevalência de 87,5% nos casos com SCI, 77,3% na forma SR e 75,0% na forma PP. Em relação à situação clínica, 94,7% dos doentes em surto possuíam anticorpos anti-mielina enquanto que nos doentes em remissão 60,0% foram positivos. No grupo sem patologia, 32,0% apresentou positividade para os anticorpos anti-mielina.

Conclusões: Apesar deste teste não ser específico na Esclerose Múltipla, na população de doentes estudada verificou-se uma maior prevalência dos anticorpos anti-mielina por imunofluorescência indirecta nos pacientes em surto. Até que novos e melhores marcadores serológicos estejam disponíveis, este teste poderá ser útil para monitorizar pacientes com diagnóstico definitivo ou possível de Esclerose Múltipla, na qual a presença destes auto anticorpos poderá indicar um possível surto.

Palavras-chave: esclerose múltipla; auto-anticorpos; mielina; imunofluorescência indirecta.

ARQUIVOS DE MEDICINA, 22(4/5):107-11

INTRODUÇÃO

A desmielinização no sistema nervoso central pode apresentar-se sob a forma de diversas patologias de etiologia desconhecida que, no seu conjunto, se designam doenças desmielinizantes primárias. A Esclerose Múltipla (EM) é a doença desmielinizante primária mais conhecida e a mais frequente do adulto jovem. Em cerca de 90% dos doentes a EM manifesta-se sob a forma de um síndrome clínico isolado (SCI) tradutor de uma lesão inflamatória cerebral, do nervo óptico ou da medula (1). Em cerca de 30% destes doentes observa-se evolução da forma monossintomática para a forma surto-remissão (SR) num período de 12 meses (2). Vários estudos (3,4)

em doentes com SCI demonstraram que a instituição precoce de terapêutica imunomoduladora, retarda não só o aparecimento de novos surtos, como a sua intensidade.

Desde as descrições iniciais sobre o provável processo auto-imune envolvido na EM, que se tentam encontrar anticorpos no líquido céfalo-raquidiano (LCR) indicadores de lesão mielínica. Há evidência de que os anticorpos têm um papel relevante no mecanismo fisiopatológico subjacente à EM, como é demonstrado pela importância no diagnóstico da presença de banda oligoclonais de IgG restritas ao LCR (5-10). Igualmente, terapêuticas eficazes em situações de imunopatologia mediadas por anticorpos, nomeadamente as imunoglobulinas endovenosas e a

plasmáfereze, revelam ser benéficas em determinados doentes com EM (6,7). No entanto, dada a heterogeneidade histopatológica da EM, só em determinados grupos de doentes é que este mecanismo anticorpo-mediado se crê ser preponderante (6,7,8).

No entanto a procura de anticorpos específicos, tal como se verifica em outras doenças autoimunes, tem sido controversa. Pensa-se que anticorpos dirigidos contra antigénios da mielina podem participar nos danos na mielina ou, alternativamente, surgirem devido a estes, pelo que a sua pesquisa poderá constituir um marcador de evolução da doença. Sabe-se que determinados anticorpos estão presentes logo nas fases iniciais da doença, nomeadamente o anticorpo contra a proteína básica da mielina (MBP) e o anticorpo contra a glicoproteína da mielina do oligodendrócito (MOG) (10,11). O papel patogénico destes anticorpos está já bem estabelecido em modelos animais, nomeadamente em modelos experimentais de encefalomielite, em que foi possível demonstrar que anticorpos monoclonais contra MOG induzem desmielinização *in vitro* (12). No entanto, a positividade da pesquisa destes anticorpos pode levantar dúvidas em termos de valorização clínica dada a sua presença também em indivíduos sem doença (10,11). Assim é importante em termos de estratégia terapêutica tentar perceber-se a importância dos anticorpos anti-mielina na patogénese do processo de desmielinização. Neste sentido pensamos que é de grande relevância determinar a importância, destes anticorpos nas fases iniciais da doença. Se for possível demonstrar que a serologia de LCR positiva para anticorpos contra MOG e MBP em doentes com forma de doença monossintomática indica uma probabilidade elevada de aparecimento de novos surtos, poderá definir-se de forma mais precisa e objectiva a estratégia terapêutica a instituir, nomeadamente com imunomodulação, tendo como alvo as células B.

O objectivo deste estudo foi o de avaliar, por imunofluorescência indirecta, a possível existência de autoanticorpos para a mielina em doentes com o diagnóstico de Esclerose Múltipla, e comparar os resultados com amostras de controlo. Pretendeu-se também avaliar se a presença de anticorpos anti-mielina estava associada a fase de surto em doentes com diferentes formas de apresentação clínica.

MATERIAL E MÉTODOS

Doentes

Durante o período de seis meses (Janeiro de 2006 a Junho de 2006), foram seleccionadas as amostras de soro de trinta e quatro doentes seguidos no serviço de Neurologia do Hospital de São João com diagnóstico definitivo de Esclerose Múltipla. Para o diagnóstico dos doentes foram utilizados os critérios de McDonald (9). Foram incluídos neste estudo indivíduos com Esclerose Múltipla nas formas monossintomática em surto (n=8), Surto/Remissão em surto (n=11), Surto/Remissão em

remissão (11) e forma Primária Progressiva (n=4) (Tabela 1). Nos doentes seleccionados, o tempo médio de evolução da doença foi de $8,0 \pm 3,1$ anos, com EDSS (Expanded Disability Status Scale) de 3 ± 1 e nos doentes em recaída, o valor médio de foi de $2,3 \pm 2,1$ recaídas anuais. Todos os doentes assinaram um consentimento informado para eventual processamento das amostras para fins de diagnóstico e investigação.

Tabela 1 - Características gerais dos doentes.

Tipo Clínico	Situação Clínica	Nº	Sexo	Idade [§]
SCI	Recaída	8	7M/1H	28,9 (15-44)
SR	Remissão	11	9M/2H	44,1 (33-51)
SR	Recaída	11	8M/3H	36,5 (20-66)
PP	Remissão	4	2M/2H	39,3 (30-56)
Controlos	-	25	14M/11H	34,9 (19-52)

[§]Média (mínimo-máximo); SCI - Síndrome Clínico Isolado; SR - Surto/Remissão; PP - Primária Progressiva.

Como controlo, foram seleccionadas 25 amostras de indivíduos estudados laboratorialmente por queixas neurológicas (e.g. cefaleias, queixas sensitivas, visuais) em que a avaliação neurológica e imagiológica excluiu patologia estrutural do SNC.

Todas as amostras de doentes foram colhidas por punção venosa na fase de surto, durante uma avaliação laboratorial de rotina, sendo centrifugadas e o soro armazenado a -20°C até posterior utilização.

Metodologia

A pesquisa dos autoanticorpos anti-mielina foi realizada por técnica de imunofluorescência indirecta, utilizando como substrato nervo periférico de primata Neurology Mosaic 1, (EUROIMMUN®, Lubeck). As amostras foram diluídas 1/10 em PBS-Tween. Adicionou-se em cada poço de reacção da lâmina microscópica 25µl de amostra diluída, utilizando um controlo positivo e um negativo por lâmina. De seguida, a amostra incubou com o substrato durante 30 min. à temperatura ambiente, protegida da luz removendo-se, de seguida, o excesso de amostra através de uma lavagem durante 5 min. em PBS-Tween. Adicionou-se a cada poço de reacção o anticorpo secundário (policlonal proveniente de cabra, anti-IgAGM humana, conjugado com fluoresceína, FITC). Deixou-se a incubar à temperatura ambiente durante 30 min. e procedeu-se a nova lavagem em PBS-Tween durante 5 min., removendo o excesso de anticorpo secundário que não entrou na reacção. Por fim, adicionou-se o meio de montagem (glicerol) e cobriu-se com uma lamela. A observação das lâminas foi efectuada num microscópio de fluo-

rescência, pelo mesmo investigador, sem conhecimento da proveniência e diagnóstico das amostras. Todas as determinações foram realizadas em duplicado, sendo a amostra positiva definida como aquela que apresentou um padrão de fluorescência igual ou mais forte que o controlo positivo.

Análise estatística

A diferença de distribuição dos anticorpos anti-mielina entre os diferentes grupos foi avaliada pelo teste Qui-Quadrado. A análise estatística descritiva foi feita recorrendo ao programa SPSS®, versão 13.0.

RESULTADOS

A população de doentes em estudo apresentou uma média de idades de $37,5 \pm 11,3$ anos, não diferindo significativamente da do grupo de controlo, $34,9 \pm 10,2$ anos. Em relação ao sexo, a população predominante era a feminina, correspondendo a 56,0% do grupo de controlo e a 76,5% da população de doentes, não se verificando diferenças estatisticamente significativas entre grupos.

A presença de anticorpos anti-mielina foi de 79,4% na população de doentes e de 32,0% na população de controlo (Qui-Quadrado=13,4; $p < 0,001$) (Tabela 2).

Tabela 2 - Prevalência de anticorpos anti-mielina em doentes e controlos.

	Controlos§	Doentes§	<i>p</i>
Positivos para auto-anticorpos	8 (32,0%)	27 (79,4%)	<0,001
Negativos para auto-anticorpos	17 (68,0%)	7 (20,6%)	

§ (nº, %)

Analisando os diferentes tipos clínicos de EM, verificou-se que nos casos de SCI, a positividade foi de 87,5%, na forma SR foi de 77,3% e nos casos de PP, foi de 75,0%. Analisou-se também os doentes com SR de acordo com a situação clínica: em remissão e em recaída. Assim, dos doentes em remissão 60,0% foram positivos para anticorpos anti-mielina e nos doentes em recaída, 94,7% tinham anticorpos anti-mielina (Tabela 3).

Para o diagnóstico de EM, a positividade dos anticorpos anti-mielina apresentaram uma sensibilidade de 77,1%, mas uma especificidade de apenas 68,0%.

Tabela 3 - Prevalência de anticorpos anti-mielina nos diferentes tipos clínicos da Esclerose Múltipla.

Tipos Clínicos#	Presença de anticorpos	Ausência de anticorpos
SCI	7 (87,5%)	1 (12,5%)
SR	17 (77,3%)	5 (22,7%)
PP	3 (75,0%)	1 (25,0%)
Total (em remissão)	9 (60,0%)	4 (40,0%)
Total (em recaída)	18 (94,7%)	1 (5,3%)

#SCI - Síndrome Clínico Isolado; SR - Surto/Remissão; PP - Primária Progressiva.

DISCUSSÃO

Comparando a positividade dos anticorpos anti-mielina nos dois grupos, verificaram-se diferenças significativas da sua distribuição entre o grupo de controlo e o grupo de doentes, o que está de acordo com alguns estudos (11,18,20) e em desacordo com outros (20-22). Estas discrepâncias de resultados encontradas por diferentes autores podem ser explicada pelas diferenças nos ensaios realizados, nomeadamente nas técnicas e nos antigénios utilizados, não havendo até ao momento uma técnica estandardizada (11,15,24). Em relação às técnicas utilizadas, a maioria consistiu em imunoenaios enzimáticos "ELISA" ou por "Western Blot", tendo sido utilizados recentemente a citometria de fluxo. Em relação aos antigénios, a maioria dos autores usaram o domínio extracelular da MOG expressa em *Escherichia coli* por recombinação genética (11,19-22), enquanto que outros autores usaram a proteína nativa sem ser glicosilada obtida por tradução *in vitro* do MOG (23), outros ainda utilizaram péptidos (14,17). Nos trabalhos realizados por Gaertner e colegas (15) e por Lalive e colegas (16) foi utilizado como antigénio MOG humano nativo e glicosilado, expresso em células de mamífero.

Tem sido evidenciado que tanto os doentes com EM como os indivíduos saudáveis possuem linfócitos T e anticorpos reactivos à mielina (10). No entanto, enquanto que nos indivíduos saudáveis estes linfócitos T produzem um padrão de citocinas anti-inflamatórias (IL-4 e IL-5) nos doentes o fenótipo é patogénico (células CD4⁺ autoreactivas, Th1) (10).

Em relação aos anticorpos anti-mielina, apesar da sua frequência elevada na população saudável, poderá haver diferenças de reconhecimento em relação aos autoanticorpos presentes nos doentes. É sabido que os

anticorpos patogénicos e não patogénicos se ligam a diferentes constituintes antigénicos da mielina; os anticorpos patogénicos ligam-se a epítomos glicosilados do MOG (glicoproteína da mielina do oligodendrócito) enquanto que os anticorpos não patogénicos se ligam ao MOG localizado dentro das células (24). No nosso estudo, a especificidade diagnóstica do teste foi de apenas 68%, o que poderá ser explicado pelo facto de a pesquisa de anticorpos para a mielina ter sido realizada por imunofluorescência indirecta, técnica que não permite diferenciar anticorpos patogénicos de anticorpos não patogénicos. Estudos recentes demonstraram que para fazer a correcta distinção entre anticorpos patogénicos e anticorpos não patogénicos, o antigénio usado deve encontrar-se na sua forma nativa e glicosilada (14-16,17,25).

Analisou-se também neste trabalho, a prevalência de anticorpos anti-mielina em diferentes tipos clínicos da EM (SCI, SR e PP) e em diferentes situações de surto e remissão. A percentagem de doentes com anticorpos positivos no grupo de doentes com SCI e com SR foi elevada, 87,5% e 77,3% respectivamente, estando de acordo com algumas publicações (17,19) e em desacordo com outras (20-22). Nos indivíduos com forma PP, detectaram-se anticorpos anti-mielina, estando a prevalência (75,0%), de acordo com o trabalho de Breij e colaboradores (18) e não estando de acordo com outros estudos (16,19,21,22). Apesar da nossa amostragem neste grupo ser muito pequena (quatro doentes), tem sido proposto que os anticorpos não desempenham um papel preponderante nos danos fisiopatológicos na forma PP da EM (8).

Pretendeu-se também avaliar se a presença de anticorpos poderia estar relacionada com a situação clínica (nomeadamente os surtos ou remissões) e, desse modo, constituir um marcador de evolução da doença (se assim fosse, os anticorpos estariam presentes nos doentes em recaída e ausentes em remissão). Apesar dos nossos dados sugerirem que a presença de anticorpos poderá de algum modo estar mais relacionada com o surto (94,7% apresentaram anticorpos anti-mielina versus 60,0% na remissão), até ao momento não foi possível demonstrar se estes anticorpos fazem parte do processo fisiopatológico da desmielinização, dos mecanismos de reparação da mielina ou se surgem como consequência deste. Nos indivíduos em remissão, verificou-se que, de um total de treze, nove apresentaram anticorpos; no entanto, alguns dados da literatura revelam que em indivíduos em remissão o título de anticorpos pode ser persistente até seis meses após a data do último surto (13,17).

Devido à sua baixa especificidade, a técnica de imunofluorescência indirecta em substracto heterólogo (de primata) que utilizámos na pesquisa dos anticorpos anti-mielina, não poderá ser utilizada como marcador serológico da EM, principalmente nos doentes com Síndrome Clínico Isolado. Contudo, até se tornarem disponíveis novas metodologias, a pesquisa de anticorpos anti-mielina em conjunto com os restantes meios de diagnóstico, poderá constituir um auxiliar para avaliação do risco de recaída em doentes com a forma

Surto/Remissão. No entanto, serão necessários estudos com antigénios purificados, nomeadamente o MOG e MBP, e técnicas mais sensíveis, tais como técnicas de ELISA, citometria de fluxo ou "microarrays" (26) que se espera poderem diferenciar os anticorpos patogénicos dos não patogénicos e identificar os doentes em risco aumentado de desenvolver uma recaída e/ou com maior potencial de resposta a determinadas terapêuticas (e.g. plasmáfereze, IVIG). Aguarda-se então, com expectativa, a disponibilização laboratorial destas metodologias para novos estudos e desenvolvimento.

REFERÊNCIAS

- 1 - Thrower BW. Clinically isolated syndromes: predicting and delaying multiple sclerosis. *Neurology* 2007;68:S12-5.
- 2 - Brettschneider J, Petzold A, Junker A, Tumani H. Axonal damage markers in the cerebrospinal fluid of patients with clinically isolated syndrome improve predicting conversion to definite multiple sclerosis. *Mult Scler* 2006;2:143-8.
- 3 - Motamed MR, Najimi N, Fereshtehnejad SM. The effect of interferon-beta1a on relapses and progression of disability in patients with clinically isolated syndromes (CIS) suggestive of multiple sclerosis. *Clin Neurol Neurosurg* 2007;109:344-9.
- 4 - Miller JR. The importance of early diagnosis of multiple sclerosis. *J Manag Care Pharm* 2004;10:S4-11.
- 5 - Koch M, Heersema D, Mostert J, Teelken A, De Keyser J. Cerebrospinal fluid oligoclonal bands and progression of disability in multiple sclerosis. *Eur J Neurol* 2007;14:797-800.
- 6 - Doggrel SA. Is natalizumab a breakthrough in the treatment of multiple sclerosis? *Expert Opin Pharmacother* 2003;4:999-1001.
- 7 - Kieseier BC, Wiendl H, Hemmer B, Hartung HP. Treatment and treatment trials in multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol* 2007;20:286-93.
- 8 - Lassmann H, Brück W, Lucchinetti C. Heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis: implications for diagnosis and therapy. *Trends Mol Med* 2001;7:115-21.
- 9 - McDonald WI, Compston A, Edan G. Recommended Diagnostic Criteria for Multiple Sclerosis: Guideline from the International Panel on the Diagnosis of Multiple Sclerosis. *Ann Neurology* 2001;50:121-7.
- 10 - Frohman EM, Racke MK, Raine. Multiple Sclerosis- The Plaque and Its pathogenesis. *N Engl J Med* 2006;354:942-55.
- 11 - Berger T, Rubner P, Scautzer F et al. Antimyelin Antibodies as a Predictor of Clinically Definite Multiple Sclerosis after a First Demyelinating Event. *N Engl J Med* 2003;349:139-45.
- 12 - Kerlero R, Honegger P, Lassmann H, Matthieu J. Demyelination induced in aggregating brain cell cultures by a monoclonal antibody against myelin/oligodendrocyte glycoprotein. *J Neurochem* 1990;55:583-7.
- 13 - Angelucci F, Mirabella M, Frisullo G. Serum levels of anti-myelin antibodies in relapsing-remitting multiple sclerosis patients during different phases of disease activity and immunomodulatory therapy. *Dis Markers* 2005;21:49-55.
- 14 - Lolli F, Mazzanti B, Pazzagli M. The glycopeptide CSF114(Glc) detects serum antibodies in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2005;167:131-7.

- 15 - Gaertner S, Graaf KL, Greve B, Weissert R. Antibodies against glycosylated native MOG are elevated in patients with multiple sclerosis. *Neurology* 2004;63:2238-383.
- 16 - Lalive PH, Menge T, Delarasse C, Gaspera BD, Pham-Dinh D, Villoslada P. Antibodies to native myelin oligodendrocyte glycoprotein are serologic markers of early inflammation in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:2280-5.
- 17 - Khalil M, Reindl M, Luterotti A, Kuenz B, Ehling R, Gneiss C et al. Epitope specificity of serum antibodies against the extracellular domain of myelin oligodendrocyte glycoprotein: Influence of relapses and immunomodulatory treatments. *J Neuroimmunol* 2006;174:147-56.
- 18 - Breij ECW, Heijen P, van der Goes A, Teunissen CE, Polman CH, Dijkstra . Myelin flow cytometry assay detects enhanced levels of antibodies to human whole myelin in a subpopulation of multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol* 2006;176:106-14.
- 19 - Mantegazza R, Cristaldini P, Bernasconi, P. Anti-MOG autoantibodies in Italian multiple sclerosis patients: specificity, sensitivity and clinical association. *Int Immunol* 2004;16:559-65.
- 20 - Lim ET, Berger T, Reidl M. Anti-myelin antibodies do not allow earlier diagnosis of multiple sclerosis. *Mul Scler* 2005;11:492-4.
- 21 - Zadro I, Brinar V, Horvat G, Brinar M. Clinical Relevance of antibodies against myelin oligodendrocyte glycoprotein in different clinical types of multiple sclerosis. *Clin Neurol Neurosurg* 2007;109:23-6.
- 22 - Zadro I, Brinar V, Horvat G, Brinar M. Clinical Relevance of antibodies against myelin oligodendrocyte glycoprotein in different clinical types of multiple sclerosis. *Clin Neurol Neurosurg* 2007;109:23-6.
- 23 - Lampsona V, Franciotta D, Furlan R. Similar low frequency of anti-MOG IgG and IgM in MS patients and healthy subjects. *Neurology* 2004;62:2092-4.
- 24 - Marta CM, Oliver AR, Sweet RA. Pathogenic myelin oligodendrocyte glycoprotein antibodies recognize glycosylated epitopes and perturb oligodendrocyte physiology. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:13992-7.
- 25 - Reindl M, Khalil M, Berger T. Antibodies as biological markers for pathophysiological processes in MS. *J Neuroimmunol* 2006;180:50-62.
- 26 - Robinson W H, Fontoura P, Lee B J et al. Protein microarrays guide tolerizing DNA vaccine treatment of autoimmune encephalomyelitis. *Nat Biotechnol* 2003;21:1033-9.

Correspondência:

Dr. Eduardo Lima
Laboratório de Imunologia
Hospital de São João
Alameda Prof. Hernâni Monteiro
4200-319 Porto

e-mail: edlima1982@hotmail.com