

# **AUMENTO DOS RECEPTORES SOLÚVEIS DA INTERLEUCINA-2 NA ESCLEROSE MÚLTIPLA**

## **ESTUDO PRELIMINAR EM 26 PACIENTES**

*CHARLES P. TILBERY\**, *EDUARDO FELIPE\*\**, *IZABEL MARIA MOTA\*\*\**,  
*MORTON A. SCHEINBERG\*\*\*\**

---

**RESUMO** - Em 26 pacientes com diagnóstico definido de esclerose múltipla foram colhidas amostras de sangue e pesquisados os receptores solúveis de interleucina-2 (RsIL-2). Para tal os pacientes foram divididos em dois grupos: um constituído de 14 pacientes em surto da doença e o outro com 12 pacientes em remissão da moléstia. Além destes, procedeu-se a colheita de material para a mesma pesquisa em 8 pacientes com outras doenças neurológicas. Os resultados demonstraram aumento dos RsIL-2 em 50% dos casos do grupo de pacientes em surto da doença, fato não observado nos demais pacientes dos demais grupos. Estes resultados confirmam a hipótese da ativação de células T em pacientes em surto de esclerose múltipla, corroborando a hipótese da existência de um desequilíbrio imunológico na doença.

**PALAVRAS-CHAVE:** esclerose múltipla, surto, interleucina-2 receptor solúvel.

### **Elevated levels of soluble interleukin-2 receptors in multiple sclerosis: preliminary report on 26 patients**

**SUMMARY** - Serum samples were analysed for interleukin-2 receptors levels (sIL-2R) in 26 patients with definite multiple sclerosis as defined by Poser and col. Three groups of patients form the basis of this study: group I, with 14 patients with clinical evidence of active disease; group II, with 12 patients with clinically stable multiple sclerosis; and group III, with 8 patients with other neurological diseases. Blood was collected by venipuncture and centrifuged. All samples were stored at -20°C until testing. The assay used monoclonal antibodies against epitopes of interleukin-2 receptors. In the wells of a microtiter plate coated with anti-soluble interleukin-2 receptors (Immunotech SA) samples to be measured or standards are incubated in the presence of a second monoclonal antibody conjugated with alkaline phosphatase. The amount of bound enzyme-conjugate is measured by adding a chromogenic substrate. The intensity of the resulting colour is proportional to the sIL-2R concentration present in the sample. Increased serum levels of sIL-2R were found in 7 of 14 patients with active multiple sclerosis (50%), in only 1 of the 12 patients with clinically stable multiple sclerosis and in none of the patients with other neurological diseases.

**KEY WORDS:** multiple sclerosis, active disease, soluble interleukin-2 receptors.

---

A esclerose múltipla (EM) é doença desmielinizante do sistema nervoso central (SNC) caracterizada por manifestações clínicas variáveis e de etiologia desconhecida<sup>3,19</sup>. Inúmeras alterações imunológicas foram relatadas na doença<sup>21</sup>, entre as quais destacam-se a queda da subpopulação linfocitária supressora no surto da doença<sup>19</sup>, o aumento das células T ativas no sangue<sup>8,15,21</sup>, anormalidades funcionais nas células supressoras<sup>13,19,20</sup> e síntese intratecal de imunoglobulina G<sup>21</sup>. Estes dados sugerem a participação de mecanismos imunológicos na EM, principalmente por células T<sup>13,19,21</sup>.

---

Estudo da Disciplina de Neurologia da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo e da Divisão de Imunologia do Instituto do Câncer Arnaldo Vieira de Carvalho e Instituto Brasileiro de Controle do Câncer: \*Professor Adjunto de Neurologia; \*\*Professor Instrutor de Neurologia; \*\*\*Biomédica da Divisão de Imunologia; \*\*\*\*Chefe da Divisão de Imunologia. Aceite: 18-outubro-1993.

Dr. Charles Peter Tilbery - Rua Sampaio Vidal 855 - 01443-001 São Paulo SP - Brasil.

*Tabela 1. Identificação dos pacientes submetidos a pesquisa de receptores solúveis de interleucina-2 no soro e sua distribuição pelos grupos de estudo.*

Caso	Iniciais	Sexo	Idade em anos	Grupo
1	M.R.	F	27	I
2	M.L.A.C.	F	43	I
3	S.M.D.V.	F	23	I
4	C.S.F.	M	42	I
5	C.C.	F	45	II
6	P.F.R.	F	24	I
7	R.P.	F	52	I
8	R.B.	F	31	II
9	M.C.B.	F	33	I e II
10	D.B.	F	46	II
11	R.L.	M	26	I
12	C.R.F.	F	34	II
13	M.C.G.F.	F	44	II
14	L.B.	F	32	I
15	S.A.S.	F	26	II
16	S.M.P.S.	F	35	I e II
17	S.R.P.S.	F	38	II
18	O.B.	M	47	II
19	M.B.	F	31	I
20	V.R.M.	F	39	III
21	D.L.R.	F	28	I
23	A.M.N.	F	49	II
24	Y.R.	F	24	I
25	H.T.	F	19	II
26	C.M.C.	F	40	III
27	C.L.C.	F	50	III
28	S.P.B.	F	22	III
29	E.B.P.	F	52	III
30	S.S.	F	16	III
32	J.P.S.	M	35	III
33	R.B.	F	29	I
34	C.D.	M	34	III

Recentemente, Manoussakis e col.<sup>11</sup> constataram aumento significativo de receptores solúveis de interleucina-2 (RsIL-2) em doenças autoimunes, nível este que se correlaciona à respectiva atividade imunológica. Essas alterações têm sido descritas também na EM<sup>1,5,7,9,21</sup>. Este estudo tem por objetivo avaliar essas alterações em pacientes com EM em nosso meio.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram selecionados 26 pacientes com a forma definida da EM segundo os critérios estabelecidos por Poser e col.<sup>14</sup>. Os pacientes foram divididos em grupos: Grupo I, constituído de 14 pacientes, 12 do sexo feminino e 2 do masculino, com média de idade de 27,2 anos, com surto recente da doença; Grupo II, constituído de 12 pacientes, 11 do sexo feminino e 1 do masculino, com média de idade de 37,2 anos, em remissão da doença; Grupo III, constituído de 8 pacientes, 6 do sexo feminino e 2 do masculino, com média de idade de 36 anos, 7 dos quais apresentavam acidente vascular na fase aguda, isto é, com 10 dias no máximo de evolução da sua doença e 1 apresentava epilepsia de difícil controle. Este grupo foi considerado como grupo controle (Tabela 1). Note-se que dois pacientes (Casos 9 e 16) participam dos grupos I e II.

Foram colhidos 10 ml de sangue total de todos os pacientes. No grupo I esta amostra foi obtida no prazo máximo de três semanas do início dos sintomas neurológicos (surto). No grupo II este procedimento foi realizado no prazo máximo de três semanas da estabilidade do quadro neurológico (remissão) e em dois pacientes (Casos 9 e 18) foram colhidas duas amostras. No grupo III as amostras foram colhidas durante a evolução do quadro neurológico. As amostras de sangue foram centrifugadas e o soro mantido a temperatura de -20°C até a realização do exame.

A pesquisa dos RsIL-2, utilizada neste estudo baseia-se no emprego de anticorpos monoclonais contra estes receptores, empregando-se para tal placas previamente revestidas com esses anticorpos, fornecidos pela Immunotech SA (Boston)<sup>15,16</sup>.

Adicionam-se à placa 50µl de soro dos pacientes e de padrões com 100µl de anticorpo monoclonal conjugado a fosfatase alcalina. Este preparado é mantido sob agitação constante durante duas horas à temperatura entre 18° e 25°C. Após nova incubação, aspiração e lavagem do material, adicionam-se 200µl de substrato cromogênico. Após nova incubação, sob agitação contínua por 30 minutos a temperatura entre 18° e 25°C submete-se o material a leitura por espectrofotometria. Os valores normais obtidos na Divisão de Imunologia do Instituto Arnaldo Vieira de Carvalho para os RsIL-2, utilizando-se esta técnica, situam-se entre 1050 a 4830 pg/ml.

## RESULTADOS

Os valores obtidos para os RsIL-2 nos pacientes em surto de EM estão na Tabela 2: observa-se aumento em 7, diminuição em 3 e valores normais em 4 dos 14 pacientes. Nos pacientes em remissão de EM observam-se valores

**Tabela 2. Resultados obtidos na pesquisa de receptores solúveis de interleucina-2 no soro de pacientes com esclerose múltipla em surto (grupo I).**

Caso	Valor pg/ml	Normal	Diminuído	Aumentado
1	9370			*
2	2440	*		
3	760		*	
4	1760	*		
6	6787			*
7	634		*	
9	5296			*
11	5203			*
14	7035			*
16	8335			*
19	7236			*
21	1079	*		
24	3190	*		
33	525		*	
Total		4	3	7
14				

**Tabela 3. Resultados obtidos na pesquisa de receptores solúveis de interleucina-2 no soro de pacientes com esclerose múltipla em remissão (grupo II).**

Caso	Valor pg/ml	Normal	Diminuído	Aumentado
5	3505	*		
8	2721	*		
9	2956	*		
9	2369	*		
10	3238	*		
12	4809	*		
13	3198	*		
15	2898	*		
16	5430			*
17	2129	*		
18	2310	*		
18	2196	*		
23	2759	*		
25	1420	*		
Total		13	0	1
14				

normais em 13 e aumento em apenas 1 dos pacientes (Tabela 3). Os resultados obtidos no grupo III revelam que em nenhum dos casos houve aumento desses valores, constatando-se diminuição em 3 e valores normais nos restantes 5 dos 8 pacientes (Tabela 4). Convém ressaltar que dois pacientes (Casos 9 e 16) participaram com uma amostra de soro tanto no grupo I como II. No grupo II, um paciente (Caso 18) forneceu duas amostras para esta pesquisa.

## COMENTÁRIOS

Linfócitos T ativados por mitógenos e/ou antígenos específicos sintetizam e secretam a interleucina-2 (IL-2), potente linfocina com ação estimulante no crescimento dos linfócitos<sup>6,10,11</sup>. A importância da IL-2 na indução e liberação das células T "natural killer" (NK) está bem estabelecida<sup>6,15</sup>. A IL-2 exerce seu efeito biológico interagindo com um receptor específico e próprio (RIL-2), presente nos monócitos, linfócitos B e T<sup>4,6,10</sup>. Rubin<sup>16</sup> demonstrou que após a ativação celular e a expressão o RsIL-2, libera-se no soro uma forma solúvel deste receptor (RsIL-2). Quantidades deste estão presentes em culturas de linfócitos normalmente ativadas, bem como em tumores de células B e T, doenças linfóides malignas e outras, podendo pois ser considerado um marcador imunológico<sup>2,11,22</sup>, fato demonstrado em nosso laboratório em relatos anteriores<sup>19,22</sup>.

No cérebro de pacientes com EM, detectou-se nas placas a presença de infiltrados perivasculares contendo IL-2 e RsIL-2<sup>13,19</sup>. Apesar destes achados não terem sido registrados em cérebros normais ou em cérebros com leucoencefalopatia multifocal progressiva ou doença de Alzheimer, não foi possível demonstrar que eles têm efetivamente função imunológica local<sup>9,13</sup>.

Os níveis séricos de RsIL-2 em nossos pacientes com EM e em surto estão aumentados em 50% dos casos, fato não observado em pacientes com EM em remissão ou naqueles do grupo controle, como também foi descrito por Adachi e col.<sup>2</sup>. Estes autores chamam ainda a atenção para o fato de a administração de corticóide não interferir no nível sérico desses receptores<sup>2</sup>. Não pudemos constatar, como fizeram Trotter e col.<sup>21</sup>, se os níveis de RsIL-2 estavam mais elevados nas formas progressivas de EM, principalmente a partir de 18 meses do início da doença, fato entretanto

**Tabela 4. Resultados obtidos na pesquisa de receptores solúveis de interleucina-2 no soro de pacientes com outras doenças neurológicas (grupo III).**

Caso	Valor pg/ml	Normal	Diminuído	Aumentado
20	2772	*		
26	3108	*		
27	811		*	
28	882		*	
29	1420	*		
30	1205	*		
32	1738	*		
34	668		*	
Total		5	3	0
8				

contestado por outros<sup>11,20,22</sup>. Greenberg e col.<sup>7</sup> e Gallo e col.<sup>6</sup> também encontraram níveis séricos elevados de RsIL-2 em aproximadamente 40% dos seus casos.

A pesquisa de RsIL-2 no líquido cefalorraqueano (LCR) em pacientes com EM tem mostrado resultados contraditórios<sup>5,7,18,19</sup>. Não pudemos realizar neste estudo tal dosagem, apesar de Adachi e col.<sup>2</sup> e Bellamy e col.<sup>4</sup> acreditarem que no LCR concentrado os níveis de RsIL-2 se correlacionam melhor à moléstia que os obtidos no soro, sendo estes mais confiáveis que a quantificação da proteína básica de mielina e imunoglobulina G no LCR na correlação clínica da EM.

Na interpretação dos resultados obtidos devemos considerar a possibilidade de falsos negativos, pois a liberação dos RsIL-2 é seguida

de forte ligação destes a IL-2<sup>4,6</sup> e a pesquisa em fluido biologicamente ativo pode reduzir significativamente as quantidades de IL-2 disponíveis<sup>4</sup>. Assim, Gallo e col.<sup>6</sup> encontraram aumento de RsIL-2 em apenas 20% dos seus pacientes. Estes autores acreditam que em alguns pacientes com EM apenas pequena quantidade de linfócitos pode ser ativada. Apesar de haver correlação entre IL-2 e a atividade da doença, esta pode não ser necessariamente derivada dos linfócitos periféricos<sup>4,7</sup>, pois os RsIL-2 foram descritos nas placas<sup>9,13</sup>. Células mononucleares de pacientes com EM produzem títulos elevados de IL-2, concomitante à queda destes no LCR<sup>17</sup>. A IL-2 destas placas poderia chegar à circulação sistêmica, ou seja, a elevação de RsIL-2 sérica poderia ser proveniente do cérebro<sup>11,13</sup>. Ao contrário de Hafler e Weiner<sup>8</sup>, Rudick e Barna<sup>17</sup> demonstraram que células T ativadas migram do sangue periférico para o SNC. Versailles e Goust (cit. por Trotter e col.<sup>21</sup>), postulam que linfócitos T auxiliares, de pacientes com EM, produzem resposta alôgena exagerada a células B, sugerindo que deficiências da função T supressora em pacientes com EM não provêm da falta de indução da IL-2.

Merril e col.<sup>12</sup> mostraram que pacientes com EM são deficientes na sua resposta a IL-2, apesar de haver níveis normais ou até elevados de receptores de IL-2 nestes casos. A baixa produção de IL-2 poderia resultar em queda de células NK circulantes, com evidentes repercussões em moléstias virais, etiologia proposta porém ainda não confirmada na EM<sup>15,22</sup>. Neste estudo é apresentada casuística ainda pequena, pois nossa intenção é prosseguir na investigação. A análise estatística carece de significância maior, porém nossos resultados permitem inferir que há aparente ativação das células T na doença e que a hipótese de um desequilíbrio imunológico nestes casos poderá ser confirmada.

Conclusões: 1) Pacientes com esclerose múltipla e em surto tendem a apresentar aumento sérico de receptores solúveis de interleucina-2. 2) A se confirmar este estudo, pode-se afirmar que na esclerose múltipla em surto há ativação de células T. 3) Este aumento sérico de receptores solúveis de interleucina-2 em pacientes com esclerose múltipla poderá se tornar um método auxiliar laboratorial no diagnóstico da doença.

## REFERÊNCIAS

- Adachi K, Kumamoto T, Araki S. Interleukin-2 receptor levels indicating relapse in multiple sclerosis. *Lancet* 1989, 1:559-560.
- Adachi K, Kumamoto T, Araki S. Elevated soluble interleukin-2 levels in patients with active multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1990, 28:687-691.

3. Antel JP, Arnason BGW, Medof ME. Suppressor cell function in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1979, 5:338-342.
4. Bellamy AS, Calder VL, Feldman M, Davidson AN. The distribution of interleukin-2 receptor bearing lymphocytes in multiple sclerosis: evidence for a key role of activated lymphocytes. *Clin Exp Immunol* 1985, 61:248-256.
5. Capra R, Mattiolo F, Marciano N et al. Significantly higher levels of soluble interleukin-2 in patients with relapsing remitting multiple sclerosis compared with healthy subjects. *Arch Neurol* 1990, 47:254-259.
6. Gallo P, Piccino MG, Pagni S et al. Immune activation in multiple sclerosis: study of IL-2, sIL-2R and gama-IFN levels in serum and cerebrospinal fluid. *J Neurol Sci* 1989, 92:9-15.
7. Greenberg SJ, Marcon L, Hurwitz BJ, Nelson DL. Elevated levels of soluble interleukin-2 receptors in multiple sclerosis. *N Engl J Med* 1988, 319:1019-1020.
8. Hafler DA, Weiner HL. In vivo labelling of blood T cells: rapid traffic into cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1987, 22:89-93.
9. Hartung HP, Hughes RA, Taylor et al. T cell activation in Guillain Barre syndrome and in MS: elevated serum levels of soluble IL-2 receptors. *Neurology* 1990, 40:215-218.
10. Hofman FM, von Hanwehr RI, Dinarello CA et al. Immunoregulatory molecules and IL-2 receptor identified in multiple sclerosis brain. *J Immunol* 1986, 136:3239-3245.
11. Manoussakis MN, Papadopoulos GK, Drosos A, Moutsopoulos HM. Soluble interleukin-2 receptor molecules in the serum of patients with autoimmune diseases. *Clin Immunol Immunopath* 1989, 50:321-332.
12. Merrill JE, Mohlstrom C, Uittenboogaart C et al. Response to and production of interleukin-2 by peripheral blood and cerebrospinal fluid lymphocytes of patients with multiple sclerosis. *J Immunol* 1984, 133:1931-1937.
13. Morimoto C, Hafler DA, Weiner HL. Selective loss of the suppressor inducer T cell subset in progressive multiple sclerosis: analysis with anti-H4 monoclonal antibody. *N Engl J Med* 1987, 316:67-72.
14. Poser CM, Patty DW, Scheimberg L et al. New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Ann Neurol* 1983, 13:227-231.
15. Robb BR. Low and high affinity cellular receptors for interleukin-2: implications for the level of Tac antigen. *J Exp Med* 1987, 160: 1126-1130.
16. Rubin LA. Soluble interleukin-2 receptors are released from activated human lymphoid cells in vitro. *J Immunol* 1985, 135:3172-3175.
17. Rudick RA, Barna BP. Serum interleukin-2 and soluble interleukin-2 receptor in patients with multiple sclerosis who are experiencing severe fatigue. *Arch Neurol* 1990, 47:254-255.
18. Scheimberg MA, Ikejiri M, Silva M, Mota M. Interleukin-2 receptor membrane bound and in soluble form in the acute untreated uveitis. *J Rheumatol* 1992, 19:1362-1363.
19. Tilbery CP, Camargo Lima JG, Scheimberg MA, Santos LMB, Yamada FT. Comportamento dos linfócitos T auxiliador e T supressor na esclerose múltipla: estudo preliminar. *Rev Paul Med* 1984, 102:181-183.
20. Tilbery CP, Camargo Lima JG, Scheimberg MA. Aspectos imunológicos na esclerose múltipla: subpopulações de linfócitos e anticorpos anti-linfocitários. *Rev Paul Med* 1987, 105:134-140.
21. Trotter JL, Clifford DB, McInnis JE et al. Correlation of immunological studies and disease progression in chronic progressive multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1989, 25:172-178.
22. Vaisberg M, Scheimberg MA. Simultaneous evaluation of membrane bound and soluble interleukin receptor expression in the blood and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 1990, 8:579-584.