

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS**  
**MÉDICAS**  
**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: NEUROLOGIA**

**Fator Neurotrófico Ciliar e Interleucina-6 na Síndrome de  
Guillain-Barré**

**MESTRANDO: Simone Perez**

**ORIENTADOR: Prof. Doutor Marino Muxfeldt Bianchin**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**2011**

De tudo, ficaram três coisas: a certeza de que ele estava sempre começando, a certeza de que era preciso continuar e a certeza de que seria interrompido antes de terminar. Fazer da interrupção um caminho novo. Fazer da queda um passo de dança, do medo uma escada, do sono uma ponte, da procura um encontro.

Fernando Sabino

## **Dedicatória**

Este trabalho é dedicado a todos os meus familiares que me apoiaram, incondicionalmente, com todo o amor e carinho.

Em especial, ao meu marido, Aléssio, ao meu filho, Henrique, e ao bebê que está a caminho; espero sempre contribuir para o seu crescimento, como fizeram por mim.

## **Agradecimentos**

A conquista desse trabalho deve-se à dedicação do aluno de pós-graduação, como da equipe que propicia esta oportunidade. Agradeço a todos, com todo apreço pelo apoio que me foi prestado, em especial:

Ao **Prof. Dr. Marino Muxfeldt Bianchin**, que emprestou sua extrema competência e sua prática em pesquisa, sempre com toda disponibilidade.

À **Prof. Dra. Márcia Lorena Fagundes Chaves**, pela capacidade de coordenação do Serviço de Neurologia e preocupação na boa formação de novos profissionais.

Ao **Programa de Pós-Graduação de Ciências Médicas da UFRGS** pelo acolhimento do meu projeto de pesquisa e oportunização em colocá-lo em prática, além da qualidade das disciplinas oferecidas, que certamente contribuíram para melhorar minha formação profissional.

Ao **CNPQ** pelo financiamento do projeto, possibilitando uma maior dedicação ao trabalho.



## ÍNDICE

ÍNDICE	6
LISTA DE ABREVIATURAS	7
RESUMO	8
ABSTRACT	9
1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO DA LITERATURA	10
2.1. ETIOLOGIA	10
2.2. INCIDÊNCIA	11
2.3. APRESENTAÇÃO CLÍNICA	11
2.3.1. SUBTIPOS CLÍNICOS	12
2.4. DIAGNÓSTICO	16
2.5. TRATAMENTO	18
2.6. FATORES PROGNÓSTICOS	19
2.7. PATOLOGIA	20
3. OBJETIVO	26
4. JUSTIFICATIVA	26
5. PACIENTES E MÉTODOS	27
6. EQUIPE DE PESQUISA	29
7. REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA	30
8. ARTIGO CIENTÍFICO	34
9. CONCLUSÃO	42
10. ANEXOS	43

## **Lista de Abreviaturas**

AIDP – Polirradiculoneuropatia Inflamatória Desmielinizante Aguda

AMAN – Neuropatia Axonal Motora Aguda

AMSAN – Neuropatia Axonal Sensitivo e Motor Aguda

CNTF – Fator Trófico Ciliar do Nervo

ENMG – Eletroneuromiografia

GDNF – Fator Trófico Derivado da Glia

IL – Interleucina

SMF – Síndrome de Miller-Fisher

NGF - Fator de Crescimento do Nervo

SGB - Síndrome de Guillain-Barré

## RESUMO

A Síndrome de Guillain-Barré é uma polirradiculoneuropatia aguda imuno-mediada, clinicamente apresentando-se com envolvimento sensitivo e motor e curso progressivo, em muitos casos determinando grande incapacidade e morbimortalidade nos pacientes que a desenvolvem. Este projeto de pesquisa teve como objetivo o seguimento de uma coorte de 22 indivíduos portadores da Síndrome de Guillain-Barré admitidos no Hospital de Clínicas de Porto Alegre durante o período de Janeiro de 2008 a Dezembro de 2009 para a correlação dos achados clínicos com os níveis líquóricos de interleucina-6 (IL-6) e do fator neurotrófico ciliar do nervo (CNTF). Na admissão, foi coletado o líquido cefalorraquidiano dos pacientes para dosagem de IL-6 e CNTF e, após seis meses, os pacientes foram estratificados em dois grupos, de acordo com a escala de Hughes: bom e mau prognóstico. Não foi identificada associação entre esses níveis e os achados clínicos. Mesmo assim, acreditamos que o estudo dessas substâncias pode ajudar a esclarecer a fisiopatologia da Síndrome de Guillain-Barré.



## **ABSTRACT**

The Guillain-Barré syndrome (GBS) is an acute polyradiculoneuropathy, which is usually immune-mediated. It is characterized by clinical features associated with a progressive motor and sensory involvement, leading often to major disability and morbidity in affected individuals. In this work, we investigate the correlation between clinical findings and cerebrospinal fluid levels of interleukine-6 (IL-6) and of ciliary neurotrophic factor (CNTF) in a cohort of patients with GBS during the period January 2008 - December 2009 at the Hospital de Clínicas in Porto Alegre. Interleukine-6 is an immune modulator produced in the immune system with the function of B-cells' stimulation and antibody secretion. The CNTF is produced in the CNS and plays an important role in the survival of some types of neurons. In this regard, the clinical and prognostic correlation with cerebrospinal fluid may help to elucidate the physiopathology of the Guillain-Barré syndrome.

## **1. Introdução**

A Síndrome de Guillain-Barré é uma polirradiculoneuropatia aguda imuno-mediada, clinicamente apresentando-se com envolvimento sensitivo e motor e curso progressivo, em muitos casos determinando grande incapacidade e morbimortalidade nos pacientes que a desenvolvem. Este projeto de pesquisa teve como objetivo o seguimento de uma coorte de indivíduos portadores da Síndrome de Guillain-Barré admitidos no Hospital de Clínicas de Porto Alegre durante o período de Janeiro de 2008 a Dezembro de 2009 para a correlação dos achados clínicos com os níveis líquóricos de interleucina-6 (IL-6) e do fator neurotrófico ciliar do nervo (CNTF). A IL-6 é um modulador imunológico, sendo produzida em algumas células desse sistema e tem a função de estimular os linfócitos B a secretarem anticorpos. O CNTF, produzido por algumas células do SNC, tem função na sobrevivência de alguns subtipos de neurônios. Dessa forma, a correlação clínica e prognóstica com níveis líquóricos dessas substâncias podem ajudar a esclarecer a fisiopatologia da Síndrome de Guillain-Barré.

## **2. Revisão da literatura**

### **2.1. Etiologia**

A Síndrome de Guillain-Barré (SGB) é considerada como um protótipo de uma doença auto-imune pós-infecciosa, já que dois terços dos pacientes relatam uma infecção aguda, mais comumente, do trato respiratório ou uma gastroenterite, que já se resolveram ao início dos sintomas neuropáticos [1].

Os principais patógenos associados a SGB são o *Campylobacter jejuni*, Citomegalovírus, Epstein-Barr, Varicela-zoster e *Mycoplasma pneumoniae* [2]. Apesar destas associações com micropatógenos, observamos também SGB ocorrendo a antecedentes não infecciosos, tais como vacinação, cirurgias ou após transfusões sanguíneas [3]. Existem relatos de casos apontando diversas vacinas como possíveis causadoras de SGB. Há um risco aumentado para SGB após uso de vacina anti-rábica, preparada a partir de cérebro infectado de animais. Com a vacina de influenza, parece haver um risco maior que na população em geral por um período de 6 semanas [4]. Entretanto, um estudo que pesquisou a presença de antígenos de *C. jejuni* nas vacinas de *Influenzae* A, mostrou que, mesmo não os tendo detectado, têm um poder de indução de anticorpos anti-GM1 [5].

## **2.2. Incidência**

A incidência anual de SGB estimada em recente revisão sistemática realizada por McGrogan e cols. foi de 1,1 a 1,8 casos/100.000 habitantes [6]. No mesmo estudo, a incidência apurada para crianças (menores de 16 anos) foi de cerca de 0,6 casos/100.000 habitantes/ano. No Brasil, a partir de um estudo com 95 pacientes com SGB internados em um hospital em São Paulo, no período de 1995 a 2002, foi estimada uma incidência em 0,6 casos/100.000 habitantes/ano [7].

## **2.3. Apresentação clínica**

A Síndrome de Guillain-Barré é caracterizada por uma neuropatia predominantemente motora e de curso monofásico. Usualmente, os primeiros

sintomas são dor, parestesias ou fraqueza nas extremidades, que podem ser inicialmente proximal, distais ou ambos [8].

As alterações de sensibilidade afetam mais as extremidades e têm propagação acro-rizomélica. O nervo facial é frequentemente afetado, além de outros nervos motores bulbares e oculares, embora com menos frequência. O acometimento da musculatura respiratória pode levar 25% dos pacientes a necessitar de ventilação mecânica [8]. Além disso, o envolvimento do sistema nervoso autonômico causa retenção urinária, taquicardia sinusal, íleo paralítico, hipertensão arterial, arritmia cardíaca e hipotensão postural. Nos casos mais graves em que há perda muscular significativa, levando à hipotrofia de rápida evolução (em alguns casos em até duas semanas após a instalação da doença) [3].

Na maioria dos casos, a SGB alcança clinicamente seu ponto máximo em duas semanas. Após um platô, que é variável de acordo com o paciente, a recuperação inicia-se. Gradualmente ao longo das semanas ou meses seguintes ocorre ganho de força muscular e recuperação das alterações sensitivas [3].

### **2.3.1. Subtipos clínicos**

SGB pode ser dividido em quatro subtipos principais de doença: polirradiculoneuropatia desmielinizante inflamatória aguda (AIDP), os subtipos com envolvimento axonal denominados como neuropatia axonal motora aguda (AMAN) e neuropatia axonal sensitivo e motor aguda (AMSAN), e, por último, a Síndrome de Miller Fisher (SMF).

O subtipo AIDP é o mais freqüente e tem a fraqueza muscular generalizada associada a sintomas sensitivos com característica clínica dominante. A fraqueza muscular é ascendente na maior parte dos casos – inicia-se nos membros inferiores e após atinge os membros superiores; entretanto, em cerca de um terço dos casos, ocorre acometimento imediato dos quatro membros e, em 10% dos casos, inicialmente nos membros superiores. Em metade dos casos, pode ocorrer a fraqueza dos músculos faciais, sendo com freqüência bilateral [10]

Um fator determinante de prognóstico é o envolvimento da musculatura respiratória e ocorre em cerca de 25% dos casos, gerando a necessidade de suporte ventilatório em unidades de terapia intensiva. As disautonomias, que incluem arritmias cardíacas, hipertensão ou hipotensão, íleo paralítico e retenção urinária, são bem documentadas na AIDP. A fraqueza muscular atinge o nadir em duas a quatro semanas após o início da doença; 4 a 15% dos pacientes morrem. A recuperação se dá de forma linear e pode levar de semanas a meses, mas menos de dois anos [10].

A primeira descrição da variante axonal da SGB foi feita em 1969 a partir da análise necropsias de cinquenta e sete crianças no México com paralisia flácida aguda e refere-se à degeneração axonal dos nervos periféricos [11]. Feasby e cols., em 1986, publicaram uma revisão de cinco casos de neuropatia progressiva de rápida evolução que preenchiem critérios clínicos de SGB, mas que, ao estudo eletroneuromiográfico, apresentaram extensa degeneração Walleriana e ausência de estimulação dos nervos periféricos pelo estudo de neuroconduções sensitivas e motoras [12]. A necropsia de um desses casos

mostrou sinais de degeneração axonal sem sinais inflamatórios ou desmielinizantes.

A variante axonal da SGB tem incidência estimada em 3 a 16% [13,14]. Há descrição de surtos epidêmicos de paralisia flácida aguda na China nos últimos 20 anos acometendo adultos jovens e crianças, cujas alterações no líquido cefalorraquidiano são compatíveis com SGB, mas apresentam diferenças fisiológicas e patológicas: caracteriza-se, clinicamente, por uma tetraparesia ascendente rapidamente progressiva seguida por insuficiência respiratória, sem sintomas sistêmicos, febre, envolvimento sensorial periférico; raramente, acompanha-se de disautonomias; quando presentes, são de leve intensidade [15].

A eletroneuromiografia evidencia, na maioria das vezes, latências motoras distais e velocidades de condução motora normais com a presença de amplitudes reduzidas dos potenciais de ação motor composto com ondas F normais quando presentes. Estudos de necropsia revelaram presença de degeneração Walleriana nas fibras nervosas motoras, levando ao conhecimento dessa síndrome como Neuropatia Axonal Motora Aguda (AMAN) [16]. A maioria dos casos estão associados à infecção prévia pelo *Campylobacter jejuni* e a presença de anticorpos contra o Gangliosídeo GM1 (anti-GM1) sugerindo que a AMAN é uma desordem causada por um anticorpo e complemento mediando um ataque ao axolema das fibras nervosas motoras.

A descrição da segunda variante axonal foi feita por Feasby e cols. [17] a partir de um pequeno grupo de pacientes com diagnóstico clínico de SGB, mas com achados iniciais de degeneração axonal dos nervos periféricos em

estudos neurofisiológicos e histológico, como a presença de uma rápida queda de amplitude dos potenciais de ação motor compostos e dos potenciais de ação sensitivos nervosos, sem a evidência de desmielinização local. Dessa forma, tais pacientes foram denominados como portadores da variante Neuropatia Sensitiva e Motora Axonal Aguda (AMSAN), com a característica de um quadro clínico de grave paralisia associada à lenta recuperação, provavelmente relacionada à regeneração dos axônios ao invés da remielinização observados nos casos de AIDP.

A Síndrome de Miller-Fisher, o último subtipo de SGB, descrita em 1956 por Fisher, tem como características oftalmoplegia, ataxia e arreflexia associados aos padrões de SGB como rápida e progressiva instalação. Uma de suas características é a relação entre a infecção prévia pelo *Campylobacter jejuni* e a presença de anticorpos IgG contra Gangliosídeo GQ1b (anti-GQ1b). As características eletroneuromiográficas marcantes nessa síndrome é a redução ou ausência das amplitudes dos potenciais de ação sensitivos, como também a ausência das amplitudes de respostas de reflexo H associado a neuroconduções motoras normais. Jamal e McLeod [18] sustentam que os resultados eletrofisiológicos são consistentes com uma neuropatia periférica provavelmente desmielinizante não se afastando daqueles casos observados da SGB. Fross e Daube [19] descreveram a SMF como uma neuropatia axonal característica ou uma neuronopatia com alterações predominantemente sensitivas nos membros inferiores associado a um comprometimento dos nervos cranianos motores, após constatação de anormalidades eletroneuromiográficas em todos pacientes de sua amostra.

## **2.4. Diagnóstico**

O diagnóstico da SGB se baseia em dados clínicos característicos (fraqueza progressiva, alterações sensitivas e sinais de hipo ou arreflexia, entre outros) e dados laboratoriais (investigação neurofisiológica, através da eletroneuromiografia, e análise do líquido cefalorraquidiano). Além disso, devem-se levar em conta outros possíveis diagnósticos diferenciais (Tabela 3) [20].

### **2.4.1. Testes Neurofisiológicos**

A eletroencefalografia, o principal teste neurofisiológico, desempenha um papel muito importante em vários aspectos no processo de diagnóstico da SGB. Entre elas podemos citar a confirmação do diagnóstico através da determinação do subtipo de SGB, a importância no diagnóstico diferencial da SGB de outras patologias, informações mais precisas sobre quais os nervos e músculos comprometidos e a de fornecer dados adicionais sobre a severidade da apresentação e, muito importante, fornecer parâmetros para controle evolutivo dos pacientes.

As neuroconduções sensitivas e motoras podem, por vezes, encontrarem-se totalmente normais ou discretamente retardadas (lentificadas) nas extremidades. Em 20% dos casos não apresentam alterações até a terceira ou quarta semana após o início da doença. Nos quadros mais graves, ocorre uma acentuada redução da condução nervosa em segmentos distais dos nervos, com diminuição da amplitude dos potenciais e aumento da duração. Como a neuropatia motora pode ser apenas proximal, é fundamental que se faça uso da pesquisa das latências das Ondas F nos membros



superiores e inferiores, assim como a pesquisa do Reflexo H para a correta detecção de desmielinização proximal. Em casos de apresentação leve a moderada, a ausência ou retardo (prolongamento) da Onda F pode ser a única alteração observada, já que a neurocondução distal pode estar preservada. O estudo da face pode ser necessário através do reflexo do piscamento (blink reflex) muitas vezes alterado precocemente na SGB [21].

Uma importante ferramenta no prognóstico da SGB é o estudo eletromiográfico (estudo muscular) uma vez que a presença de sinais desnervatórios associa-se a um pior prognóstico em termos de recuperação funcional. Para isso, é necessária a pesquisa de pelo menos três nervos sensitivos e três nervos motores com a estimulação de vários pontos do trajeto do nervo em estudo, além da pesquisa de Ondas F e Reflexos H bilateralmente [22]. A escolha dos nervos a serem estudados é variável, necessitando-se individualizar cada caso.

#### **2.4.2. Análise do líquido cefalorraquidiano**

A análise laboratorial do líquido cefalorraquidiano, coletado através da punção lombar, é uma das importantes ferramentas para pesquisa das polineuropatias. O achado característico de aumento da concentração de proteínas é encontrado em 80% dos pacientes portadores de SGB, mas pode não estar presente nos primeiros dias da doença, ocorrendo usualmente após a primeira semana. Como o aumento é restrito às proteínas e não às células liquóricas, esse fenômeno é chamado de dissociação proteico-celular. Além disso, a análise liquórica possibilita outras investigações em termos de diagnósticos diferenciais, inclusive infecciosos [20].

### **2.4.3. Anticorpos Anti-gangliosídeos**

Os anticorpos anti-gangliosídeos reagem aos próprios gangliosídeos encontrados nas neuropatias auto-imunes. Foram primeiramente encontrados em respostas imunológicas a células do cerebelo. Estes anticorpos mostram uma forte associação com determinadas variantes de SGB (Tabela 4) [23]. Os auto-antígenos gangliosídeos atualmente conhecidos são: GD3, GM1, GQ3 e GT1, entre outros [20,24].

Os anticorpos anti-GD3 foram encontrados em associação com formas específicas de SGB. Estudos em vivo isolaram anticorpos anti-GM1 e anti-GD3 indicando que estes anticorpos interferem na função de neurônios motores, muitas vezes associados fortemente a AMAN. Os níveis de anti-GM1 podem estar elevados em casos de diversas formas de demência, entretanto níveis elevados de anti-GM1 correlacionaram-se a um aumento da gravidade da SGB [25]. Os anticorpos anti-GQ1b são encontrados na SMF e relacionados a grande ruptura das células de Schwann observados em modelos anatomopatológicos. Também observaram níveis elevados de IgG anti-GQ1b em casos de SGB com oftalmoplegia [26].

### **2.5. Tratamento (Imunoterapia)**

Por tratar-se de uma doença auto-imune, o alvo terapêutico da SGB passou a ser a imunoterapia [20]. Antes da sua introdução 10% dos casos faleciam e 20% permaneciam com grave incapacidade física [27]. O primeiro tratamento que mostrou benefícios na evolução dos pacientes foi a plasmaferese, tornando-se padrão-ouro [28]. A imunoglobulina endovenosa humana foi introduzida em 1988 para terapêutica da SGB e em 1992 o primeiro

estudo randomizado comparando imunoglobulina à plasmaferese demonstrou efeito similar entre as drogas no tratamento da SGB [29]. O tratamento com corticosteróides não mostrou benefícios em um ensaio randomizado [30]. Recente revisão sistemática sobre Imunoterapia na SGB reforça os resultados negativos a cerca do uso de metilprednisolona endovenosa e corticóides orais [31]. Van Koningsveld e colaboradores demonstraram que o possível pequeno efeito sinérgico com uso de imunoglobulina combinado a metilprednisolona endovenosa não deve ser excluída [32].

## **2.6. Fatores Prognósticos**

Muitos estudos têm sido realizados para apontar fatores prognósticos para os casos de SGB. Dentre eles, a idade é um fator prognóstico importante, sendo pior o desfecho em indivíduos idosos e a recuperação de crianças com SGB mais rápida e completa [33,34].

A presença de antecedente infeccioso diarréico ou a confirmação de pesquisa para *Campylobacter jejuni* determina um desfecho mais grave e com recuperação mais lenta que outros pacientes [33]. A ocorrência de infecção por citomegalovírus também determina pior prognóstico devido à observação de lentidão da recuperação dos casos; entretanto, em casos de SGB associados ao vírus Epstein-Barr têm sido associados a formas clínicas com apresentação mais leves [35].

Em alguns estudos a presença de baixas amplitudes motoras e, até mesmo, a ausência de potenciais de ação motor composto ao estudo das neuroconduções motoras associado ao envolvimento axonal ao estudo Eletromiográfico estão também relacionados a um pior desfecho prognóstico

nos casos de AIDP [36]. A maioria dos casos relacionados ao subtipo AMAN apresentam boa recuperação, entretanto, mais lenta se comparados ao subtipo AIDP [15].

Um estudo que testou uma associação de variáveis clínicas para classificação de prognóstico, como a capacidade de caminhar independentemente após seis meses de evolução, foi realizado por van Koningsveld e colegas, a partir de uma análise multivariada em 397 pacientes com diagnóstico de SGB [37]. Foram usadas variáveis como idade, história de diarreia precedente ao déficit motor e o grau de incapacidade ocasionado pela SGB segundo um score aplicado em duas semanas após a admissão hospitalar. Esse sistema de classificação de prognóstico conseguiu prever com acurácia a evolução dos pacientes com SGB seis meses após o início dos sintomas, apenas usando as três variáveis clínicas citadas.

O mesmo grupo de pesquisa publicou outro estudo em 2010, no qual avaliou, a partir de características clínicas dos pacientes, o risco de insuficiência respiratória, com necessidade de ventilação mecânica na primeira semana de internação hospitalar (área sob a curva ROC 0,84) [38].

## **2.7. Patologia**

A alteração patológica clássica na SGB é um infiltrado mononuclear multifocal no nervos espinhais e raízes nervosas, nos quais a distribuição da inflamação corresponde ao déficit clínico. Os macrófagos invadem a camada de mielina, desnudando o axônio [20]. O infiltrado celular consiste predominantemente de linfócitos pequenos e médios, macrófagos e poucos polimorfonucleares. Esses tipos celulares aparecem precocemente no início da

doença. Raramente, podem ser também evidenciadas tardiamente células plasmáticas e mastocitárias [39]. Os infiltrados celulares tendem a agredir os pequenos vasos endoneurais, a mielina e também as células de Schwann. É também provocada pela agressão aos vasos nutrizes dos axônios alvos da resposta imunomediada associada à SGB [20, 39].

De acordo com essa hipótese, os macrófagos ativados, pelos linfócitos T, têm como alvo os antígenos na superfície das células de Schwann ou na camada de mielina e sua ação se dá pela liberação de metaloproteinases, óxido nítrico e outros mediadores. Nos casos mais graves, o acometimento do axônio se dá secundariamente pelos mediadores inflamatórios que anteriormente lesionaram as estruturas citadas [20].

A célula de Schwann durante o processo de injúria inflamatória secreta uma série de fatores tróficos como o fator de crescimento do nervo (NGF), fator trófico ciliar do nervo (CNTF) e fator trófico derivado da glia (GDNF) que contribuem para o crescimento axonal por brotamento e desta forma auxiliando na sobrevivência neuronal [40]. Estudos experimentais evidenciaram a capacidade das células de Schwann em secretar citocinas com potencial para inibir ou aumentar o processo inflamatório como as interleucinas (IL)-1b, IL-6, IL-13, IL-10, fator de crescimento transformador beta (TGF-beta) e outros mediadores inflamatórios. Desta maneira, a célula de Schwann pela sua característica multipotencial determina uma função vital na fisiologia normal do nervo, podendo contribuir para o processo inflamatório através da produção de citocinas, reagentes de fase aguda e fatores de crescimento [41].

### **2.7.1 Interleucina-6 (IL-6)**

As citocinas compreendem um grupo de polipeptídeos com muitas propriedades comuns a hormônios e fatores de crescimento e sua função está ligada à defesa do hospedeiro e reparo, através da regulação da replicação, diferenciação ou ativação celular. Algumas citocinas regulam a imunidade inata (IL-1, IL-6, IL-10, IL-12 e IL-15; interferons alfa e beta, fator de necrose tumoral e quimocinas); outras regulam a imunidade específica (IL-2, IL-4, IL-5, IL-13, IL-16 e IL-17; interferon gama e fator de crescimento tumoral beta); as citocinas responsáveis pelo estímulo à hematopoiese são IL-3, IL-7, IL-9 e IL-11. Células diferentes produzem a mesma citocina, que pode ter efeitos diversos em diferentes situações [42].

A interleucina-6 é um importante modulador do sistema imunológico, sendo um dos seus papéis o estímulo aos linfócitos B para proliferarem e diferenciarem-se em células formadoras de anticorpos. Atua, juntamente, com a IL-3 para induzir a proliferação de progenitores hematopoiéticos, além de estimular a produção de outras proteínas de fase aguda. Ela é secretada pelas células T, B, macrófagos, monócitos, linfócitos, fibroblastos, células endoteliais, queratinócitos e muitas linhagens de células tumorais [42].

Nos últimos anos, têm sido feitos muitos estudos para elucidar o espectro de ação da IL-6, em conjunto com outras citocinas, nas variadas doenças neurológicas. Na esclerose múltipla, constatou-se uma ativação de linfócitos T (principalmente CD4), responsáveis pela desmielinização, através do aumento de cálcio intracelular promovido por TNF alfa, IL-2 e IL-

6 precedendo as recorrências da doença por duas semanas, constatadas por alterações clínicas ou por RNM [6]. Na Doença de Alzheimer, há produção de citocinas pró-inflamatórias pela micróglia ativada pela B-amilóide, dentre elas IL-1, IL-1B e IL-6; além disso, seus níveis líquóricos estão aumentados nesses pacientes. A associação do polimorfismo dos genes de IL-1 e IL-6 e o risco de desenvolvimento da Doença de Alzheimer foi relatada [43, 44].

Na epilepsia, foi demonstrado aumento de IL-6, entre outras citocinas, no status epilepticus provocado em roedores, principalmente na micróglia. Em humanos, há poucos dados sobre o papel da IL-6 na epilepsia. Peltola e colaboradores relataram um aumento na concentração líquórica em 4 de 15 pacientes com convulsões tônico-clônicas recém instaladas; entretanto, essa alteração foi detectada nos pacientes examinados logo após as crises [45]. Tal resultado está de acordo com achados de outro experimento usando animais, em que encontrou aumento da bioatividade de IL-6 por dois dias após crises induzidas [46].

O curso clínico na SGB é determinado pelo balanço entre citocinas com efeito pró e anti-inflamatório, apontado por muitos estudos. Na fase aguda, há aumento na concentração sérica de TNF e IL-6, enquanto que na fase de recuperação, há uma *up regulation* das citocinas com efeito antiinflamatório. Tais dados sugerem que possa existir uma associação entre os níveis de citocinas e o prognóstico da SGB [42]. Em relação ao papel da IL-6 em processos lesionais do sistema nervoso periférico, um recente estudo [47], usando células de Schwann após lesão de nervo periférico, observou a indução da transcrição gênica de GFAP, uma

proteína importante na regeneração nervosa, através da ativação via STAT3. O mesmo não ocorreu em ratos deficientes em IL-6 submetidos à lesão do nervo ciático. Esses resultados sugerem que a IL-6 possa ser importante também na regeneração do nervo na SGB.

### **2.7.2 Fator Neurotrófico Ciliar do Nervo (CNTF)**

As neurotrofinas fazem parte de uma família de polipeptídios que exercem suas funções predominantemente, mas não exclusivamente, no sistema nervoso. No sistema nervoso central, as neurotrofinas estão intimamente envolvidas numa série de atividades como a diferenciação neuronal, sobrevivência celular, crescimento e plasticidade das estruturas de conexão sinápticas do nervo, como também na liberação de neurotransmissores. Além do sistema nervoso central, as neurotrofinas exercem funções em outros tecidos e em especial no sistema imunológico [40].

O fator neurotrófico ciliar do nervo (CNTF) está estruturalmente e funcionalmente relacionado à família das citocinas, que inclui o fator de inibição de leucemia (LIF), interleucina-6 (IL-6), interleucina 11 (IL-1) e a oncostatina M (OSM) [48]. Um Polipeptídeo de 25 kDa, originalmente isolado como fator de sobrevivência dos neurônios do gânglio ciliar parassimpático, apresenta características secretoras expressas somente na injúria tecidual. Desta forma, o CNTF é designado como fator associado à lesão. O CNTF é produzido pelas células de Schwann, tecido ocular e Sistema Nervoso Central, exercendo efeitos sobre os axônios, retina e astrócitos, respectivamente [40]. Em culturas de células experimentais, o CNTF demonstrou importante papel na



sobrevivência de uma variedade neuronal de subpopulações como os gânglios da raiz dorsal, neurônios simpáticos, neurônios septo-hipocampal e neurônios motores [49].

Devido à importância primordial da sobrevivência do neurônio motor e os níveis de CNTF, Ilzecka [50] e Laaksovirta [51] observaram níveis séricos aumentados de CNTF na Esclerose Lateral Amiotrófica. Outro estudo que dosou o CNTF no líquido cefalorraquidiano de pacientes com algumas doenças neurológicas [52] constatou um aumento de seus níveis em todos os pacientes com Esclerose Múltipla, SGB e CIDP, sendo as maiores dosagens encontradas nas duas últimas condições.

A interação entre CNTF e a IL-6 tem sido estudada por alguns autores. Schuster e colaboradores observaram que CNTF humano pode estimular uma resposta de fase aguda em hepatócitos, através de sua ligação ao receptor de IL-6 (IL-6R), desde que ligado à proteína gp130 e ao receptor LIF e não apenas através de seu receptor (CNTFR). Essa mesma resposta foi observada na porção solúvel de IL-6R (sIL-6R). Tais fatos têm importantes implicações no uso terapêutico do CNTF. No tratamento da Esclerose Lateral Amiotrófica, um estudo teve de ser interrompido por ocasião da severidade de efeitos adversos periféricos, já que o CNTFR não é expresso fora do SNC [53]. Em uma revisão, Jones e colaboradores descrevem a transsinalização, processo no qual a IL-6 associado ao sIL-6R estimula células que expressam gp130 [54].

Embora tenham sido descritas alterações nos níveis de CNTF e IL-6 no LCR de pacientes com SGB e esclerose lateral amiotrófica, até o momento

nenhum estudo investigou se tais variáveis têm valor preditivo do prognóstico nos pacientes com SGB.

### **3. Objetivo**

Estudar a associação entre os níveis líquóricos de IL-6 e CNTF e a evolução clínica dos pacientes com SGB, determinando se essas proteínas podem predizer a evolução desses pacientes. É biologicamente plausível que a evolução dos pacientes com SGB seja associada aos níveis líquóricos de IL-6 e CNTF.

### **4. Justificativa**

A Síndrome de Guillain-Barré é uma polirradiculoneuropatia associada a importante morbimortalidade . Na literatura, muitas evidências sugerem que as complicações da SGB podem ser minimizadas com diagnóstico rápido, tratamento de suporte adequado e instituição precoce de terapêutica específica. Sendo assim, a necessidade de diagnóstico rápido e avaliação precisa da gravidade da SGB em um determinado paciente são muito importantes para o manejo inicial e para o estabelecimento do prognóstico. Ainda, a determinação inicial da potencial evolução clínica de um dado paciente pode também auxiliar no planejamento da estratégia terapêutica a ser elaborada. Por exemplo, eventualmente naqueles casos em que os indicadores precoces estabelecerem pior prognóstico, a terapêutica poderá ser instituída mais precocemente, teoricamente com melhores resultados. Para isso, é

necessário um melhor entendimento da fisiopatogenia dessa síndrome, bem como o estabelecimento de marcadores séricos qualitativos e quantitativos confiáveis. Dentro deste cenário, acreditamos que a pesquisa assim como proposta neste trabalho possa auxiliar a estabelecer uma importante ferramenta para diagnóstico, para definição de conduta e estabelecimento precoce de gravidade em SGB. Sendo assim, acreditamos que o nosso projeto é importante não só do ponto de vista de melhor entendimento da fisiopatogenia da SGB e do papel dos biomarcadores na desmielinização e remielinização das raízes e axônios, bem como poderá ter resultados práticos para o manejo destes pacientes.

## **5. Pacientes e Métodos**

### **5.1. Delineamento do estudo.**

Estudo de coorte prospectivo.

### **5.2. População.**

Fizeram parte do estudo todos os pacientes encaminhados para o Hospital de Clínicas de Porto Alegre no período de Março de 2008 à Dezembro de 2009 que preencherem os critérios de SGB e que concordaram em participar do estudo, perfazendo um total de 22 pacientes.

#### Critérios de Inclusão

- Pacientes que preencham critérios diagnósticos para Síndrome de Guillain-Barré.

- Idade acima de 18 anos

#### Critérios de Exclusão

- Não assinatura do termo de consentimento informado.
- Presença de outras polineuropatias.
- Pacientes com outras patologias neurológicas concomitantes.

### **5.3. Ética**

O protocolo foi submetido às Comissões Científica e de Ética do HCPA para sua realização.

Somente foram incluídos os indivíduos e/ou familiares que compreenderam e concordaram com os termos do consentimento informado, autorizando o uso dos dados referentes à avaliação clínica deste trabalho.

### **5.4. Detalhamento do Projeto**

#### Critérios diagnósticos para Síndrome de Guillain-Barré

Os critérios empregados serão os mesmos utilizados pela NINCDS (National Institute of Neurological Disorders and Stroke) para Síndrome de Guillain Barre [56-58].

## **6. Equipe de Pesquisa**

Colaboração com o Grupo de Pesquisa do Serviço de Neurologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre Dra. Simone Perez; Dr. Vitor Félix Torres, Dr. Pedro Schestatsky, Dr. Marino Muxfeldt Bianchin.

Colaboração com o programa de pós-graduação em Bioquímica, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS; Prof. Diogo Onofre Gomes de Souza, Prof. Jean Pierre Oses e Prof. Luis Valmor Portela.

## Referências da revisão da literatura

1. Hahn AF. Guillain-Barré syndrome. *The Lancet*, 1998; 352:635-41.
2. Kuwabara S, Ogawara K, Misawa S, Koga M, Mori M, Hiraga A, Kanosaka T, Hattori T, Yuki N. Does *Campylobacter jejuni* infection elicit “demyelinating” Guillain-Barré syndrome? *Neurology*, Aug 10 2004; 63(3): 529-33.
3. Koga, M., N. Yuki, and K. Hirata, Antecedent symptoms in Guillain-Barre syndrome: an important indicator for clinical and serological subgroups. *Acta Neurol Scand*, 2001. 103(5): p. 278-87.
4. DeStefano F, Angulo FJ, Iskander J, Shadomy SV, Weintraub E, Chen RT. Guillain-Barré syndrome following influenza vaccination. *JAMA*, Nov 2004; 292(20): 2478-81.
5. Nachamkin I, Shadomy SV, Moran AP, Cox N, Fitzgerald C, Ung H et al. Anti-ganglioside antibody induction by swine (A/NJ/1976/H1N1) and other influenza vaccines: insights into vaccine-associated Guillain-Barre syndrome. *J Infect Dis*, 2008; 198:226–233.
6. McGrogan, A., et al., The epidemiology of Guillain-Barre syndrome worldwide. A systematic literature review. *Neuroepidemiology*, 2009. 32(2): p. 150-63.
7. Rocha, M.S., et al., Epidemiologic features of Guillain-Barre syndrome in Sao Paulo, Brazil. *Arq Neuropsiquiatr*, 2004. 62(1): p. 33-7.
8. Asbury, A.K., Diagnostic considerations in Guillain-Barre syndrome. *Ann Neurol*, 1981. 9 Suppl: p. 1-5.
9. Piazza, O., et al., S100B in Guillain-Barre syndrome. *Br J Anaesth*, 2006. 96(1): p. 141-2.
10. Cosi, V. and M. Versino, Guillain-Barre syndrome. *Neurol Sci*, 2006. 27 Suppl 1: p. S47-51.
11. Ramos-Alvarez, M., L. Bessudo, and A.B. Sabin, Paralytic syndromes associated with noninflammatory cytoplasmic or nuclear neuronopathy. Acute paralytic disease in Mexican children, neuropathologically distinguishable from Landry-Guillain-Barre syndrome. *JAMA*, 1969. 207(8): p. 1481-92.
12. Feasby, T.E., et al., An acute axonal form of Guillain-Barre polyneuropathy. *Brain*, 1986. 109 ( Pt 6): p. 1115-26.
13. Albers, J.W., P.D. Donofrio, and T.K. McGonagle, Sequential electrodiagnostic abnormalities in acute inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Muscle Nerve*, 1985. 8(6): p. 528-39.

14. Gupta, S.K., et al., Acute idiopathic axonal neuropathy (AIAN): a clinical and electrophysiological observation. *Acta Neurol Scand*, 1994. 89(3): p. 220-4.
15. Hiraga, A., et al., Recovery patterns and long term prognosis for axonal Guillain-Barre syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2005. 76(5): p. 719-22.
16. McKhann, G.M., et al., Acute motor axonal neuropathy: a frequent cause of acute flaccid paralysis in China. *Ann Neurol*, 1993. 33(4): p. 333-42.
17. Feasby, T.E. and W.F. Brown, Conduction block in early Guillain-Barre syndrome. *Lancet*, 1986. 1(8476): p. 332.
18. Jamal, G.A. and W.N. MacLeod, Electrophysiologic studies in Miller Fisher syndrome. *Neurology*, 1984. 34(5): p. 685-8.
19. Fross, R.D. and J.R. Daube, Neuropathy in the Miller Fisher syndrome: clinical and electrophysiologic findings. *Neurology*, 1987. 37(9): p. 1493-8.
20. Hughes, R.A. and D.R. Cornblath, Guillain-Barre syndrome. *Lancet*, 2005. 366(9497): p. 1653-66.
21. Vucic, S., et al., Neurophysiologic findings in early acute inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Clin Neurophysiol*, 2004. 115(10): p. 2329-35.
22. Ho, T.W., et al., Guillain-Barre syndrome in northern China. Relationship to *Campylobacter jejuni* infection and anti-glycolipid antibodies. *Brain*, 1995. 118 ( Pt 3): p. 597-605.
23. Carpo, M., et al., Clinical presentation and outcome of Guillain-Barre and related syndromes in relation to anti-ganglioside antibodies. *J Neurol Sci*, 1999. 168(2): p. 78-84.
24. Gregson, N.A., S. Koblar, and R.A. Hughes, Antibodies to gangliosides in Guillain-Barre syndrome: specificity and relationship to clinical features. *Q J Med*, 1993. 86(2): p. 111-7.
25. Willison, H.J., et al., Mechanisms of action of anti-GM1 and anti-GQ1b ganglioside antibodies in Guillain-Barre syndrome. *J Infect Dis*, 1997. 176 Suppl 2: p. S144-9.
26. Chiba, A., et al., Serum anti-GQ1b IgG antibody is associated with ophthalmoplegia in Miller Fisher syndrome and Guillain-Barre syndrome: clinical and immunohistochemical studies. *Neurology*, 1993. 43(10): p. 1911-7.
27. Winer, J.B., R.A. Hughes, and C. Osmond, A prospective study of acute idiopathic neuropathy. I. Clinical features and their prognostic value. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1988. 51(5): p. 605-12.
28. The utility of therapeutic plasmapheresis for neurological disorders. NIH Consensus Development. *JAMA*, 1986. 256(10): p. 1333-7.

29. van der Meche, F.G. and P.I. Schmitz, A randomized trial comparing intravenous immune globulin and plasma exchange in Guillain-Barre syndrome. Dutch Guillain-Barre Study Group. *N Engl J Med*, 1992. 326(17): p. 1123-9.
30. Swick, H.M. and M.P. McQuillen, The use of steroids in the treatment of idiopathic polyneuritis. *Neurology*, 1976. 26(3): p. 205-12.
31. Hughes, R.A., et al., Immunotherapy for Guillain-Barre syndrome: a systematic review. *Brain*, 2007. 130(Pt 9): p. 2245-57.
32. van Koningsveld, R., et al., Effect of methylprednisolone when added to standard treatment with intravenous immunoglobulin for Guillain-Barre syndrome: randomised trial. *Lancet*, 2004. 363(9404): p. 192-6.
33. Visser, L.H., et al., Prognostic factors of Guillain-Barre syndrome after intravenous immunoglobulin or plasma exchange. Dutch Guillain-Barre Study Group. *Neurology*, 1999. 53(3): p. 598-604.
34. Ammache, Z., et al., Childhood Guillain-Barre syndrome: clinical and electrophysiologic features predictive of outcome. *J Child Neurol*, 2001. 16(7): p. 477-83.
35. Van Koningsveld, R., et al., Mild forms of Guillain-Barre syndrome in an epidemiologic survey in The Netherlands. *Neurology*, 2000. 54(3): p. 620-5.
36. Hadden, R.D., et al., Electrophysiological classification of Guillain-Barre syndrome: clinical associations and outcome. Plasma Exchange/Sandoglobulin Guillain-Barre Syndrome Trial Group. *Ann Neurol*, 1998. 44(5): p. 780-8.
37. van Koningsveld, R., et al., A clinical prognostic scoring system for Guillain-Barre syndrome. *Lancet Neurol*, 2007. 6(7): p. 589-94.
38. Walgaard C, Lingsma HF, Ruts L, Drenthen J, van Koningsveld R, Garssen MJ, van Doorn PA, Steyerberg EW, Jacobs BC. Prediction of respiratory insufficiency in Guillain-Barré syndrome. *Ann Neurol* 2010 Jun; 67(6):781-7.
39. Press, R., et al., Aberrated levels of cerebrospinal fluid chemokines in Guillain-Barre syndrome and chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *J Clin Immunol*, 2003. 23(4): p. 259-67.
40. Linker, R., R. Gold, and F. Luhder, Function of neurotrophic factors beyond the nervous system: inflammation and autoimmune demyelination. *Crit Rev Immunol*, 2009. 29(1): p. 43-68.
41. Koski, C.L., Mechanisms of Schwann cell damage in inflammatory neuropathy. *J Infect Dis*, 1997. 176 Suppl 2: p. S169-72.
42. Aarli, J.A., Role of cytokines in neurological disorders. *Curr Med Chem*, 2003. 10(19): p. 1931-7.



43. McGeer PL, McGeer EG. Polymorphisms in inflammatory genes and the risk of Alzheimer disease. *Arch. Neurol* 2001, 58, 1790-1792.
44. Blum-Degen D, Muller T, Kuhn W, Gerlach H, Przuntek H, Riederer P. Interleukin-1 beta and interleukin-6 are elevated in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's and de novo Parkinson's disease patients. *Neurosci Lett* 1995, 202, 17-20.
45. Peltola J, Laaksonen J, Haapala AM, Hurme M, Rainesalo S, Keranen T. Indicators of inflammation after recent tonic-clonic epileptic seizures correlate with plasma interleukin-6 levels. *Seizure* 2002, 11, 44-46.
46. de Bock F, Dornand J, Rondouin G. Release of TNF alpha in the rat hippocampus following epileptic seizures and excitotoxic neuronal damage. *Neuroreport* 1996, 7, 1125-1129.
47. Lee HK, Seo IA, Suh DJ, Hong JI, Yoo YH, Park HT. Interleukin-6 is required for the early induction of glial fibrillary acidic protein in Schwann cells during Wallerian degeneration. *J Neurochem.* 2009 Feb;108(3):776-86.
48. Sleeman MW, Anderson KD, Lambert PD, Yancopoulos GD, Wiegand SJ. The ciliary neurotrophic factor and its receptor, CNTFRa. *Pharm Acta Helv.* 2000 Mar;74(2-3):265-72.
49. Sendtner, M., et al., Ciliary neurotrophic factor. *J Neurobiol*, 1994. 25(11): p. 1436-53.
50. Ilzecka, J., Increased serum CNTF level in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Eur Cytokine Netw*, 2003. 14(3): p. 192-4.
51. Laaksovirta, H., et al., Serum level of CNTF is elevated in patients with amyotrophic lateral sclerosis and correlates with site of disease onset. *Eur J Neurol*, 2008. 15(4): p. 355-9.
52. Massaro AR, Soranzo C, Carnevale A. Cerebrospinal-fluid ciliary neurotrophic factor in neurological patients. *Eur Neurol.* 1997;37(4):243-6.
53. Schuster B, Kovaleva M, Sun Y, Regenhard P, Matthews V, Grötzinger J, Rose-John S, Kallen KJ. Signaling of human ciliary neurotrophic factor (CNTF) revisited. The interleukin-6 receptor can serve as an alpha-receptor for CTNF. *J Biol Chem.* 2003 Mar 14;278(11):9528-35.
54. Jones SA, Richards PJ, Scheller J, Rose-John S. IL-6 transsignaling: the in vivo consequences. *J Interferon Cytokine Res.* 2005 May;25(5):241-53.

## 7. Artigo Científico

### Cerebrospinal fluid levels of CNTF e Interleukine 6 in Guillain-Barre Syndrome

Simone Perez

Vitor Félix Torres

Jean Pierre Oses

Pedro Schestatsky

Diogo Onofre de Souza

Luis Valmor Cruz Portela

Marino Muxfeldt Bianchin

#### **Abstract**

The Guillain-Barré syndrome (GBS) is characterized by flaccid paralysis of acute onset, usually immune-mediated, with clinical features associated with a progressive motor and sensory involvement, often determining major disability and morbidity in affected individuals. Here we present a two-years prospective study in which we followed a cohort of patients with GBS admitted to the Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Our objective was to evaluate if cerebrospinal fluid (CSF) levels of interleukine-6 (IL-6) or ciliary neurotrophic factor (CNTF) during acute phase of disease could be used for defining prognostic in GBS. At admission we measured CSF concentrations of IL-6 and CNTF in 22 patients with Guillain Barre Syndrome (GBS). After six months from the beginning of the GBS symptoms patients were blindly evaluated for neurological disability and classified in two different groups according with the scale of Hughes: good outcome (Hughes 0-2) and poor outcome (Hughes > 3). In this study we observed that CSF levels of IL-6 and CNTF were not predictors of clinical outcome in GBS. However, our study might be important for better understanding of the physiopathology

of GBS.

**Key words:** cerebrospinal fluid; Guillain-Barré syndrome; polyradiculopathy; prognosis; CNTF; IL-6.

## **Introduction**

Guillain-Barré Syndrome (GBS) is an acute inflammatory demyelinating polyneuropathy (AIDP), an autoimmune disease that affect the peripheral nervous system. Its mechanisms still not fully understood but the disease is usually triggered by an acute infectious process. GBS is clinically characterized by weakness and numbness or a tingling sensation in the legs and arms and possible loss of movement and feeling in the legs, arms, upper body, and face. The heterogeneous in severity of neurological deficits and prognosis take some patients to develop paralysis of oculomotor, facial, oropharyngeal, respiratory, and limb muscles within days and remain bedridden or wheelchair bound. Others have mild limb paresis from which they recover spontaneously within weeks. Previous studies showed that preceding infection, age, rapid progression, disability at nadir, and electrophysiological characteristics were associated with long-term prognosis [1-4]. Recently, elevated levels of neurofilament heavy chain (NfH) in the CSF indicated poor outcome in motor recovery in GBS [5]. In this venue, CSF biomarkers might be important for understanding pathophysiology of GBS and might be important for defining prognosis in these patients.

Interleukine 6 (IL-6) has pro-inflammatory activity that signaling through gp130 receptor (also called CD130). T cells and macrophages release IL-6 to stimulate immune response to tissue damage and IL-6 has been show to be increased in GBS [6]. Ciliary neurotrophic factor (CNTF) is a neurotrophic cytokine also signaling through gp130 receptor that has been showing to promote survival of motor neuron both in vivo and in vitro (7). It is biologically plausible that these cytokines are increased in GBS, being possible biological markers for disease severity. In this study, we evaluate CSF

concentrations of interleukine-6 and CNTF in patients with GBS, studying if these specific proteins could be prognostic markers of functional recovery in GBS.

## **Methods**

### **Participants and study design**

The study population included all patients with clinically defined GBS admitted to Hospital de Clínicas de Porto Alegre of Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil, a general hospital serving all ages, between January 1, 2008, and December 31, 2009. CSF from 22 patients in the acute phase of GBS were studied. All patients met clinical, neurophysiologic and CSF diagnostic criteria for GBS [8-9]. A control group composed of CSF of 32 individuals was recruited from the catchment's area of the same hospital. At admission GBS patients were submitted to lumbar puncture as a part of the diagnostic procedures and CSF samples were stored for IL-6 and CNTF measurements. Patients were followed for at least six months and after this time were evaluated using Hughes clinical scale (grade 5, assisted respiration required; grade 4, bed-bound; grade 3, able to walk 5 meters with a walker or support; grade 2, able to ambulate 5 meters independently; grade 1, minor signs and symptoms) by trained observers [10-12]. In order to evaluate outcome we divided patients into two groups according the scale of Hughes: good outcome (Hughes 0-2) and poor outcome (Hughes > 3) [5].

### **Cerebrospinal Fluid Interleukine-6 and CNTF Analyses**

A quantitative monoclonal two-site elisa assay was used for measuring IL-6 and CNTF in all of samples. The immunological reaction is detected by color reaction. The determinations were carried out in two different experiments. The detection limit of the assay is 0.02 ng/ml, as provided by the supplier. Internal controls provided by manufacturer were used to determine inter- assay

## Ethical aspects

This study was approved by the Ethics Committee for Medical Research of our hospital. Informed consent was obtained from the subjects, their nearest relatives, or both.

## Statistical analysis

Categorical variables were compared by two-tailed Chi-squared test or Fisher's exact test. Results are showed as percentage (O.R., 95% C.I.) Numerical variables were compared by the independent Student t-test, with the Levene's test for equality of analysis of variance. Results are showed as mean (S.D.). A  $p$  value  $< 0.05$  was considered statistically significant. All statistical analyses were carried out with the SPSS 18.0 for Windows.

## Results

The demographic and biochemical characteristics of GBS patients and controls are presented in Table 1. We did not observed differences when patients were classified six months after admission in the group of good prognosis (Hughes 0-2) or group of bad prognosis regarding age, gender, respiratory failure, sub-type of GBS group (AIDP or AMAN), CSF protein levels, or CSF cell count.

**Table 1 – Clinical and laboratory variables according with clinical endpoint.**

	Hughes 0-2	Hughes 3-6	O.R. (95% CI)	$p$
Age	44.45	40.54	-	0.59
Gender				
Male	7 (32%)	5 (23%)		
Female	4 (18%)	6 (27%)	0.48 (0.09-2.63)	0.67

Respiratory Failure				
Yes	1 (5%)	5 (23%)		
No	10(45%)	6(27%)	0.83 (0.78-89.47)	0.15
Type				
AIDP	7 (32%)	10(45%)		
AMAN	4(18%)	1(5%)	0.17 (0.02-1.92)	0.31
CSF protein	128.70	75.00	-	0.15
CSF cells	3.30	2.87	-	0.86

Table 2 shows the correlation among CSF IL-6 and CNTF levels with the prognosis according to the scale of Hughes in GBS patients. At hospital admission both biomarkers were elevated in CSF. However there was no difference in admission levels of CNTF and IL-6 in CSF.

**Table 2 – CSF levels of CNTF and IL-6 according with clinical endpoint.**

	Hughes 0-2	Hughes 3-6	<i>p</i>
CNTF líquor (pg/ml)	38.22 (69,88)	32.40 (22,70)	0.80
IL-6 líquor (pg/ml)	3.70 (1,62)	3.90 (1,80)	0.64

## Discussion

Biochemical markers in blood and CSF samples might be used as prognostic predictors of GBS supporting clinical practice and electrophysiological findings. In the present study we investigated if CNTF and IL-6 could be used as early biomarkers of long-term prognostic in GBS. We observed high levels of CNTF and IL-6 CSF of this

patients but this elevation did not correlate with long-term GBS outcome.

IL-6 is synthesized by mononuclear cells, T cells, endothelial cells and others in response to IL-1 and/or TNF-alpha. IL-6 is a pro-inflammatory cytokine that is thought to significantly contribute to GBS development by recruiting effector cells to the peripheral nervous system and by enabling in situ release of other products toxic for Schwann cells and myelin [13]. IL-6 mRNAs is upregulated in human vasculitic neuropathy [14] and in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy (CIDP) [15]. Our finding of increased IL-6 in CSF of GBS is in line with previous findings [16-18]. The increase of IL-6 in GBS has important pathophysiological implications and it might have therapeutical importance as well. However we observed here that the IL-6 increase in acute phase of GBS might not hold prognostic relevance for long-term clinical outcome in these patients.

CNTF is neurotrophic factor important for motor neuron survival [7]. CNTF is increased in amyotrophic lateral sclerosis (ALS) [19] and its levels correlates with clinical presentations in ELA [20]. CNTF has been tested for ALS treatment in humans [21]. In nerve, CNTF mRNA is expressed exclusively in Schwann cells, from where CNTF is released after nerve injury, being perhaps important for axonal regeneration. [22]. Surprising, Yamamoto et al. observed downregulation of CNTF mRNA in sural nerve of patients with CIDP and in human vasculitic neuropathy [14]. However, this authors observed also a reverse correlation between CNTF and CNTFR-alpha supporting a recruiting hypothesis of CNTF to the regeneration axons [23]. Massaro et al. [15] showed increased CNTF in CSF of patients with multiple sclerosis and GBS. Thus it would be biologically plausible that the amount of CNTF increase would correlate with disease severity and its clinical evolution. In this venue it is plausible that earlier CNTF levels in GBS could correlate with long-term prognosis in these patients. However, in spite of and increase of CNTF, we did not observed a correlation between CSF levels and clinical outcome in GBS.

In summary, our study showed high levels of CNTF and IL-6 in GBS. These are

interesting findings that might support a role of CNTF and IL-6 in GBS, perhaps these cytokines being important for clinical recovery of these patients. However, in spite of being biologically plausible, we did not observe any correlations between these levels with long-term prognosis in GBS.

## REFERENCES

1. McKhann, G.M., et al., Plasmapheresis and Guillain-Barre syndrome: analysis of prognostic factors and the effect of plasmapheresis. *Ann Neurol*, 1988. 23(4): p. 347-53.
2. Visser, L.H., et al., Prognostic factors of Guillain-Barre syndrome after intravenous immunoglobulin or plasma exchange. Dutch Guillain-Barre Study Group. *Neurology*, 1999. 53(3): p. 598-604.
3. Chio, A., et al., Guillain-Barre syndrome: a prospective, population-based incidence and outcome survey. *Neurology*, 2003. 60(7): p. 1146-50.
4. Hadden, R.D., et al., Preceding infections, immune factors, and outcome in Guillain-Barre syndrome. *Neurology*, 2001. 56(6): p. 758-65.
5. Petzold, A., et al., CSF protein biomarkers for proximal axonal damage improve prognostic accuracy in the acute phase of Guillain-Barre syndrome. *Muscle Nerve*, 2009. 40(1): p. 42-9.
6. Aarli, J.A., Role of cytokines in neurological disorders. *Curr Med Chem*, 2003. 10(19): p. 1931-7.
7. Jones SA, Richards PJ, Scheller J, Rose-John S., IL-6 transsignaling: the in vivo consequences. *J Interferon Cytokine Res.*, 2005 May;25(5):241-53.
8. Asbury, A.K. and D.R. Cornblath, Assessment of current diagnostic criteria for Guillain-Barre syndrome. *Ann Neurol*, 1990. 27 Suppl: p. S21-4.
9. Ho, T.W., et al., Guillain-Barre syndrome in northern China. Relationship to *Campylobacter jejuni* infection and anti-glycolipid antibodies. *Brain*, 1995. 118 ( Pt 3): p. 597-605.
10. Hughes, R.A., et al., Controlled trial prednisolone in acute polyneuropathy. *Lancet*, 1978. 2(8093): p. 750-3.
11. Randomised trial of plasma exchange, intravenous immunoglobulin, and combined treatments in Guillain-Barre syndrome. Plasma Exchange/Sandoglobulin Guillain-Barre Syndrome Trial Group. *Lancet*, 1997. 349(9047): p. 225-30.



12. van Koningsveld, R., et al., A clinical prognostic scoring system for Guillain-Barre syndrome. *Lancet Neurol*, 2007. 6(7): p. 589-94.
13. Ming-Ou Lu and Jie Zhu, The role of cytokines in Guillain-Barré syndrome. *J Neurol*, 2010.
14. Yamamoto M, Ito Y, Mitsuma N, Li M, Hattori N, Sobue G., Pathology-related differential expression regulation of NGF, GDNF, CNTF, and IL-6 mRNAs in human vasculitic neuropathy. *Muscle Nerve*, 2001. Jun;24(6):830-3.
15. Massaro AR, Soranzo C, Carnevale A., Cerebrospinal-fluid ciliary neurotrophic factor in neurological patients. *Eur Neurol.*, 1997. 37(4):243-6.
16. Sivieri S, Ferrarini AM, Lolli F, Matà S, Pinto F, Tavolato B, Gallo P., Cytokine pattern in the cerebrospinal fluid from patients with GBS and CIDP. *J Neurol Sci.*, 1997. Mar 20;147(1):93-5.
17. Zhu J, Link H, Weerth S, Linington C, Mix E, Qiao J., The B cell repertoire in experimental allergic neuritis involves multiple myelin proteins and GM1. *J Neurol Sci.*, 1994. Sep;125(2):132-7.
18. Weller M, Stevens A, Sommer N, Melms A, Dichgans J, Wiethölter H., Comparative analysis of cytokine patterns in immunological, infectious, and oncological neurological disorders. *J Neurol Sci.*, 1991 Aug;104(2):215-21.
19. Iळेcka J., Increased serum CNTF level in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Eur Cytokine Netw.*, 2003 Jul-Sep;14(3):192-4.
20. Laaksovirta H, Soinila S, Hukkanen V, Røyttä M, Soilu-Hänninen M., Serum level of CNTF is elevated in patients with amyotrophic lateral sclerosis and correlates with site of disease onset. *Eur J Neurol.*, 2008 Apr;15(4):355-9.
21. Penn RD, Kroin JS, York MM, Cedarbaum JM., Intrathecal ciliary neurotrophic factor delivery for treatment of amyotrophic lateral sclerosis (phase I trial). *Neurosurgery.*, 1997 Jan;40(1):94-9; discussion 99-100.
22. Ito Y, Yamamoto M, Li M, Doyu M, Tanaka F, Mutch T, Mitsuma T, Sobue G., Differential temporal expression of mRNAs for ciliary neurotrophic factor (CNTF), leukemia inhibitory factor (LIF), interleukin-6 (IL-6), and their receptors (CNTFR alpha, LIFR beta, IL-6R alpha and gp130) in injured peripheral nerves. *Brain Res.*, 1998 May 18;793(1-2):321-7.
23. Ito Y, Yamamoto M, Li M, Doyu M, Tanaka F, Mutch T, Mitsuma T, Sobue G., Differential temporal expression of mRNAs for ciliary neurotrophic factor (CNTF), leukemia inhibitory factor (LIF), interleukin-6 (IL-6), and their receptors (CNTFR alpha, LIFR beta, IL-6R alpha and gp130) in injured peripheral nerves. *Brain Res.*, 1998 May 18;793(1-2):321-7.

## **8. Conclusão**

Apesar do estudo não ter encontrado associação entre os níveis líquóricos de IL-6 e CNTF e a evolução clínica dos pacientes com SGB, observamos altos níveis dessas proteínas no LCR desses pacientes. Esse achado pode demonstrar uma importância dessas citocinas na recuperação da SGB.

## Anexos

### **Tabela 1. Critérios diagnósticos da Síndrome Guillain-Barré:**

1. Rápido desenvolvimento de fraqueza simétrica, com padrão ascendente dos membros inferiores envolvendo o tronco, membros superiores e eventualmente nervos cranianos.
2. Arreflexia
3. Aumento da concentração de proteínas no líquido espinhal sem alteração na contagem celular

**Fonte: Adaptado de Asbury AK [7]**

## **Tabela 2. Classificação dos Critérios Eletroneuromiográficos para SGB.**

### **1. Normal**

(Presente em todos os nervos estudados)

LMD  $\leq$  100% LSN

Ondas F presentes e com latência  $\leq$  100% LSN

VCM  $\geq$  100% LIN

PAMCd  $\geq$  100% LIN

PAMCp  $\geq$  100% LIN

PAMCp / PAMCd  $>$  0,5

### **2. Desmielinizante primária**

(Pelo menos uma das seguintes opções em pelo menos dois nervos, ou pelo menos duas das seguintes opções em um nervo se todos os outros forem inexcitáveis e PAMCd  $\geq$  10% LIN)

VCM  $<$  90% LIN (85%, se PAMCd  $<$  50% LIN)

LMD  $>$  110% LSN (120% se dCMAP  $<$  100% LIN)

PAMCp / PAMCd  $<$  0,5 e PAMCd  $\geq$  20% LIN

Resposta da latência de Onda F  $>$  120% LSN

#### **Primariamente Axonal**

Nenhuma das características acima de desmielinização em qualquer nervo (exceto uma característica desmielinizante é permitida em um nervo se PAMCd  $<$  10% LIN), e

PAMCd  $<$  80% LIN em pelo menos dois nervos

### **3. Inexcitável**

PAMCd ausentes em todos os nervos (ou presente em apenas um nervo com PAMCd  $<$  10% LIN)

### **4. Equívoca**

Não cabem exatamente critérios para qualquer outro grupo

LMD = Latência Motora Distal; LIN = Limite Inferior da Normalidade; LSN = Limite Superior da Normalidade; VCM = Velocidade de Condução Motora; PAMCd = Amplitude distal do Potencial de Ação Motora Composto; PAMCp = Amplitude proximal do Potencial de Ação Motora Composto

**Modificado de Ho e colaboradores [20]**

**Tabela 3. Diagnóstico diferencial das paralisias flácidas de início agudo.**

**AVC de Tronco cerebral**

**Encefalite de Tronco Cerebral**

**Poliomielite Anterior Aguda**

Causado por vírus da pólio

Causado por outros vírus neurotróficos

**Mielopatia Aguda**

Lesão ocupando o espaço

Mielite transversa

**Neuropatia periférica**

Síndrome Guillain-Barré

Neuropatia pós-vacinal

Neuropatia diftérica

Metais pesados, toxinas biológicas e intoxicação por drogas.

Porfíria aguda intermitente

Neuropatia vasculítica

Neuropatia do doente crítico

Neuropatia linfomatosa

**Desordens da transmissão neuromuscular**

Miastenia gravis

Toxinas biológicas ou industriais

**Desordens musculares**

Hipocalcemia

Hipofosfatemia

Miopatia inflamatória

Rabdomiolise aguda

Trichinosis

Paralisia periódica

**Fonte: Tabela adaptada de Hughes e Cornblath, 2005 [2].**

**Tabela 4. Classificação da Síndrome de Guillain-Barré, desordens associadas e anticorpos anti-gangliosídeos típicos**

Polirradiculoneuropatia Inflamatória Desmielinizante Aguda (AIDP): anticorpos desconhecidos

Neuropatia Axonal Sensitivo e Motora Aguda (AMSAN): GM1, GM1b, GD1a

Neuropatia Axonal Motora Aguda (AMAN): GM1, GM1b, GD1a, GalNac-GD1a

Neuropatia Sensitiva Aguda: GD1b

Síndrome de Miller-Fisher: GQ1b, GT1a

Acometimento orofaríngeo: GT1a

Sobreposição de Síndrome de Miller-Fisher/ Síndrome de Guillain-Barré: GQ1b, GM1, GM1b, GD1a, GalNac-GD1a

**Fonte: Tabela adaptada de Hughes e Cornblath, 2005 [2].**

**Tabela 5. Escala de graduação de comprometimento neurológico (Hughes et al., modificado pelo Guillain Barré Study Group[59]).**

<b>Grau</b>	<b>Características clínicas</b>
0	O paciente esta saudável, sem nenhum sinal ou sintoma de SGB;
1	O paciente tem sinais ou sintomas menores e é capaz de correr,
2	O paciente é capaz de andar 5 metros através de um espaço aberto sem assistência, mas é incapaz de correr;
3	O paciente é capaz de andar 5 metros através de um espaço aberto com o auxílio de outra pessoa ou de muletas;
4	O paciente esta restrito ao leito ou a cadeira de rodas;
5	O paciente necessita de ventilação assistida pelo menos uma parte do dia ou da noite;
6	Óbito

## FICHA DE AVALIAÇÃO CLÍNICA

Nome: \_\_\_\_\_ Exame

n.º: \_\_\_\_\_

Data de nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Sexo: ( ) Masc. ( ) Fem. Peso: \_\_\_\_\_ Kg

Altura: \_\_\_\_\_ m

Escolaridade: ( ) Não alfabetizado ( ) 1º. Grau incompleto ( ) 1º. Grau completo ( ) 2º. Grau completo ( ) Superior

Profissão: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Cidade: \_\_\_\_\_

UF: \_\_\_\_\_

Fone: \_\_\_\_\_

### Características Clínicas:

Fraqueza muscular distal		Desordem autonômica		Alterações sensitivas	
Fraqueza muscular proximal		Distúrbio esfinteriano		Dor	
Hiporreflexia		Paralisia de nervo craniano		Meningismo	
Arreflexia		Suporte ventilatório		Nadir (dias)	

### Clinical score for GBS/ S-100 Beta:

	2 semanas	4 semanas	8 semanas	12 semanas	26 semanas	54 semanas
Score						
S100b						

### Características Liquóricas:

Celularidade		Glicose	
Proteínas		S100b	

### Espectro de Apresentação ENMG da Síndrome de Guillain Barré:

Padrão desmielinizante agudo(AIDP)		Degeneração axonal secundária	
Padrão axonal motor agudo(AMAN)		Padrão sensitivo-motor axonal agudo(AMSAN)	
Síndrome de Miller-Fisher			

### Sorologia para infecções:

	IgM	IgG		IgM	IgG
<i>Campylobacter jejuni</i>			<i>Virus Epstein-Barr</i>		
Citomegalovirus			<i>Mycoplasma pneumoniae</i>		

### Achados associados antecedentes:

	Presente	Ausente		Presente	Ausente		Presente	Ausente
Febre			Rinorréia			Vacinação		
Cefaléia			Diarréia			Cirurgias		
Tosse			Dor Abdominal			Drogas		

### Comorbidades

Diabetes		Tireoidopatia		HIV	
Neoplasia		Doença hepática			



## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Pacientes com sintomas como fraqueza de início recente e progressivo, formigamento, dores e queimação nas mãos e pés, podem se beneficiar da avaliação correta das suas queixas. A avaliação clínica detalhada pode fornecer informações para que o médico descubra qual a causa dos sintomas, podendo determinar o tratamento correto.

A Eletroneuromiografia detecta alterações no funcionamento dos nervos e dos músculos e serve como um exame de extrema importância na detecção de lesões que possam estar causando os sintomas de dor, formigamento e fraqueza. Você está sendo convidado a participar de um estudo onde avaliaremos as repostas das questões sobre suas queixas clínicas, os resultados da eletroneuromiografia e os exames laboratoriais (dentre eles a pesquisa no sangue e no líquido espinhal da proteína S-100 Beta). Se você desejar participar, deverá autorizar a equipe de pesquisadores a verificar os resultados dos seus exames realizados para o seu atendimento habitual na instituição. Não será realizado nenhum estudo adicional, só serão observadas as queixas clínicas e a medida dos níveis da Proteína S-100 Beta, e comparadas com o resultado do exame de eletroneuromiografia. Não serão utilizadas nenhuma técnica diferente das normalmente empregadas na realização do exame.

Todos os dados obtidos serão confidenciais, não sendo o nome do paciente vinculado com o exame ou a ficha clínica. Os resultados serão colocados em um conjunto de dados, assegurando total privacidade das informações obtidas. Informações adicionais serão prontamente respondidas pelo médico que fará o exame. Havendo alguma dúvida para preenchimento dos questionários, antes da decisão do ingresso, sinta-se à vontade para questionamentos. A não participação no estudo *não* causará nenhum prejuízo ao seu atendimento na instituição.

Eu, \_\_\_\_\_, fui informado (a) dos objetivos e justificativas para a realização deste estudo. Sei que estou livre para qualquer questionamento e que minhas dúvidas foram respondidas de forma clara. Também estou ciente que estou livre para solicitar informações a qualquer momento, que as informações obtidas me serão fornecidas e que terei liberdade de retirar este meu consentimento de participação a qualquer momento, mesmo após a assinatura do mesmo.

Pesquisador

Paciente ou responsável

---

Orientador

Pesquisador Responsável: Dr. Marino Muxfeldt Bianchin

UNIDADE DE ELETROMINEUROMIOGRAFIA – TEL. 21018672