

Citochine e giovani con disturbi da tic

E. Carla Parker-Athill, PhD,¹ Jared Ehrhart, PhD,² Jun Tan, PhD, MD,^{2,3} and Tanya K. Murphy, MD, MS^{1,3}

¹Department of Pediatrics, University of South Florida Morsani College of Medicine, Tampa, Florida.

²Rashid Laboratory for Developmental Neurobiology, Silver Child Development Center,
University of South Florida Morsani College of Medicine, Tampa, Florida.

³Department of Psychiatry, University of South Florida Morsani College of Medicine, Tampa, Florida.

Funding: This study was supported by grants from the National Alliance for Research on Schizophrenia and Affective Disorders (NARSAD) and the National Institute of Mental Health (NIH/NIMH: R01 MH063914).

Abstract

Contesto: Gli studi hanno rilevato disordini immunologici nei pazienti con disturbi da tic, tra cui un aumento dei livelli di citochine nel siero. Questo studio ha lo scopo di determinare se i livelli di citochine potrebbero essere correlati con la gravità dei sintomi nei pazienti con diagnosi di disturbo da tic.

Metodo: Ventuno pazienti di età compresa tra 4-17 anni (in media 10,63-2,34 anni, 13 maschi), con una diagnosi clinica di sindrome di *Tourette* (**TS**) o disordine da tic cronico (**CTD**), sono stati selezionati sulla base della coincidenza temporale tra una visita clinica ed una esacerbazione dei tic / remissione dei sintomi. La gravità dei tic è stata valutata utilizzando la *Yale globale Tic Severity Scale* (*YGTSS*) e livelli di citochine nel siero (interleuchina [IL] -2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12p70, IL-13, interferone [IFN]-c, fattore di necrosi tumorale [TNF]-a, e fattore stimolante delle colonie di granulociti-macrofagi [GM-CSF]) misurati utilizzando la tecnologia Luminex MAP.

Risultati: Durante l'esacerbazione dei sintomi ticcosi i pazienti avevano livelli sierici superiori alla media del fattore TNF-a ($z = -1,962$, $p = 0.05$), in particolare i pazienti sotto antipsicotici ($U = 9.00$, $p = 0.033$). Anche l'aumento di IL-13 è stato associato con l'uso di antipsicotici durante l'esacerbazione ($U = 4.00$, $p = 0,043$) sebbene correlato negativamente ai punteggi sulla gravità dei tic ($q = -0,599$, $p = 018$), mentre l'aumento di IL-5 è stato associato all'utilizzo di antibiotici ($U = 6.5$, $p = 0,035$). Durante la remissione dei sintomi ticcosi, l'aumento nel siero dei livelli di IL-4 è stato associato all'utilizzo di antipsicotici ($U = 6,00$, $p = 0,047$) e antibiotici ($U = 1,00$, $p = 0,016$), l'aumento di IL-12p70 ($U = 4.00$, $p = 0.037$) è stato associato con l'uso di antibiotici.

Conclusioni: Questi risultati suggeriscono l'esistenza di un ruolo della disregolazione delle citochine nella patogenesi dei disordini da tic. Sottolinea anche il coinvolgimento meccanicistico e la potenziale utilità diagnostica del monitoraggio delle citochine, in particolare i livelli di TNF-a. Sono necessari studi sistematici su larga scala per delineare ulteriormente il ruolo delle citochine e l'influenza dei medicinali sui profili immunologici nei disturbi da tic.

Introduzione

I disturbi da tic hanno dimostrato di avere una forte componente genetica e si sono osservati polimorfismi comuni e un alto grado di ereditabilità tra i pazienti (Chou et al 2010; Liu et al 2011.). Questi polimorfismi, anche se possibili marcatori diagnostici, non spiegano appieno il meccanismo patologico, i sintomi eterogenei, o il corso imprevedibile caratterizzato da periodi di aumento o diminuzione dei sintomi che si vede nei pazienti con disturbi da tic. Allo stesso modo, la prova dell'esistenza di anomalie neurochimiche della dopamina, serotonina, e dei sistemi dell'acido c-aminobutirrico (GABA), anche se è una componente importante nel meccanismo dei disordini da tic ed è correlata all'aspetto delle disfunzioni motorie correlate, non spiega pienamente l'eziologia dei disturbi da tic (Jijun . et al 2010; Lerner et al 2012). L'eziologia infettiva dei disturbi neurologici e neuropsichiatrici ha acquisito sempre maggiore attenzione a seguito dell'osservazione di infezioni infantili prenatali e precoci correlate (Brown et al 2004; Winter et al 2009; Khandaker et al 2014.) e di anomalie immunologiche (Ashwood et al. 2011) in schizofrenia e autismo.

Nonostante il rinnovato interesse, di fatto infezioni e disfunzioni immunologiche da lungo tempo sono state sospettate come componenti centrali dei disordini da tic, in parte dopo aver osservato la sintomatologia innescata da infezioni, anomalie delle citochine e del sistema immunitario, e in parte per le forti analogie con la Corea di Sydenham (SC), il prototipo di disturbo neurologico innescato da infezioni (Swedo 1994). Le citochine in particolare hanno dimostrato di essere una parte importante del meccanismo patologico di questi disturbi, e ci sono sempre più evidenze del fatto che polimorfismi genetici e anomale espressioni sierologiche siano associate con il decorso della malattia (Leckman et al 2005;. Chou et al 2010). Nella Corea di Sydenham, un disturbo mediato da infezioni GAS che si verifica in un sottogruppo di soggetti con febbre reumatica (RF), i pazienti manifestano movimenti involontari e sintomi neuropsichiatrici, tra cui ossessioni/compulsioni e ansia, i quali si ritiene siano il risultato dell'azione degli anticorpi antistreptococco che attaccano le strutture dei gangli basali, i recettori della dopamina, e le proteine neuronali (Kirvan et al 2003;. Dale et al 2012;.. Ben-Pazi et al 2013). Ci sono anche sempre più prove a sostegno di un ruolo delle citochine altrettanto importante nella patologia della malattia, sulla base di osservazioni di un aumento dei livelli di citochine sieriche nei pazienti con neuropatologie correlate ai livelli di citochine in disturbi del movimento simili (Chiesa et al 2003;. Lewitus et al 2014.). Queste patologie, in particolare quelle che sono associate ad un aumento dei livelli sierici di citochine, sono stati osservate anche in pazienti affetti da disturbi tic, insieme a risposte immunologiche anomale a infezioni GAS e a patologie legate ai gangli basali (Giedd et al 2000;. Kalanithi et al 2005;. Bombaci et al 2009).

Data la crescente consapevolezza del ruolo della disregolazione immunitaria nei disturbi da tic, abbiamo voluto verificare se i livelli di citochine nel siero differivano nei periodi di esacerbazione dei sintomi ticcosi rispetto a periodi di remissione dei sintomi in pazienti con una diagnosi di disturbo cronico da tic (**CTD**) o sindrome di Tourette (**TS**). Abbiamo ipotizzato che i livelli di citochine infiammatorie sarebbero correlati positivamente con la gravità dei sintomi ticcosi. Comprendere il ruolo di queste citochine nella patologia da tic può essere un passo importante nella comprensione del meccanismo dei disordini da tic e di coinvolgimento del sistema immunitario.

Metodi

Partecipanti

Ventuno pazienti con **CTD** o **TS**, età 4-17 anni, sono stati selezionati da una coorte di pazienti più ampia reclutata per fare un'indagine sui fenomeni neuropsichiatrici associati temporalmente con faringiti streptococciche (Murphy et al. 2012). In breve, i partecipanti sono stati selezionati per questo studio basato sui criteri del *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th ed.* (Revisione del testo) (*American Psychiatric Association 2000*) per il disturbo da tic (**TS** o **CTD**) confermato dal colloquio clinico e da una serie di quesiti diagnostici con un medico qualificato. I partecipanti con psicosi in atto, mania, intento suicida in atto, diagnosi di deficit cognitivo o autismo (diagnosi poste sulla base di un colloquio clinico con un medico qualificato) sono stati esclusi dallo studio. I pazienti in trattamento con dosi stabili di farmaci psicotropi non sono stati esclusi. Per essere inclusi in questo studio, i partecipanti dovevano presentare una documentata esacerbazione dei sintomi e un episodio di remissione dei sintomi ticcosi durante il corso dello studio di coorte più ampio. Il tempo medio tra un ciclo di esacerbazione e di remissione è stato di 8,7 mesi. Le procedure di studio sono state approvate dal comitato istituzionale di revisione, e il consenso da parte dei genitori e dei partecipanti, quando applicabile, (età > 7 anni) è stato raccolto prima dell'iscrizione allo studio.

Valutazioni cliniche

Le valutazioni sono state condotte da T.K.M. o da un medico qualificato con esperienza in disturbi da tic pediatrici, e consistevano in valutazioni cliniche sia dei bambini che dei genitori per disordini da tic e disturbo ossessivo-compulsivo (DOC), nonché di completi esami neurologici/fisici e anamnesi completa. Le valutazioni includevano il test clinico *Yale globale Tic Severity Scale (YGTSS)* per i disordini da tic (Leckman et al. 1989), e il *Children's Yale-Brown Obsessive Compulsive Scale (CY-BOCS)* per DOC (Scahill et al. 1997). Per questo studio, i sintomi ticcosi sono stati considerati in uno stato esacerbato quando il punteggio totale rispetto alla *YGTSS* era ≥ 15 punti, e superava il punteggio precedente di ≥ 5 punti. Allo stesso modo, i sintomi DOC sono stati considerati in uno stato esacerbato quando sulla base del *CY-BOCS* il punteggio totale era ≥ 15 punti e superava il punteggio della precedente valutazione di ≥ 5 punti. Per

remissione dei sintomi ticcosi o DOC, i pazienti sono stati considerati guariti se il punteggio YGTSS o CY-BOCS era <5.

Analisi delle citochine

Oltre alle valutazioni cliniche, sono stati raccolti campioni di siero durante le visite in coincidenza con una riacutizzazione dei sintomi ticcosi, e nuovamente a distanza di tempo in coincidenza con la remissione dei sintomi. In breve, sangue periferico è stato raccolto in provette rivestite in silicone (BD Bioscience, CA) e centrifugate a 2500 rpm per 15 minuti, dopodiché il siero è stato raccolto, aliquotato e conservato a -80° fino al momento dell'analisi. I livelli sierici di citochine sono stati misurati utilizzando la tecnologia *human multiplexing bead immunoassays and Luminex-xMAP fluorescent beadbased*. La curva standard è stata ottenuta utilizzando il software Bio-Plex, livelli di riferimento per le citochine forniti dal produttore, e un modello di parametro cinque utilizzato per calcolare la concentrazione finale. Nove citochine (interleuchina [IL] -2), IL-4, IL-5, IL-10, IL-12p70, IL-13, interferone (IFN) - γ , il fattore di necrosi tumorale (TNF) - α , e il fattore stimolante delle colonie di granulociti macrofagi (GM-CSF) sono state misurate utilizzando le istruzioni del produttore (BioRad, CA).

Analisi statistica

Il *Wilcoxon rank test* è stato utilizzato per valutare le differenze dei livelli di citochine nel siero durante i periodi di esacerbazione e di remissione dei sintomi. Il test di *Mann-Whitney* è stato utilizzato per determinare le differenze tra i gruppi di pazienti che si presentavano con la remissione/esacerbazione dei soli sintomi ticcosi e coloro che hanno sperimentato esacerbazione/remissione dei sintomi DOC/tic. I dati sono stati riportati come media se non diversamente specificato. I coefficienti di correlazione *Spearman* sono stati utilizzati per verificare l'associazione tra i livelli di citochine e la gravità dei sintomi. Il software statistico *SPSS* è stato utilizzato per analizzare tutti i dati con una significatività statistica di 0,05 di definizione.

Risultati

Dati demografici e caratteristiche cliniche dei partecipanti

Quattro partecipanti con **CTD** (n = 4) e 17 con **TS** (n = 17) sono stati selezionati per questo studio (età media = 10,63-2,34, il 62% di sesso maschile). L'età media di insorgenza dei tic era di 6,56-2,54 anni e la durata media dei sintomi era di 3,02-2,09 anni. Durante i periodi di esacerbazione dei sintomi ticcosi, il punteggio YGTSS era di 23,81-7,20 rispetto al 0,62-1,56 durante la remissione dei sintomi. Il novanta per cento dei pazienti presentava comorbidità con DOC (n = 19), con un'età media di insorgenza del DOC di 6,95-2,57 anni ed una durata media di 2,89-2,21 anni. Per i pazienti con comorbidità di DOC, il punteggio medio CY-BOCS durante i periodi di esacerbazione dei tic era di 17,37-10,77, rispetto a 11,42-10,69 durante i periodi di remissione (**Tabella 1**).

I livelli di citochine nel siero differiscono nei periodi esacerbazione e remissione dei sintomi ticcosi?

È stato analizzato il livello di nove citochine nel siero di pazienti con una diagnosi clinica di **CTD** o **TS** quando i loro sintomi erano in una fase di esacerbazione, e di nuovo quando tali sintomi si erano rimessi, indipendentemente dallo stato dei sintomi DOC (**Tabella 2**). Dei 13 pazienti con livello sierico di TNF- α rilevabile, il 77% (n = 10) ha mostrato concentrazioni plasmatiche più elevate di TNF- α nei periodi di esacerbazione dei sintomi ticcosi, mentre il 15% (n = 2) aveva una concentrazione sierica maggiore durante la remissione dei sintomi. Un paziente non ha mostrato alcun cambiamento nell'espressione del TNF- α . I pazienti con esacerbazione dei sintomi ticcosi mostravano un aumento significativo nel siero del livello di TNF- α rispetto a coloro che erano in fase di remissione dei sintomi ($Z = -1.962$, $p = 0,05$), la media del TNF- α nel siero era di 0,06 durante i periodi di esacerbazione e di 0,03 durante i periodi di remissione (**Fig. 1**). Non sono state osservate altre differenze significative nei livelli di citochine nel siero.

	solo TIC (n=10)	tic/DOC (n=11)
maschi n (%)	8 (80.0)	5 (62.5)
età, media ±SD	10.67 ± 2.39	10.58 ± 2.41
YGTSS ex, ^a ±SD	23.50 ± 7.41	24.09 ± 7.35
YGTSS rem, ^b ±SD	0.90 ± 1.91	0.36 ± 1.21
Età di esordio	5.88 ± 2.33	7.18 ± 2.68
Durata	3.49 ± 2.35	2.59 ± 1.83
CY-BOCS ex, ^a ±SD	6.75 ± 5.75	25.09 ± 5.45
CY-BOCS rem, ^b ±SD	7.75 ± 7.36	14.09 ± 12.21
Età di esordio	7.13 ± 2.18	6.82 ± 2.93
Durata	2.71 ± 2.17	3.01 ± 2.35
Combined ex, ^a ±SD	14.45 ± 5.62	24.59 ± 4.75
Combined rem, ^b ±SD	3.55 ± 3.32	7.23 ± 6.31
Diagnosi, n (%)		
PANDAS	1 (10.0)	4 (36.4)
ADHD	5 (50.0)	5 (45.5)
DOC/tic	8 (80.0)	11 (100.0)
Solo tic	2 (20.0)	0 (0)
Farmaci ex/rem		
ntipsicotici	5/4	10/9
ntibiotici	1/0	2/4
Altri	9/9	11/10

Tabella 1. Caratteristiche demografiche e cliniche dei pazienti sulla base della comorbidità dei sintomi Tic/DOC durante i periodi di esacerbazione e remissione dei sintomi.

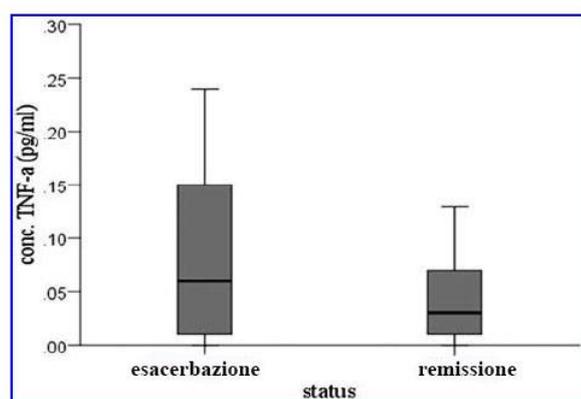
I dati sono relativi a pazienti con un ciclo di esacerbazione-remissione dei soli sintomi ticcosi, "solo tic", e a pazienti con aggravamenti e / o cicli di remissione dei sintomi i OCD e tic, "DOC/tic". **Exa**= esacerbazione (punteggi a) raccolti in un periodo di esacerbazione di sintomi OCD e tic); **remb**= remissione (punteggi b) raccolti nel corso di un periodo di remissione di tic e OCD); **YGTSS**= Yale globale Tic Severity Scale; **CY-BOCS**= Children's Yale-Brown Obsessive Compulsive Scale; **DOC**= disturbo ossessivo compulsivo; **PANDAS**= Dissordine neuropsichiatrico pediatrico autoimmune associato a streptococco ; **ADHD**= disordine da iperattività e deficit di attenzione.

Citochine	Esacerbazione	Remissione	Z	p
IL-4	0.07 (0.00–1.59)	0.05 (0.01–1.67)	-0.04	0.97
IL-5	0.79 (0.00–0.58)	0.59 (0.03–1.88)	-0.05	0.96
IL-10	2.76 (0.32–3.02)	1.73 (0.00–20.64)	-0.07	0.94
IL-12p70	28.20 (0.10–1.47)	0.00, (0.08–2.32)	-0.87	0.38
IL-13	0.81 (0.15–6.76)	0.45 (0.15–7.49)	-0.22	0.83
IFN- γ	15.53 (0.88–48.75)	12.35 (2.16–51.51)	-1.29	0.20
TNF- α	0.06 (0.00–0.60)	0.03 (0.00–0.34)	-1.96	0.05*

Tabella 2. I livelli sierici di citochine esacerbazione e remissione dei sintomi ticcosi

I dati riflettono i risultati del *Wilcoxon sign rank test*. Livelli di citochine sono misurati in pg / mL e sono espressi come medie e range. I livelli per IL-2 e GMC-SF erano sotto il limite minimo rilevabile. **IL**= interleuchina; **IFN**= interferone; **TFN**= fattore di necrosi tumorale; **GMC-SF**= fattore stimolante delle colonie di granulociti macrofagi. * Risultato statisticamente significativo.

Figura 1. Livello sierologico del fattore di necrosi tumorale (TNF)-a durante esacerbazione e remissione dei sintomi ticcosi.



La comorbidità con DOC ha un impatto sul livello di citochine sieriche durante un ciclo di esacerbazione-remissione dei tic?

Abbiamo anche esaminato se i livelli di citochine durante i periodi di esacerbazione-remissione dei sintomi ticcosi differivano tra pazienti con un ciclo di esacerbazione-remissione di soli sintomi ticcosi, ("solo tic"), rispetto a pazienti con un ciclo di esacerbazione-remissione di sintomi DOC e tic ("DOC/tic"). Dei 19 pazienti con una diagnosi di tic e DOC, 11 hanno sperimentato un aggravamento e una remissione dei sintomi sia DOC che ticcosi (**Tabella 1**). Non ci sono state

differenze significative nei livelli sierici di citochine tra pazienti con solo tic e pazienti con DOC e tic. Abbiamo esaminato anche le differenze in pazienti con **CTD** rispetto ai pazienti con **TS**. Ancora una volta non abbiamo riscontrato differenze significative tra i due gruppi, nemmeno con pazienti con disturbo da deficit di attenzione / iperattività (ADHD) o pazienti con comorbidità PANDAS.

L'assunzione di farmaci influenza il livello di citochine?

Tutti i pazienti arruolati in questo studio stavano assumendo qualche forma di farmaco, prescritto o da banco, durante i periodi di esacerbazione e remissione dei sintomi. Il 70% dei pazienti stava assumendo un farmaco antipsicotico, e il 14% era trattato con un antibiotico. Il 95% stava assumendo farmaci da banco durante i periodi di esacerbazione dei tic, mentre il 91% ha assunto farmaci simili durante il periodo di

remissione dei sintomi (**Tabella 1**). Abbiamo esaminato l'effetto dell' uso di farmaci sui livelli di citochine sierici durante i periodi di esacerbazione e remissione dei tic.

Durante i periodi di esacerbazione dei tic, il livello medio di citochine nel siero di TNF-a ($U = 9.00$, $p = 0.033$) e di IL-13 ($U = 4.00$, $p = 0.043$) erano significativamente elevati nei pazienti che assumevano antipsicotici, mentre IL-5 ($U = 6.5$, $p = 0,035$) è risultato significativamente elevato nei pazienti che assumevano antibiotici (**Tabella 3**). Durante i periodi di remissione dei sintomi, la media dei livelli di IL-4 era significativamente elevata nei pazienti che assumevano antipsicotici ($U = 6.00$, $p = 0.047$) e antibiotici ($U = 1,00$, $p = 0,016$), mentre il livello di IL12p70 era significativamente elevato nei pazienti che assumevano antibiotici ($U = 4,00$, $p = 0,037$) (**Tabella 4**).

La gravità dei sintomi, misurata grazie ai test di valutazione YGTSS e CY-BOCS, ha una correlazione con il livello di citochine?

Abbiamo esaminato l'esistenza o meno di una correlazione tra la gravità dei sintomi, così come viene misurata dai test YGTSS e CY-BOCS e il livello di citochine nel siero. Durante i periodi di esacerbazione dei tic, i livelli sierici di IL-13 hanno mostrato una correlazione negativa moderata coi punteggi totali YGTSS ($q = -0,599$, $p = 0.018$), in particolare i tic motori ($q = -0,655$, $p = 0,008$). Tuttavia, questa correlazione non è stata osservata durante la remissione dei sintomi. Non sono state osservate correlazioni significative tra i livelli sierici di citochine e i punteggi CY-BOCS.

Tabella 3. Impatto dei farmaci sull'espressione dei livelli di citochine espressione l'esacerbazione dei tic.

Citochine	Statistiche	IL-4	IL-5	IL-10	IL-12p70	IL-13	IFN- γ	TNF- α
Antipsicotico	Yes	6.40	12.23	9.31	8.31	9.17	7.90	10.18
	No	2.00	7.92	8.00	6.00	3.33	8.80	4.80
	U	1.00	26.50	22.00	9.00	4.00	21.00	9.00
	p	0.21	0.15	0.65	0.50	0.04*	0.62	0.03*
Antibiotico	Yes	5.50	17.83	5.67	11.33	5.67	8.00	8.50
	No	6.19	9.86	9.71	7.17	8.58	8.00	8.50
	U	10.50	6.50	11.00	8.00	11.00	7.00	14.00
	p	0.76	0.04*	0.21	0.15	0.31	1.00	1.00

I dati rappresentano i risultati del test Mann-Whitney U. I livelli di citochine sono stati misurati in pg / mL e vengono espressi come media. I livelli di IL-2 e GM-CSF erano sotto il limite minimo rilevabile. IL= interleuchina; IFN= interferone; TNF= il fattore di necrosi tumorale; GM-CSF= fattore stimolante delle colonie di granulociti macrofagi.

*=Risultato statisticamente significativo.

Discussione

Diversi studi hanno registrato evidenze che suggeriscono anomalie immunitarie nei pazienti con disturbi da tic, supportando l'ipotesi che le infezioni e le risposte immunologiche anomale alle infezioni possano essere fondamentali nel meccanismo patologico alla base dei disordini da tic. Nel presente studio, abbiamo cercato di esaminare la relazione tra i livelli di citochine nel siero e la gravità dei tic nei pazienti con una diagnosi clinica di **CTD** o **TS**. Il 77% dei pazienti ha espresso livelli sierici significativamente più elevati di TNF-a durante i periodi di esacerbazione dei tic, rinforzando risultati simili che hanno registrato una correlazione tra gravità dei tic e un aumento dei livelli sierici di TNF-a (Leckman et al. 2005). Queste osservazioni possono suggerire un ruolo importante di questa specifica citochina nella patogenesi dei disordini da tic, fornendo un importante strumento diagnostico.

Il TNF-a, una citochina proinfiammatoria, gioca un ruolo fondamentale nella risposta immunitaria alle infezioni come potente regolatore del sistema immunitario e dei processi infiammatori, reclutando macrofagi, attivando cellule T e inducendo l'espressione di citochine e altri mediatori immunitari durante l'infezione. (Kuhweide et al 1990; Kim et al., 2006). Come molte altre citochine, il TNF-a gioca un ruolo altrettanto importante nella regolazione del sistema nervoso centrale (SNC), sia fisiologicamente che patologicamente.

Recenti studi su malattie neurodegenerative come la sclerosi laterale amiotrofica (SLA) hanno messo in evidenza gli aspetti patologici di questa relazione, mostrando come un aumento sierico dei livelli di TNF-a preceda la presentazione clinica della disfunzione motoria (Tolosa et al. 2011). Sebbene il meccanismo esatto sia ancora sconosciuto, sono stati proposti lo stress ossidativo e la conseguente morte cellulare dei

motoneuroni, che sono conseguenze di neuroinfiammazione. Inoltre diversi studi hanno evidenziato l'eccitotossicità derivata dal TNF- α come fattore in grado di modulare la segnalazione del glutammato così come del GABA e dell'espressione dei recettori del glutammato (Lewitus et al 2014;. Olmos e Llado 2014). L'azione del TNF- α nella SLA può far luce sul suo ruolo nei disordini da tic date le osservazioni cliniche analoghe, tra cui l'associazione tra livelli aumentati di TNF- α , gravità dei sintomi e coinvolgimento dei sistemi GABA (Jijun et al 2010;. Lerner et al. 2012).

Anche se sembra esserci un ruolo significativo del TNF- α nei disturbi da tic, altre citochine come IL-13 possono essere importanti nella comprensione del ruolo del sistema immunitario in questo disturbo. IL-13, che abbiamo trovato essere correlata negativamente alla gravità dei sintomi ticcosi, ha proprietà anti-infiammatorie, e ha dimostrato di regolare la produzione di immunoglobuline E (IgE), anch'esse correlate negativamente ai punteggi YGTSS (Hoshino et al 1999. Wynn 2003; Hajoui et al 2004).. Il ruolo di IL-13 nei disordini da tic potrebbe essere meno caratterizzato; tuttavia, il suo ruolo nella regolazione immunitaria e

Tabella 4. Impatto dei farmaci sui livelli di citochine durante la remissione dei tic.

<i>Cytokine</i>	<i>Statistic</i>	<i>IL-4</i>	<i>IL-5</i>	<i>IL-10</i>	<i>IL-12p70</i>	<i>IL-13</i>	<i>IFN-γ</i>	<i>TNF-α</i>
Antipsychotic	Yes	8.90	11.93	10.57	8.58	9.23	8.31	7.62
	no	4.00	8.67	8.40	8.25	5.33	6.42	6.00
	<i>U</i>	6.00	31.00	27.00	23.00	10.00	17.50	5.00
	<i>p</i>	0.05*	0.27	0.46	0.90	0.20	0.40	0.71
Antibiotic	Yes	12.67	15.67	15.00	13.67	11.67	8.00	8.17
	no	6.09	10.22	9.06	7.31	7.77	7.42	7.32
	<i>U</i>	1.00	13.00	9.00	4.00	10.00	11.00	14.50
	<i>p</i>	0.02*	0.15	0.09	0.04*	0.20	0.86	0.75

I dati rappresentano i risultati del test Mann-Whitney U. I livelli di citochine sono stati misurati in pg / mL e vengono espressi come media. I livelli di IL-2 e GM-CSF erano sotto il limite minimo rilevabile. IL= interleuchina; IFN= interferone; TNF= il fattore di necrosi tumorale; GMC-SF= fattore stimolante delle colonie di granulociti macrofagi.

*=Risultato statisticamente significativo.

la sua correlazione con disturbi autoimmuni suggeriscono che potrebbe avere insieme al TNF- α un ruolo significativo per spiegare il meccanismo dei disordini da tic. Inoltre, IL-13 e TNF- α sono state indicate per avere una regolazione bidirezionale, con IL-13 che sopprime l'espressione di TNF- α e TNF- α che potenzialmente è in grado di sopprimere l'espressione di IL-13 (Cosentino et al 1995;. Albanesi et al 2007.). Con le crescenti evidenze di un ruolo della disregolazione immunitaria nella patogenesi dei disordini da tic, le citochine come TNF- α e IL-13 possono costituire un anello importante nella comprensione del meccanismo patologico che regola questa malattia.

Oltre a spiegare aspetti del meccanismo della malattia, la capacità di correlare i livelli delle citochine con lo stato di malattia e la gravità dei sintomi può essere un'importante risorsa diagnostica, in particolare in un ambiente pediatrico dove viene posta notevole enfasi ai resoconti dei genitori a causa della mancanza di marcatori biologici. Sebbene solo TNF- α e IL-13 hanno mostrato associazioni significative con la severità dei tic nel nostro studio, con un aumento del TNF- α durante le esacerbazioni e IL-13 correlato negativamente ai punteggi delle scale di gravità dei sintomi, abbiamo osservato un aumento nel livello di diverse altre citochine in pazienti trattati con farmaci antipsicotici e antibiotici. I livelli di TNF- α e IL-13 aumentavano durante l'esacerbazione dei tic in pazienti che assumevano no antipsicotici, mentre IL-5 aumentava nei pazienti trattati con antibiotici. Abbiamo anche osservato un aumento dei livelli della citochina antinfiammatoria IL-4 in pazienti che assumevano farmaci antibiotici e/o antipsicotici durante la remissione dei sintomi.

Queste osservazioni suggeriscono che i livelli di citochine potrebbero essere influenzate dall'utilizzo di farmaci, poichè antipsicotici e antibiotici hanno dimostrato di avere effetti immunomodulatori, con studi che dimostrano un aumento di IL-4 conseguente a trattamento antipsicotico e diminuzione di TNF- α con l'assunzione di macrolidi (Morikawa et al. 2002. Himmerich et al 2011; Al-Amin et al 2013). L'impatto dei farmaci antipsicotici sul sistema immunitario e sull'espressione delle citochine può evidenziare un aspetto potenzialmente importante del loro meccanismo terapeutico. Date le crescenti evidenze di irregolarità immunitarie, comprese eventuali squilibri delle citochine, nei disturbi neurologici come i disturbi da tic, la capacità degli antipsicotici di modulare l'espressione delle citochine e potenzialmente normalizzare il

sistema immunitario può essere, almeno in parte, la chiave per spiegare la loro efficacia terapeutica, (Al-Amin et al. 2013). Nel caso degli antibiotici, il loro impatto sul sistema immunitario è stato ben documentato e può essere indirettamente correlato al loro meccanismo di azione (Morikawa et al 2002;. Williams et al 2005). È importante ricordare tuttavia, che tali interazioni possono non essere terapeuticamente benefiche, come si è visto dagli effetti collaterali più deleteri attribuibili ad uso di antipsicotici e antibiotici. In particolare nel caso degli antibiotici, l'incapacità di questi agenti di differenziare tra i vari ceppi microbici gastrointestinali, che notoriamente partecipano alla regolazione immunitaria, invadendo specie patogene può provocare unamodulazione del sistema immunitario di scarso valore terapeutico (Jakobsson et al. 2010).

E' inoltre degno di nota ricordare che queste osservazioni non possono essere formali, dato che pazienti che presentano una più grave esacerbazione dei sintomi, richiedono interventi farmacologici. Per contro, l'associazione con un aumento dei livelli di citochine durante il trattamento con antibiotici o antipsicotici può essere una coincidenza, con aumenti di citochine proinfiammatorie quali TNF- α , e citochine antinfiammatorie come IL-4 correlati alle variazioni della gravità dei tic. Indipendentemente da ciò, questa associazione richiede ulteriori indagini.

Conclusioni

Nonostante i nostri risultati, esiste ancora un certo disaccordo tra gli studi che indagano le irregolarità del sistema immunitario, in particolare i livelli di citochine, all'interno della popolazione affetta da tic. Alcuni gruppi, per esempio, hanno notato correlazioni tra i livelli di TNF- α e il disturbo da tic (Gabbay et al. 2009), mentre altri hanno trovato ridotti livelli di TNF- α in pazienti con disordini da tic (Matzt et al. 2012). Queste discrepanze possono essere il risultato di differenze metodologiche nella progettazione dello studio, incluse le differenze intrinseche tra i pazienti scelti per ciascuno studio. Sebbene nella maggior parte degli studi i pazienti sono stati arruolati sulla base di una diagnosi di un disturbo da tic, la presenza di disturbi in comorbidità e le differenze nei criteri di definizione dello stato di esacerbazione e remissione dei sintomi riscontrati nei pazienti, hanno potuto determinare differenze nei risultati dello studio. I farmaci psicotropi e antibiotici rappresentano un altro fattore di confusione, anche se altri studi non hanno riportato effetti significativi di questi farmaci, nonostante entrambe le categorie di farmaci abbiano dimostrato di modulare il livello di citochine (Obregon et al. 2012). Tuttavia, le prove raccolte sostengono l'idea che la misurazione delle citochine può essere un importante strumento clinico nel determinare la suscettibilità, la diagnosi, il monitoraggio dei sintomi, e forse, l'intervento terapeutico, e sono necessari più studi per determinare l'esatto ruolo delle citochine nell'eziologia dei disturbi datic.

Limitazioni

Anche se questo studio supporta l'ipotesi di un'eziologia infettiva e/o immuno-mediata dei disordini da tic, si sono presentati diversi limiti che richiedono la necessità di maggiori analisi sistematiche della funzione immunitaria nei disordini da tic. Tra questi limiti, la dimensione ridotta del campione analizzato, la presenza di disturbi in comorbidità nella nostra coorte di pazienti selezionati, e una percentuale significativa di pazienti sottoposti a farmaci psicotropi e antibiotici, noti entrambi per avere effetti immunologici.

Importanza clinica

Nonostante i limiti, questo studio supporta i risultati di precedenti studi che citano la disregolazione di citochine in pazienti con disturbi da tic. Inoltre, questo studio individua il TNF- α come un obiettivo importante per lo studio della disregolazione delle citochine e delle anomalie immunologiche nella popolazione affetta da tic. Comprendere il ruolo delle anomalie immunitarie nella patogenesi dei disordini da tic può non solo essere un aiuto nella comprensione del meccanismo che guida questa malattia, ma può anche fornire marcatori biologici che possono essere utilizzati nella diagnosi clinica, nella determinazione della gravità dei sintomi, e nell'intervento terapeutico.

Informativa

Tanya K. Murphy ha ricevuto sostegno alla ricerca da parte di *All Children's Hospital Research Foundation, Astra Zeneca Neuroscience iMED, Centers for Disease Control, International OCD Foundation*

(IOCDF), National Institutes of Health, , Otsuka, Pfizer Pharmaceuticals, Roche Pharmaceuticals, Shire, Sunovion Pharmaceuticals Inc., e Tourette Syndrome Association. Dr. Murphy è nel Scientific Advisory Boards per IOCDF e PANDAS Network. Riceve un onorario da Lawrence Erlbaum. Gli altri autori non hanno nulla da dichiarare.

References

- Al-Amin MM, Nasir Uddin MM, Mahmud Reza H: Effects of antipsychotics on the inflammatory response system of patients with schizophrenia in peripheral blood mononuclear cell cultures. *Clin Psychopharmacol Neurosci* 11:144–151, 2013.
- Albanesi C, Fairchild HR, Madonna S, Scarponi C, De Pita O, Leung DY, Howell MD: IL-4 and IL-13 negatively regulate TNF-alpha- and IFN-gamma-induced beta-defensin expression through STAT-6, suppressor of cytokine signaling (SOCS)-1, and SOCS-3. *J Immunol* 179:984–992, 2007.
- American Psychiatric Association: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th ed. (Text Revision). Washington, DC: American Psychiatric Association; 2000.
- Ashwood P, Krakowiak P, Hertz-Picciotto I, Hansen R, Pessah I, Van de Water J: Elevated plasma cytokines in autism spectrum disorders provide evidence of immune dysfunction and are associated with impaired behavioral outcome. *Brain Behav Immun* 25:40–45, 2011.
- Ben-Pazi H, Stoner JA, Cunningham MW: Dopamine receptor autoantibodies correlate with symptoms in Sydenham's chorea. *PLoS One*. 8:e73516, 2013.
- Bombaci M, Grifantini R, Mora M, Reguzzi V, Petracca R, Meoni E, Balloni S, Zingaretti C, Falugi F, Manetti AG, Margarit I, Musser JM, Cardona F, Orefici G, Grandi G, Bensi G: Protein array profiling of tic patient sera reveals a broad range and enhanced immune response against Group A Streptococcus antigens. *PLoS One*. 4:e6332, 2009.
- Brown AS, Begg MD, Gravenstein S, Schaefer CA, Wyatt RJ, Bresnahan M, Babulas VP, Susser ES: Serologic evidence of prenatal influenza in the etiology of schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 61:774–780, 2004.
- Chou IC, Lin HC, Wang CH, Lin WD, Lee CC, Tsai CH, Tsai FJ: Polymorphisms of interleukin 1 gene IL1RN are associated with Tourette syndrome. *Pediatr Neurol* 42:320–324, 2010.
- Church AJ, Dale RC, Cardoso F, Candler PM, Chapman MD, Allen ML, Klein NJ, Lees AJ, Giovannoni G: CSF and serum immune parameters in Sydenham's chorea: Evidence of an autoimmune syndrome? *J Neuroimmunol* 136:149–153, 2003.
- Cosentino G, Soprana E, Thienes CP, Siccardi AG, Viale G, Vercelli D: IL-13 down-regulates CD14 expression and TNF-alpha secretion in normal human monocytes. *J Immunol* 155:3145–3151, 1995.
- Dale RC, Merheb V, Pillai S, Wang D, Cantrill L, Murphy TK, Ben-Pazi H, Varadkar S, Aumann TD, Horne MK, Church AJ, Fath T, Brilot F: Antibodies to surface dopamine-2 receptor in autoimmune movement and psychiatric disorders. *Brain* 135:3453–3468, 2012.
- Gabbay V, Coffey BJ, Guttman LE, Gottlieb L, Katz Y, Babb JS, Hamamoto MM, Gonzalez CJ: A cytokine study in children and adolescents with Tourette's disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 33:967–971, 2009.
- Giedd JN, Rapoport JL, Garvey MA, Perlmutter S, Swedo SE: MRI assessment of children with obsessive-compulsive disorder or tics associated with streptococcal infection. *Am J Psychiatry* 157:281–283, 2000.
- Hajoui O, Janani R, Tulic M, Joubert P, Ronis T, Hamid Q, Zheng H, Mazer BD: Synthesis of IL-13 by human B lymphocytes: regulation and role in IgE production. *J Allergy Clin Immunol* 114:657–663, 2004.
- Himmerich H, Schonherr J, Fulda S, Sheldrick AJ, Bauer K, Sack U: Impact of antipsychotics on cytokine production in-vitro. *J Psychiatr Res* 45:1358–1365, 2011.
- Hoshino T, Winkler-Pickett RT, Mason AT, Ortaldo JR, Young HA: IL-13 production by NK cells: IL-13-producing NK and T cells are present in vivo in the absence of IFN-gamma. *J Immunol* 162:51–59, 1999.
- Jakobsson HE, Jernberg C, Andersson AF, Sjolund-Karlsson M, Jansson JK, Engstrand L: Short-term antibiotic treatment has differing long-term impacts on the human throat and gut microbiome. *PLoS One* 5:e9836, 2010.
- Jijun L, Zaiwang L, Anyuan L, Shuzhen W, Fanghua Q, Lin Z, Hong L: Abnormal expression of dopamine and serotonin transporters associated with the pathophysiologic mechanism of Tourette syndrome. *Neurol India* 58:523–529, 2010.
- Kalanithi PS, Zheng W, Kataoka Y, DiFiglia M, Grantz H, Saper CB, Schwartz ML, Leckman JF, Vaccarino FM: Altered parvalbumin-positive neuron distribution in basal ganglia of individuals with Tourette syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:13,307–13,312, 2005.
- Khandaker GM, Stochl J, Zammit S, Lewis G, Jones PB: Childhood Epstein-Barr virus infection and subsequent risk of psychotic experiences in adolescence: A population-based prospective serological study. *Schizophr Res* 158:19–24, 2014.
- Kim EY, Priatel JJ, Teh SJ, Teh HS: TNF receptor type 2 (p75) functions as a costimulator for antigen-driven T cell responses in vivo. *J Immunol* 176:1026–1035, 2006.
- Kirvan CA, Swedo SE, Heuser JS, Cunningham MW: Mimicry and autoantibody-mediated neuronal cell signaling in Sydenham chorea. *Nat Med* 9:914–920, 2003.
- Kuhweide R, Van Damme J, Ceuppens JL: Tumor necrosis factor alpha and interleukin 6 synergistically induce T cell growth. *Eur J Immunol* 20:1019–1025, 1990.
- Leckman JF, Katsochis L, Kawikova I, Lin H, Zhang H, Kronig H, Morshed S, Parveen S, Grantz H, Lombroso PJ, King RA: Increased serum levels of interleukin-12 and tumor necrosis factor alpha in Tourette's syndrome. *Biol Psychiatry* 57:667–673, 2005.
- Leckman JF, Riddle MA, Hardin MT, Ort SI, Swartz KL, Stevenson J, Cohen DJ: The Yale Global Tic Severity Scale: Initial testing of a clinician-rated scale of tic severity. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 28:566–573, 1989.

Lerner A, Bagic A, Simmons JM, Mari Z, Bonne O, Xu B, Kazuba D, Herscovitch P, Carson RE, Murphy DL, Drevets WC, Hallett M: Widespread abnormality of the gamma-aminobutyric acid-ergic system in Tourette syndrome. *Brain* 135:1926–1936, 2012.

Lewitus GM, Pribiag H, Duseja R, St-Hilaire M, Stellwagen D: An adaptive role of TNFalpha in the regulation of striatal synapses. *J Neurosci* 34:6146–6155, 2014.

Liu S, Yi M, Wang M, Sun Y, Che F, Ma X: Association of IL8 - 251A/T, IL12B - 1188A/C and TNF-alpha - 238A/G polymorphisms with Tourette syndrome in a family-based association study in a Chinese Han population. *Neurosci Lett* 495:155–158, 2011.

Matz J, Krause DL, Dehning S, Riedel M, Gruber R, Schwarz MJ, Muller N: Altered monocyte activation markers in Tourette's syndrome: a case-control study. *BMC Psychiatry* 12:29, 2012.

Morikawa K, Zhang J, Nonaka M, Morikawa S: Modulatory effect of macrolide antibiotics on the Th1- and Th2-type cytokine production. *Int J Antimicrob Agents* 19:53–59, 2002.

Murphy TK, Storch EA, Lewin AB, Edge PJ, Goodman WK: Clinical factors associated with pediatric autoimmune neuropsychiatric disorders associated with streptococcal infections. *J Pediatr* 160:314–319, 2012.

Obregon D, Parker-Athill EC, Tan J, Murphy T: Psychotropic effects of antimicrobials and immune modulation by psychotropics: implications for neuroimmune disorders. *Neuropsychiatry (London)* 2:331–343, 2012.

Olmos G, Llado J: Tumor necrosis factor alpha: A link between neuroinflammation and excitotoxicity. *Mediators Inflamm* 2014: 861231, 2014.

Scahill L, Riddle MA, McSwiggan-Hardin M, Ort SI, King RA, Goodman WK, Cicchetti D, Leckman JF: Children's Yale-Brown Obsessive Compulsive Scale: Reliability and validity. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 36:844–852, 1997.

Swedo SE: Sydenham's chorea. A model for childhood autoimmune neuropsychiatric disorders. *JAMA* 272:1788–1791, 1994.

Tolosa L, Caraballo-Miralles V, Olmos G, Llado J: TNF-alpha potentiates glutamate-induced spinal cord motoneuron death via NFKappaB. *Mol Cell Neurosci* 46:176–186, 2011.

Williams AC, Galley HF, Watt AM, Webster NR: Differential effects of three antibiotics on T helper cell cytokine expression. *J Antimicrob Chemother* 56:502–506, 2005.

Winter C, Djodari-Irani A, Sohr R, Morgenstern R, Feldon J, Juckel G, Meyer U: Prenatal immune activation leads to multiple changes in basal neurotransmitter levels in the adult brain: Implications for brain disorders of neurodevelopmental origin such as schizophrenia. *Int J Neuropsychopharmacol* 12:513–524, 2009.

Wynn TA: IL-13 effector functions. *Annu Rev Immunol* 21:425–456, 2003.

Address correspondence to:

Tanya K. Murphy, MD, MS

Department of Pediatrics

880 6th St. South

Suite 460

St. Petersburg, FL 33701

E-mail: tmurphy@health.usf.edu