

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: SAÚDE BRASILEIRA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
NÚCLEO DE PESQUISA EM IMUNOPATOLOGIA E IMUNOLOGIA CLÍNICA**

**Harleson Lopes de Mesquita**

**EFEITOS DO  $\beta$ -CARIOFILENO SOBRE A ENCEFALOMIELITE AUTOIMUNE  
EXPERIMENTAL (EAE): ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO EM CAMUNDONGOS  
C57BL/6**

**JUIZ DE FORA**

**2019**

**Harleson Lopes de Mesquita**

**EFEITOS DO  $\beta$ -CARIOFILENO SOBRE A ENCEFALOMIELEITE AUTOIMUNE  
EXPERIMENTAL (EAE): ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO EM CAMUNDONGOS  
C57BL/6**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Brasileira da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Saúde. Área de concentração: Saúde Brasileira.

**Orientador:** Prof. Dr. Fernando Monteiro Aarestrup

**Co-orientador:** Prof. Dr. José Otávio do Amaral Corrêa

**JUIZ DE FORA**

**2019**

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Mesquita, Harleson Lopes de.

Efeitos do  $\beta$ -cariofileno sobre a encefalomielite autoimune experimental (EAE) : estudo imunoistoquímico em camundongos C57BL/6 / Harleson Lopes de Mesquita. -- 2019.

144 f.

Orientador: Fernando Monteiro Aarestrup

Coorientador: José Otávio do Amaral Corrêa

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Saúde Brasileira, 2019.

1. Esclerose múltipla. 2. Encefalomielite autoimune experimental. 3.  $\beta$ -cariofileno. I. Aarestrup, Fernando Monteiro, orient. II. Corrêa, José Otávio do Amaral, coorient. III. Título.

**Harleson Lopes de Mesquita**

**EFEITOS DO  $\beta$ -CARIOFILENO SOBRE A ENCEFALOMIELITE AUTOIMUNE  
EXPERIMENTAL (EAE): ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO EM CAMUNDONGOS  
C57BL/6**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Saúde Brasileira da Faculdade de Medicina da  
Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito  
parcial para obtenção do título de Doutor em Saúde.  
Área de concentração: Saúde Brasileira.

Avaliada em \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2019.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dra. Ana Cláudia Chagas de Paula Ladvoat  
Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF

---

Prof. Dra. Maria Inês da Cruz Campos  
Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF

---

Prof. Dra. Chislene Pereira Vanelli  
SUPREMA - Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde de Juiz de Fora - FCMS/JF

---

Prof. Dra. Rachel Rocha Pinheiro Machado  
SUPREMA - Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde de Juiz de Fora - FCMS/JF

Dedico esse trabalho a meus pais que me permitiram viver e, especialmente, a minha mãe e avó, que investiram demais das suas vidas em mim.

Dedico às pessoas que nessa vida já me abraçaram com amor.

Dedico a meu filho que, desde que surgiu, por todos os dias desde então, coloca um sorriso no meu rosto. Dedico também à mulher que me permitiu tê-lo!

## **AGRADECIMENTOS**

Ao aceitar orientar um aluno o Professor orientador demonstra confiança, afeto e crença no nosso futuro. Por isso, agradeço, em primeiro lugar, aos meus orientadores, Fernando Monteiro Aarestrup, José Otávio do Amaral Correa e Beatriz Julião Vieira Aarestrup.

Agradeço também aos amigos que fiz no CBR e aos ensinamentos técnicos que tive, além do afeto mútuo que, com certeza, cultivamos.

Não poderia deixar de lembrar dos Professores René Gonçalves de Matos e Maria Helena Braga, os dois mestres que me inspiraram para vida docente. Que os dois sejam o símbolo de gratidão que tenho a todos os mestres da minha vida, desde a infância até aos que virão.

Sem minha família e sem meus amigos seria impossível chegar até aqui. Me considero uma pessoa de sorte, pois as pessoas na minha vida, na grande maioria das vezes, somaram e contribuíram com algo. Aprendi, aos 43 anos, que as PESSOAS são o que há de mais importante. As relações humanas moldaram meu caráter, minha personalidade e me construíram como uma pessoa que, apesar das limitações e erros constantes, não cultivava mesquinhas e rancores.

Meu muito obrigado a todos...

## RESUMO

**Introdução:** A esclerose múltipla (EM) é a doença desmielinizante inflamatória mais prevalente do sistema nervoso central (SNC) no mundo. A encefalomielite autoimune experimental (EAE) é o modelo animal estabelecido para o estudo da patogênese e novas terapias para a EM. Foi demonstrado que o óleo de copaíba possui propriedades anti-inflamatórias e neuroprotetoras. O  $\beta$ -cariofileno (BCP), um dos mais importantes sesquiterpenos deste óleo, modula a expressão do fator de transcrição NF- $\kappa$ B estimulando o receptor canabinóide 2 (CB2). **Objetivo:** Os perfis de IL-17, T-bet e GATA-3 foram avaliados *in situ* no SNC. Além disso, as possíveis propriedades de remielinização estimuladas por BCP em camundongos C57BL/6 com EAE foram investigadas. **Métodos:** A EAE foi induzida em três grupos de cinco camundongos C57BL/6 fêmeas, com administração de BCP em dois grupos (25 e 50mg/kg/dia) por gavagem, após o décimo dia de indução. Aos nove dias de tratamento, os três grupos foram eutanasiados e o SNC foi removido e preservado. Nos cortes histológicos, foram feitas as técnicas de imunoistoquímica e coloração pelo método de Weigert - Pal - Russel para mielina. **Resultados:** Para o grupo BCP (50mg/kg/dia) houve redução de IL-17 no encéfalo, cerebelo e medula ( $p < 0,05$ ), diminuição na T-bet ( $p < 0,05$ ) na medula e no cerebelo e aumento de GATA-3 ( $p < 0,05$ ) no cerebelo. Observou-se remielinização e melhor organização da mielina nos dois grupos tratados com BCP ( $p < 0,001$ ). Para outros resultados não houve significância estatística em comparação com o grupo EAE (grupo BCP 25mg/Kg/dia). **Conclusão:** A presente pesquisa permitiu verificar o efeito imunomodulador do BCP sobre os aspectos inflamatórios da EAE em camundongos C57BL/6 *in situ*. Seu efeito claro sobre a diminuição da expressão de citocinas IL-17, o fator de transcrição T-bet, a forte remielinização apresentada, juntamente com o aumento do GATA-3 (cerebelo) demonstrado em nível tecidual, confirmam o potencial terapêutico para o tratamento de doenças inflamatórias e desmielinizantes, tais como EM.

**Palavras-chave:** Esclerose múltipla. Encefalomielite autoimune experimental.  $\beta$ -cariofileno.

## ABSTRACT

**Introduction:** Multiple sclerosis (MS) is the most prevalent inflammatory demyelinating disease of the central nervous system (CNS) in the world. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) is the established animal model for the study of pathogenesis and new therapies for MS. It has been shown that copaiba oil has anti-inflammatory and neuroprotective properties.  $\beta$ -caryophyllene (BCP), one of the most important sesquiterpenes of this oil, modulates expression of the transcription factor NF- $\kappa$ B by stimulating the cannabinoid receptor 2 (CB<sub>2</sub>). **Objective:** The profiles of IL-17, T-bet and GATA-3 were evaluated *in situ* in CNS. In addition, the possible remyelination properties stimulated by BCP in C57BL/6 mice with EAE were investigated. **Methods:** EAE was induced in three groups of five female C57BL/6 mice, with administration of BCP in two groups (25 and 50 mg/kg/day) by gavage, after the tenth day of induction. At nine days of treatment the three groups were euthanized and the CNS was removed and preserved. In histological sections, the techniques of immunohistochemistry and staining by Weigert - Pal – Russel's method for myelin were made. **Results:** For the BCP group (50 mg/kg/day) there was reduction of IL-17 in brain, cerebellum and medulla ( $p < 0.05$ ), decrease in T-bet ( $p < 0.05$ ) in medulla and cerebellum and increase of GATA-3 ( $p < 0.05$ ) in cerebellum. It was observed remyelination and better organization of myelin in both groups treated with BCP ( $p < 0.001$ ). For other results there was no statistical significance in comparison with EAE group (BCP 25mg/Kg/dia group). **Conclusion:** The present research allowed to verify the immunomodulatory effect of BCP on the inflammatory aspects of EAE in C57BL/6 mice *in situ*. Its clear effect on the decrease in IL-17 cytokine expression, the T-bet transcription factor, the strong remyelination presented, together with the increase in GATA-3 (cerebellum) demonstrated on tecidual level, confirms the therapeutic potential for the treatment of the inflammatory and demyelinating diseases, such as MS.

**Keywords:** Multiple sclerosis. Experimental autoimmune encephalomyelitis.  $\beta$ -caryophyllene.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição geográfica da esclerose múltipla .....	27
Figura 2: Região dos genes de MHC (HLA) humano .....	29
Figura 3: Apresentação de antígenos via MHC classe 1 .....	30
Figura 4: Apresentação de antígenos via MHC classe 2.....	31
Figura 5: Organização celular no sistema nervoso central.....	32
Figura 6: Genes HLA classe 2.....	33
Figura 7: Genes HLA classe 1.....	33
Figura 8: Representação da cadeia alfa do receptor da interleucina 7 (IL-7R $\alpha$ ). .....	35
Figura 9: Vias de sinalização desencadeadas pelo IL-7R.....	35
Figura 10: Atlas genético da EM .....	37
Figura 11: Estruturas químicas das vitaminas metabolicamente inativas D2 e D3 (a e b); O metabólito intermediário (c) de D3 (hidroxivitamina D - 25[OH]D); metabólito ativo (d) calcitriol (1,25[OH]2VD).....	38
Figura 12: Mecanismos potenciais de imunomodulação pela vitamina D .....	40
Figura 13: Imunopatogenia da EM (parte 1).....	43
Figura 14: Imunopatogenia da EM (parte 2).....	45
Figura 15: Rotas possíveis para entrada de células T no SNC .....	46
Figura 16: Diferenciação de células T CD4+ .....	50
Figura 17: Células Th1/Th17. Mecanismos de diferenciação em EM (parte 1).....	52
Figura 18: Células Th1/Th17. Mecanismos de diferenciação em EM (parte 2).....	53
Figura 19: Diferenciação de células Th17 .....	56
Figura 20: Células Th1/Th17. Mecanismos de diferenciação em EM .....	56
Figura 21: Prováveis mecanismos de atuação de mastócitos em EAE/EM .....	67
Figura 22: Figura ilustrando a espécie <i>Copaifera langsdorffii</i> .....	92
Figura 23: Estrutura do $\beta$ – cariofileno (Trans-cariofileno) .....	93
Figura 24: Representação esquemática das ações neuroprotetoras e anti-inflamatórias dos agonistas CB2. ....	94
Figura 25: Cassetes histológicos contendo partes do SNC parafinados, que foram utilizados nos experimentos. ....	100
Figura 26: Sequência de reações em imunoistoquímica .....	104

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Modelos de EAE ativa comumente utilizados e suas aplicações .....	86
Quadro 2: Efeitos adversos dos principais medicamentos para tratamento de EM...	89
Quadro 3: Escore clínico dos C57BL/6 com EAE.....	99

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1,25(OH)<sub>2</sub>VD - Calcitriol

25(OH)D - Calcidiol

ABEM - Associação Brasileira de Esclerose Múltipla

AhR - *Aryl Hydrocarbon Receptor*

APC - Células Apresentadoras de Antígeno

Balb/C - Camundongo

Bad - Proteína pró-apoptótica da família Bcl-2

BATf - Basic Leucine Zipper Transcription Fator

Bax - Proteína pró-apoptótica da família Bcl-2

Bcl-2 - *B-Cell Lymphoma 2*

BCP -  $\beta$ -cariofileno

BHE - Barreira Hemato-Encefálica

BHL - Barreira Hemato-Liquórica

Bim - Proteína pró-apoptótica da família Bcl-2

BMMCs - Mastócitos Derivados de Medula Óssea

BO - Bandas Oligoclonais

°C - Graus Celsius

C3b - Proteína C3 do Complement

CAM - Complexo de Ataque À Membrana

CBL-B - *E3 ubiquitin-protein ligase*

CB2R - Receptor Canabinoide Tipo 2

CBR - Centro de Biologia da Reprodução

CC - Quimiocina

CCL2 (MCP-1) - Quimiocina

CCL5 - Quimiocina

CCL7(MCP-3) - Quimiocina

CCR - Receptor de Quimiocina

CCR5 $\Delta$ 32 - Mutação Delta 32 em Receptor de Quimiocina

CD - Células Dendríticas

CD4 - *Cluster of Differentiation 4*

CDC25A - *Cyclin dependent kinases (Phosphatase family)*

CD58 - *Cluster of Differentiation 58*  
CEUA - Comitê de Ética no Uso De Animais  
CFA - Adjuvante Completo de Freund  
c-Kit (CD117) - *Receptor Tyrosine Kinase Protein*  
cMaf - Fator de Transcrição  
CNPase - Fosfodiesterase dos Nucleótidos Cíclicos  
Cpa3 - Carboxipeptidase A3  
CpG - *Cytosine Triphosphate Guanine Triphosphate*  
Cpn - *Chlamydia Pneumoniae*  
CRHR - Receptor de corticotropina liberada  
CXC - Quimiocina  
CYP27B1 - *Cytochrome P450 Family 27 Subfamily B Member 1 protein*  
D(1,25[OH]2VD) - Calcitriol  
d.p.i. - Dias Pós-Inoculação  
DBR1 - *HLA Class II Histocompatibility Antigen, DRB1 Beta Chain*  
DM-20 - Isoforma de PPL  
DNA - Ácido desoxirribonucleico  
DP - Alelos de HLA Classe 2  
DQ - Alelos de HLA Classe 2  
DR - Alelos de HLA Classe 2  
EAE - Encefalomielite Autoimune Experimental  
EBV – Vírus Epstein-Barr  
EDSS – *Expanded Disability Status Scale*  
ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*  
EM - Esclerose Múltipla  
EMPP - Esclerose Múltipla Primária Progressiva  
EMRR - Esclerose Múltipla Remitente Recorrente  
EMSP - Esclerose Múltipla Secundária Progressiva  
ESA - Espaço Subaraquinóide  
EUA - Estados Unidos da América  
FcεRI - *High-Affinity IgE Receptor*  
FoxP3 - *Forkhead Box P3*  
GATA-3 - GATA binding protein 3  
G-CSF - *Granulocyte-Colony Stimulating Factor*

GM3 - *Monosialodihexosylganglioside*  
GM-CSF - Fator Estimulador de Colônia de Granulócitos e Monócitos  
GPSC - Homogeneizado de Medula de Cobaia  
GQ1b - *Ganglioside Q1b*  
GWAS - *Genome-Wide Association Studies*  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - Peróxido de Hidrogênio  
HE - Hematoxilina e Eosina  
HHV-6 - Vírus Herpes Humano Tipo 6  
HLA - Antígeno Leucocitário Humano (*Human Leukocyte antigen*)  
i.p. - Intraperitoneal  
ICAM-1 - Molécula 1 de Adesão Intercelular  
IFA - Adjuvante Incompleto de Freund  
IFN-β - Interferon Beta  
IFN-γ - Interferon Gama  
Ig - Imunoglobulinas  
IL - Interleucina  
IL7R-α - Receptor Alfa de IL-7  
IL-r - Interleucina Recombinante  
IMSGC - *International Multiple Sclerosis Genetics Consortium*  
Inos - Oxido Nítrico Sintetase Induzível  
IRF-4 - Fator Regulador de Interferon 4  
IRM - Imagem de Ressonância Magnética  
IVCCe - Insuficiência Venosa Crônica Cerebroespinal  
JAK - *Janus Kinase (Tyrosine Kinases)*  
KDa - Quilodalton  
Kg - Quilograma  
KO - Nocaute  
LFA-1 (β2α1) - *Lymphocyte Function-Associated Antigen-1*  
LFA-3 - *Lymphocyte Function-Associated Antigen-3*  
LMP - Leucoencefalopatia Multifocal Progressiva  
LPS - lipopolissacáride  
LT - Linfócito T  
LTA - Linfócito T auxiliar  
LTC - Linfócito T citotóxico

MAG - Glicoproteína Associada à Mielina  
MBP - Proteína Básica de Mielina  
MCL-1 - *Induced Myeloid Leukemia Cell Differentiation Protein*  
MCP-1 - Proteína Quimotática de Monócitos  
mg - Miligrama  
MG - Minas Gerais  
MHC - Complexo Principal de Histocompatibilidade  
 $\mu$ l - Microlitro  
MLC - Cadeias leves de miosina fosforiladas  
MIP-2 - Proteína 2 Inflamatória de Macrófagos  
MM - Mastócitos de Mucosas  
mm - milímetro  
MMP-3 - Metaloprotease de Matriz 3  
MOBP - Proteína Básica Oligodendrocítica Associada à Mielina  
MOG - Glicoproteína de Oligodendrócitos de Mielina  
MSIF - Federação Internacional de Esclerose Múltipla  
MT - Mucosa Intestinal  
MTC - Mastócitos de Tecido Conectivo  
MTQ - Mastócitos que possuem triptase e quinase  
NF-kappa  $\beta$  - Factor Nuclear Kappa  $\beta$   
NIH - *National Institute Health*  
NK- *Natural Killer*  
NKT- *Natural Killer T*  
NO - Óxido Nítrico  
OMS - Organização Mundial de Saúde  
OSP - Glicoproteína Específica Oligodendrocitária  
OVA - Ovalbumina  
OX40 - *Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 4 (TNFRSF4; CD134)*  
 $p$  - Probabilidade de Significância  
p27Kip - *Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor*  
P450 - Citocromo  
PAF - Fator de Ativação Plaquetária  
PBM - Proteína Básica de Mielina  
PBMC - Células Mononucleares de Sangue Periférico

PBS - Salina Tamponada com Fosfato  
PCD1 - Receptor de Indução de Morte Celular Programada  
PETOX – Pentoxifilina  
pH – Concentração de íons hidrogênio  
PI3K - Fosfolipídios de membrana e ativação de PI3-quinase  
PLP - Proteína Lipoproteica  
POP - Procedimento Operacional Padrão  
PP - Primária Progressiva  
PPL - Proteína Proteolipídica  
PR - Progressiva Recorrente  
PSN - Polimorfismo Singular de Nucleotídeo  
RANTES (CCL5) - *Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*  
RNA - Ácido Ribonucleico  
ROR $\alpha$  - Fator de Transcrição  
ROR $\gamma$ t - Fator de Transcrição  
ROS - Espécies Reativas de Oxigênio  
RR - Remitente Recorrente  
rs2300747<sup>G</sup> - Alelo do Gene CD58  
s.c - Sub-cutânea  
SBCAL - Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório  
SJL/J - Rato  
SM-GCer - Glucosilceramida Esfingomielina Desacilase  
SNC - Sistema Nervoso Central  
SNP - Single-Nucleotide Polymorfism  
SP - Secundária Progressiva  
STAT - *Signal Transducer and Activator of Transcription*  
tal-H - Transaldolase-H  
T-bet - *T-box Transcription Factor*  
TC - *Trans-caryophyllene*  
TCR - Receptores de Células T  
TGF- $\beta$  - *Transforming Growth Factor Beta*  
Th - Linfócitos T-helper  
TNF- Fator de Necrose Tumoral  
TLR - *Toll like receptor*

TNF- $\alpha$  - Fator de Necrose Tumoral Alfa  
TIM 3 - *T cell immunoglobulin mucin domain 3 receptor*  
Treg - Linfócito T Regulador  
UFJF - Universidade Federal de Juiz de Fora  
USA - *United States of America*  
VCAM-1 - *Vascular Cell Adhesion Protein 1*  
VDRs - Receptores para vitamina D  
VEGF - Vascular Endothelial Growth Factor  
VLA-4 ( $\beta 1\alpha 4$ ) - *Very Late Antigen-4 (Integrin  $\alpha 4\beta 1$ )*  
V $\alpha$ 24j $\alpha$ Q - Receptor TCR de Cadeia Alfa 24 j Alfa  
v $\gamma$ 1 - Subtipo de Célula  $\gamma\delta$ T  
v $\gamma$ 2 - Subtipo de Célula  $\gamma\delta$ T  
WT - Wild type  
 $\gamma\Delta$  - Gama Delta  
 $\gamma\delta$ T - Gama Delta T  
% - Porcentagem

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>22</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>25</b>
2.1 ESCLEROSE MÚLTIPLA (EM) .....	25
<b>2.1.1 Epidemiologia e fatores de risco para EM</b> .....	<b>26</b>
2.1.1.1 Fatores geográficos.....	26
2.1.1.2 Fatores sexuais .....	28
2.1.1.3 Genética .....	28
2.1.1.3.1 <i>Complexo principal de histocompatibilidade humano (MHC) → (Human Leukocyte Antigens - HLA) e EM</i> .....	29
2.1.1.3.2 <i>Genes não-HLA</i> .....	34
2.1.1.3.2.1 <i>Gene IL-7R</i> .....	34
2.1.1.3.2.2 <i>Gene CD58</i> .....	36
2.1.1.3.2.3 <i>Gene IL2RA</i> .....	36
2.1.1.4 Exposição à luz solar.....	37
2.1.1.5 Vitamina D.....	38
2.1.1.6 Agentes infecciosos.....	40
<b>2.1.2 Fisiopatologia</b> .....	<b>42</b>
2.1.2.1 Aspectos Fisiopatológicos Gerais .....	42
2.1.2.2 Células T CD4+ .....	48
2.1.2.2.1 <i>Células Th17</i> .....	54
2.1.2.3 Células $\gamma\delta$ T .....	59
2.1.2.4 Células APC para CD4+.....	60
2.1.2.5 Células T CD8 .....	61
2.1.2.6 Células B e anticorpos.....	62
2.1.2.7 Imunidade inata e seus mecanismos na EM .....	64
2.1.2.8 Mastócitos .....	65
2.1.2.9 Neutrófilos .....	72
2.1.2.10 Células <i>natural killer</i> (NK).....	73
2.1.2.11 Células NKT .....	73
2.1.2.12 Macrófagos e radicais livres de oxigênio.....	74

2.1.2.13 Complemento .....	75
2.1.2.14 Citocinas.....	75
2.1.2.15 Quimiocinas.....	77
2.1.2.15.1 Sangue .....	78
2.1.2.15.2 Líquor .....	78
2.1.2.15.3 Lesões cerebrais .....	79
2.2 ANTÍGENOS DE MIELINA .....	79
<b>2.2.1 Proteína básica de mielina (PBM) .....</b>	<b>80</b>
<b>2.2.2 Proteína proteolipídica (PPL) .....</b>	<b>80</b>
<b>2.2.3 Glicoproteína de mielina dos oligodendrócitos (MOG).....</b>	<b>80</b>
<b>2.2.4 Outros antígenos mielínicos e não mielínicos para LTCD4+ .....</b>	<b>81</b>
2.2.4.1 Glicoproteína associada a mielina (MAG) .....	81
2.2.4.2 Nucleotídeo cíclico 3' fosfodiesterase (CNPase).....	81
2.2.4.3 Proteína básica de mielina de oligodendrócito (MOBP) .....	82
2.2.4.4 Glicoproteína específica de oligodendrócito (OSP) .....	82
2.2.4.5 $\alpha$ - $\beta$ Cristallin ( $\alpha$ - $\beta$ -C).....	82
2.2.4.6 Proteína S100 $\beta$ .....	83
2.2.4.7 Transaldolase-H (Tal-H).....	83
2.2.4.8 Imunoglobulinas como antígenos T.....	84
2.2.4.9 Componentes lipídicos como antígenos para células T CD4+ em EM.....	84
2.3 ENCEFALOMIELEITE AUTOIMUNE EXPERIMENTAL .....	84
2.4 TRATAMENTOS PARA A ESCLEROSE MÚLTIPLA.....	86
2.5 O USO DE PRODUTOS NATURAIS COMO PROTÓTIPOS PARA NOVOS FÁRMACOS.....	90
<b>2.5.1 Produtos Naturais anti-inflamatórios .....</b>	<b>90</b>
2.5.1.1 O óleo de Copaíba e o $\beta$ -cariofileno (BCP).....	91
<b>3 HIPÓTESE .....</b>	<b>96</b>
<b>4 OBJETIVOS.....</b>	<b>97</b>
4.1 OBJETIVO GERAL .....	97
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	97
<b>5 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>98</b>

5.1 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO .....	98
5.2 PROCEDIMENTOS DE INDUÇÃO .....	98
5.3 COLETA E PREPARO DE MATERIAL PARA ANÁLISE HISTOLÓGICA .....	99
5.4 DESPARAFINIZAÇÃO .....	100
5.5 COLORAÇÕES HISTOLÓGICAS .....	101
<b>5.5.1 Hematoxilina e Eosina .....</b>	<b>101</b>
<b>5.5.2 Hematoxilina Férrica de Weigert – Pal – Russel .....</b>	<b>102</b>
5.6 IMUNOISTOQUÍMICA.....	103
5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	104
<b>6 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>105</b>
<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>106</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>107</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A Esclerose Múltipla (EM) é uma doença autoimune do sistema nervoso central (SNC) de evolução crônica e progressiva, caracterizada por inflamação focal, desmielinização e dano axonal. Sua etiologia ainda não foi completamente definida, mas os modelos mais atuais de pesquisa propõem que sua patogênese se desenvolva a partir de fatores genéticos e ambientais (SOSPEDRA; MARTIN, 2005; KAKALACHEVA; LUNEMANN, 2011; ELLIOTT 2012; FONTES, et al., 2014; DIDONNA; OKSENBERG, 2017).

Entre as doenças inflamatórias autoimunes, a EM é a mais comum, afetando mais de 2,5 milhões de pessoas no mundo, principalmente mulheres. Contudo, no Brasil, estudos de prevalência são escassos (foram relatados 14 casos para cada 100.000 habitantes em São Paulo em 1997 e 5 para 100.000 habitantes no Rio de Janeiro em 1999 (ROSATI, 2001).

O diagnóstico precoce ainda é difícil e, na ausência de uma prova imunológica específica, os critérios para diagnóstico da EM são baseados na anamnese, no exame físico do paciente, na análise do líquido cefalorraquidiano, por imagem de ressonância magnética (IRM), por dosagem de anticorpos e por estudos eletrofisiológicos. Os sintomas são variados e incluem: fraqueza muscular e de extremidades, ataxia, espasticidade, fadiga debilitante, parestesia, vertigem, comprometimento visual, comprometimento cognitivo, disfunção do intestino e da bexiga, além de problemas emocionais e sexuais, podendo levar ao óbito após anos (MILLER et al., 2005; AKKUS; AKDEMIR, 2012).

Os processos que levam ao desenvolvimento da EM ainda devem ter seus detalhes esclarecidos, mas o envolvimento de linfócitos T CD4+ com o fenótipo Th1, produtores de citocinas inflamatórias e angiogênicas, como TNF- $\alpha$ , IL-6 e o fator de crescimento endotelial vascular (*vascular endothelial growth factor* - VEGF), além de macrófagos e mediadores inflamatórios solúveis, foram apontados por vários autores como importantes no desenvolvimento da doença (FURLAN et al., 2004; BALABANOV et al., 2006; PUGLIATI et al., 2006; PÉPIN et al., 2009; DIDONNA; OKSENBERG, 2017).

A dicotomia Th1/Th2, até então aceita na imunopatogênese de doenças como EM e em seu modelo experimental, a encefalomielite autoimune experimental (EAE),

falha em explicar toda a complexidade desses processos. A caracterização do fenótipo Th17, produtor de interleucina 17 (IL-17) e sua demonstração como participante na fisiopatologia dessas doenças ampliou consideravelmente o campo de pesquisa e as possibilidades terapêuticas nessas áreas (ILLES et al., 2005; ARANAMI; YAMAMURA, 2008; TENIENTE-SERRA; RAMO-TELLO; MARTINEZ-CACERES, 2017).

Muito do que se sabe hoje sobre a resposta imunológica e tratamentos na EM é devido a estudos desenvolvidos em modelos experimentais (animais). Como citado anteriormente, a EAE é o modelo usado por vários pesquisadores quando se deseja investigar novas possibilidades de tratamento para a EM devido à grande correlação imunológica entre ambas. Nesse modelo, animais como ratos (Lewis, Dark About) e camundongos (SJL, Balb/C e C57) são frequentemente usados nos experimentos (LEE et al., 1993; RUULS et al., 1996; LEADBETTER et al., 1998; MOHAMED et al., 2004; PAPENFUSS et al., 2004).

A EAE pode ser induzida em animais geneticamente susceptíveis pela imunização com antígenos de mielina emulsificados em adjuvante apropriado, sendo a resposta mediada por células T mielina-específicas ativadas na periferia e que se deslocam até o SNC, onde ocorre a permeabilização da barreira hematoencefálica (BHE) pelas células T ativadas. Este modelo animal também pode ser induzido pela transferência adotiva de células T CD4<sup>+</sup> específicas para mielina de animais isogênicos com EAE para animais saudáveis (FLETCHER et al., 2010; CHASTAIN et al., 2011).

Já que o processo inflamatório imunologicamente mediado é o responsável pelos danos neurológicos envolvidos na fisiopatologia da EM e de seu modelo experimental, os tratamentos iniciais utilizaram corticoides, até hoje usados para acelerar o processo de recuperação pós surto. Contudo, apresentam uma série de efeitos adversos a longo prazo tais como: maior susceptibilidade a infecções, hipertensão, fraqueza muscular, maior risco de diabetes, insônias, osteoporose, Síndrome de Cushing, erupção cutânea pustular, exacerbação gástrica e duodenal de úlceras e, em casos raros, risco de sangramento gástrico (TILBERY et al., 2005; VIRLEY, 2005; BISAGA, et al., 2012).

As limitações do uso de glicocorticoides levaram ao desenvolvimento de imunomoduladores para que os mesmos fossem substituídos. Drogas como interferon (IFN- $\beta$ ) e acetato glatiramer são muito utilizadas, mas possuem limitações como

primeira linha de tratamento, além de serem pouco eficazes também em pacientes com a forma clínica remitente-recorrente (forma mais comum). Outras limitações das terapias imunossupressoras são seus efeitos adversos e alto custo (FLETCHER et al., 2010; MIX et al., 2010; MORRIS; YÂNNIKAS, 2012).

Devido a todas estas limitações citadas anteriormente, se justificam as pesquisas por drogas mais seguras, eficazes clinicamente e mais baratas para tratamento de doenças como a EM. Com esses objetivos anteriormente citados, diversos fitoterápicos com potencial terapêutico têm sido investigados (YAMAGUCHI; GARCIA, 2012).

O  $\beta$ -cariofileno (BCP), ou trans-cariofileno, é um importante componente do óleo de copaíba, extraído do tronco de árvores brasileiras (*Copaífera langsdorffii*, *Leguminosae*). Esse óleo, já utilizado popularmente por suas propriedades antirreumáticas e anti-inflamatórias, demonstrou ser capaz de levar à melhora clínica animais induzidos para EAE quando tratados com variadas concentrações desse fitoterápico por gavagem (FERNANDES et al., 2007; YAMAGUCHI; GARCIA, 2012; KLAUKE, 2014; FONTES et al., 2017).

Diante do exposto, a presente proposta visou verificar os efeitos do BCP na remielinização e avaliar no infiltrado inflamatório a produção *in situ* de IL-17 e a presença de células Th1 e Th2 via expressão de fatores de transcrição T-bet e GATA-3 durante o desenvolvimento do modelo experimental de EAE em camundongos C57BL/6.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 ESCLEROSE MÚLTIPLA (EM)

A EM é uma doença autoimune, desmielinizante e crônica que se desenvolve no SNC, sendo mais comum em jovens. É uma condição complexa e heterogênea devido ao envolvimento de diversos processos fisiopatológicos que incluem inflamação, dano axonal, desmielinização e mecanismos de reparo. Portanto, é uma doença de evolução progressiva e imprevisível (MACHADO et al., 2012).

O termo “*sclérose em plaques disseminées*” que nomearia a doença foi usado pela primeira vez em 1868 para descrever o acúmulo de células inflamatórias com distribuição perivascular no cérebro e medula espinhal de pacientes com disfunções neurológicas intermitentes (CHARCOT, 1868).

A demonstração de que EM é uma doença autoimune, muitas vezes desmielinizante em mamíferos, que se desenvolve logo após imunização com proteínas de mielina (SNC), foi feita pela primeira vez por Thomas Rivers no Instituto Rockefeller em 1933. Sua metodologia consistia em injetar, de forma repetida, preparados de cérebro de coelho e medula em primatas. Suas descobertas levaram à hipótese de que EM é uma doença autoimune secundária a uma resposta imune a antígenos próprios em um hospedeiro geneticamente susceptível (RIVERS; SPRUNT; BERRY, 1933; HAFNER, 2004).

A natureza inflamatória da EM foi demonstrada em 1948, por Elvin Kabat, que detectou elevações dos níveis de imunoglobulinas oligoclonais em líquido de pacientes com essa doença. O caráter genético da doença foi corroborado na metade do século passado por estudos envolvendo gêmeos com EM (MACKAY; MYRIANTHOPOULOS, 1966; WILLIAMS et al., 1980; HELTBERG; HOLM, 1982).

O processo de desmielinização é desenvolvido por mecanismos patológicos diversos, incluindo quebra da BHE, destruição de camada de mielina, destruição e morte de oligodendrócitos, lesões axonais, formação de cicatrizes gliais e infiltração de células T autorreativas, macrófagos, células da micróglia, células endimárias, astrócitos e mastócitos (ELIEH-ALI-KOMI; CAO, 2017).

### 2.1.1 Epidemiologia e fatores de risco para EM

A etiologia da EM ainda não é bem compreendida, mas muitas evidências sugerem que se desenvolva em indivíduos susceptíveis geneticamente, podendo necessitar também de fatores ambientais para seu desenvolvimento (MACHADO et al., 2012; ONTANEDA et al., 2012).

Muitos estudos apontam que fatores sociais, nutrição (deficiência de vitaminas imunorreguladoras como A e D e importantes para síntese de mielina como B12), exposição à luz solar, exercício, estresse e condições de higiene podem precipitar a EM e modular a taxa de progressão. É importante ressaltar que os dados disponíveis na literatura não permitem concluir de forma definitiva a importância real de cada fator de risco citado (MUNGER, et al., 2004; MACHADO et al., 2012; FILIPPI; PREZIOSA; ROCCA, 2013).

#### 2.1.1.1 Fatores geográficos

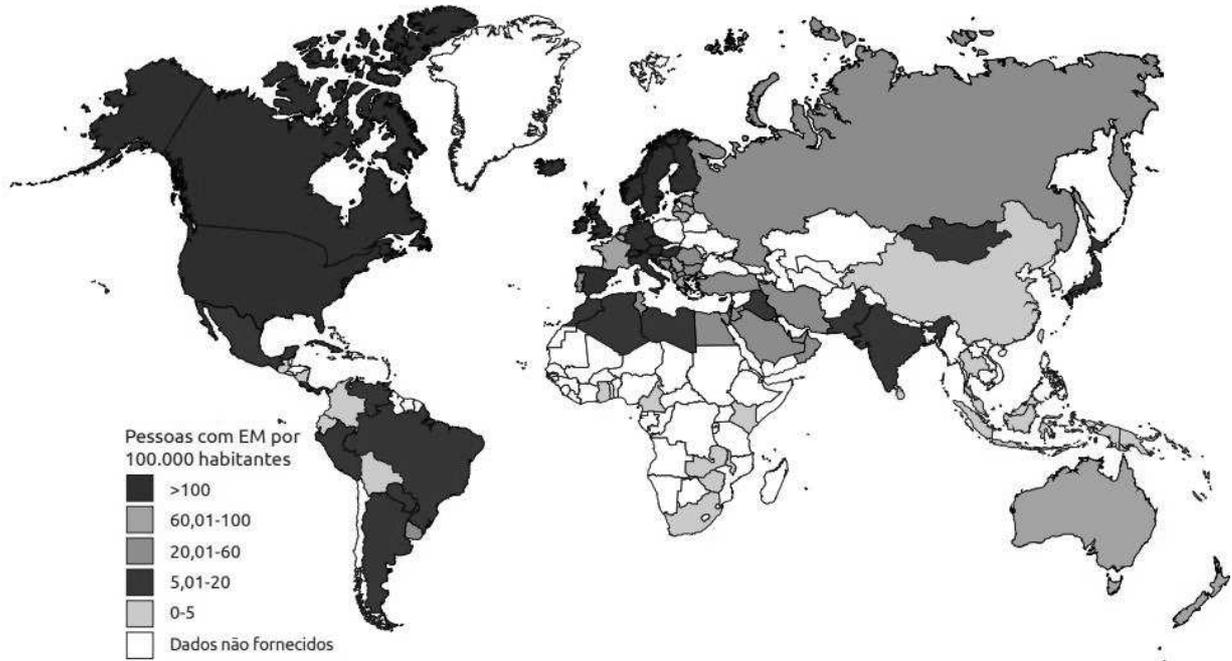
Os estudos epidemiológicos realizados entre 1920 e 1940 na Irlanda, Suíça, Estados Unidos da América, Canadá e Itália estabeleceram um gradiente de maior prevalência em áreas de clima temperado e, nessas regiões, a incidência e prevalência da EM aumentam com a latitude (OLIVEIRA; SOUZA, 1998; RAMAGOPALAN; SADOVNICK, 2011).

Os efeitos da migração entre regiões de alto e baixo risco geográfico para EM foram examinados em diversas populações. Esses estudos demonstraram que o risco para EM é influenciado em certa medida pelo país de origem do migrante e, quando essa migração acontece após adolescência, o risco é mantido de acordo com o país de origem. Por outro lado, se a migração acontecer antes da adolescência, dados mostram que o risco se torna semelhante ao do país destino (RAMAGOPALAN; SADOVNICK, 2011).

A Associação Brasileira de Esclerose Múltipla (ABEM) divulgou recentemente um mapeamento inédito da EM no mundo, desenvolvido pela Federação Internacional de Esclerose Múltipla (MSIF), em parceria com a mesma ABEM e outras associações,

em mais de 100 países. O levantamento mapeou 2,3 milhões de pessoas com EM em 2013, em todas as regiões do globo (Figura 1).

**Figura 1:** Distribuição geográfica da esclerose múltipla



**Fonte:** MULTIPLE ESCLEROSIS INTERNATIONAL FEDERATION, 2013.

A América do Sul é considerada região de baixa prevalência (menos de 5 casos por 100.000 habitantes). No Brasil existem apenas dados epidemiológicos regionais, que demonstram variação de prevalência segundo área geográfica. Na região Nordeste (área mais próxima da linha do Equador) a prevalência é de 10 casos por 100.000 habitantes. Na região Sudeste (dados de São Paulo, Santos, Belo Horizonte, Uberaba, Botucatu e Sorocaba), essa prevalência aumenta para 12 a 18 por 100.000 habitantes. Na região Centro-oeste varia desde 4,41 até 19 para 100.000 habitantes e, na região Sul, a prevalência é a maior do país, variando entre 14 a 27 por 100.000 habitantes (MACHADO et al., 2012).

### 2.1.1.2 Fatores sexuais

A literatura demonstra um progressivo aumento na incidência e prevalência em EM no mundo. Se esse aumento é completamente real ou resultado de melhores recursos para diagnóstico ainda deve ser esclarecido. Contudo, uma elevação, principalmente no sexo feminino de EM, tem sido documentada. Estudos epidemiológicos mostram elevação na razão mulheres/homens com EM de 1.9 a 3.2 em indivíduos nascidos de 1931 a 1980. Os fatores que tornam o ano de nascimento um preditor significativo em relação à razão mencionada anteriormente devem ser investigados (RAMAGOPALAN; SADOVNICK, 2011).

### 2.1.1.3 Genética

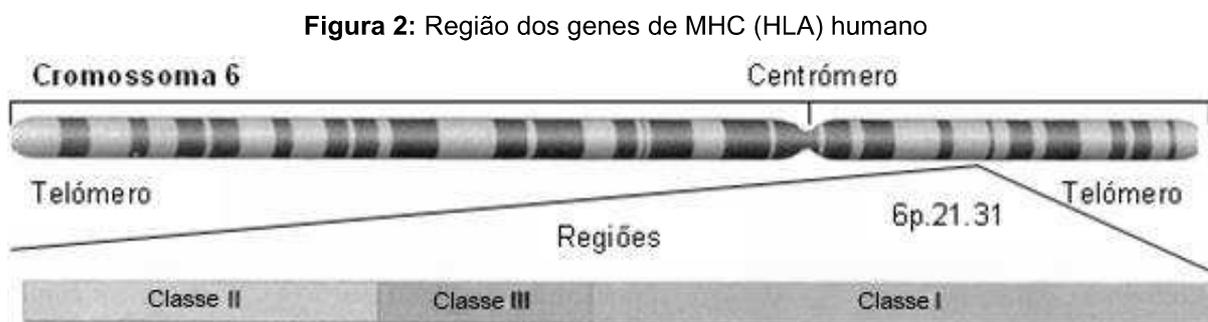
A importância dos fatores genéticos na susceptibilidade à EM foi demonstrada por estudos epidemiológicos. Estudos familiares de risco relativo de pacientes com a doença revelaram que parentes de primeiro grau de portadores da doença apresentam 15 a 35 vezes mais chance de desenvolver a doença em comparação com a população geral (RAMAGOPALAN; SADOVNICK, 2011).

Evidências robustas apontam para associação de fatores genéticos pelo fato de que a doença se apresenta em concordância de 5% de irmãos dizigóticos do mesmo sexo e 20 a 30% entre irmãos homogizóticos em comparação com a prevalência de 1 para 1000 nas populações do nordeste europeu (ONTANEDA et al., 2012).

Registros epidemiológicos canadenses demonstraram números semelhantes aos anteriores, com gêmeos homozigóticos apresentando risco elevado (28,4%) em relação a gêmeos dizigóticos (5,6%) para EM (BRYNEDAL; HILLERT, 2011).

### 2.1.1.3.1 Complexo principal de histocompatibilidade humano (MHC) → (Human Leukocyte Antigens - HLA) e EM

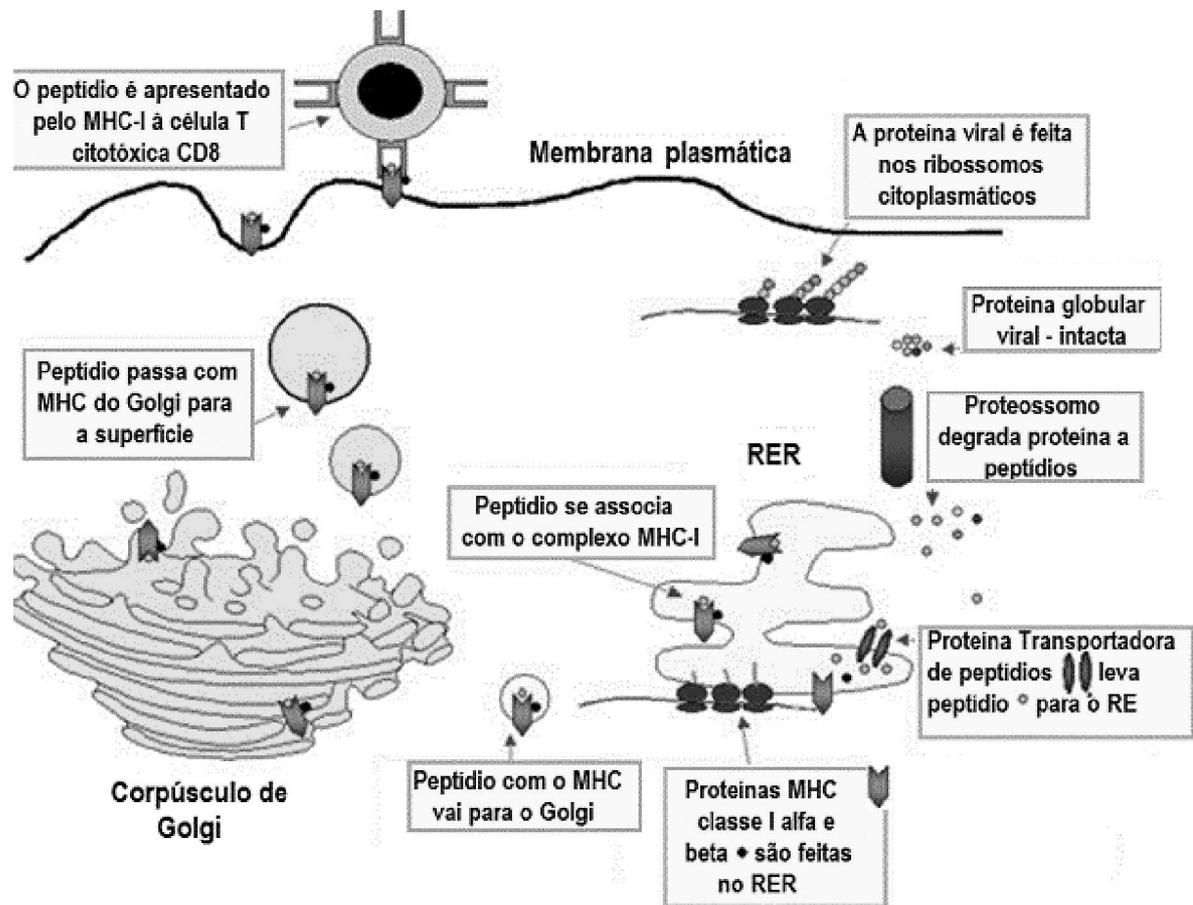
As primeiras variantes genéticas associadas à EM são alelos do HLA humano (Figura 2). O HLA humano, no braço curto do cromossomo 6, contém mais de 250 genes divididos em duas classes com funções imunológicas (BRYNEDAL; HILLERT, 2011; DIDONNA; OKSENBORG, 2017).



**Fonte:** SERVIÇO ESPECIALIZADO DE EPIDEMIOLOGIA E BIOLOGIA MOLECULAR, 2018.

As moléculas de classe 1 são regiões compostas pelos genes HLA -A, HLA-B e HLA-C. Os aminoácidos codificados por esses genes formam heterodímeros com  $\beta$ -2 microglobulina, proteína codificada pelo cromossomo 15 (Figura 3). Essas moléculas são expressas em células nucleadas e possuem a função primária de apresentar peptídeos às células com atividade citotóxica (BRYNEDAL; HILLERT, 2011; HUNT, 2015; DIDONNA; OKSENBORG, 2017).

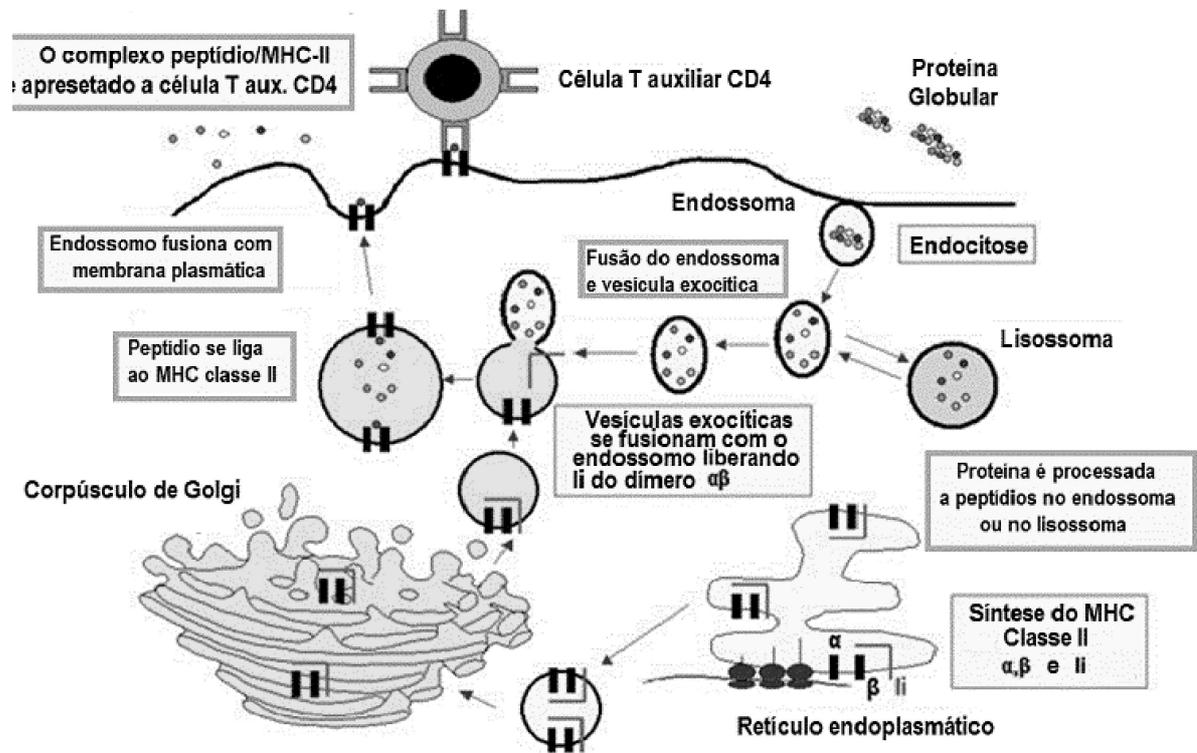
Figura 3: Apresentação de antígenos via MHC classe 1



Fonte: HUNT, 2015.

A segunda classe de genes HLA consiste em HLA -DR, -DQ e -DP, que codificam moléculas de classe 2. Essas moléculas apresentam peptídeos à linfócitos T CD4+ e são expressas em células apresentadoras de antígeno (APC) durante a homeostase, podendo surgir em outras células nucleadas durante o processo inflamatório (Figura 4) (HEMMER et al., 1997; BRYNEDAL; HILLERT, 2011; HUNT, 2015).

**Figura 4:** Apresentação de antígenos via MHC classe 2

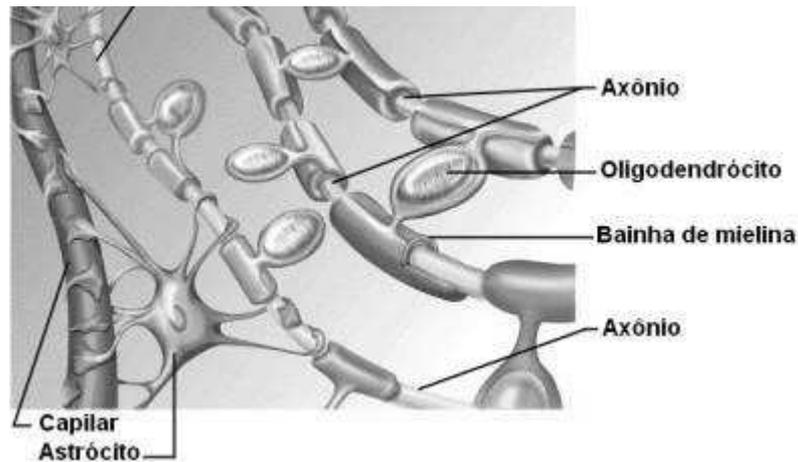


Fonte: HUNT, 2015.

Em relação ao SNC, observou-se que os astrócitos normalmente não expressam moléculas de HLA classe 2, mas podem ser induzidos a expressá-las por citocinas como IL-1, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (Figura 5). Já os neurônios e oligodendrócitos não expressam moléculas HLA e, aparentemente, são estimulados por citocinas para essa expressão (WEBER et al., 1994; WUCHERPFENNIG, 1994).

Foram demonstradas também a existência de células fagocíticas expressando MHC de classe 2 ao redor dos vasos sanguíneos no cérebro e parênquima do SNC de pessoas saudáveis, correspondendo, possivelmente, às células da micróglia. Tais células são muito semelhantes aos macrófagos, possuindo receptores para imunoglobulinas e para o fragmento C3b do complemento (SMITH; SOMMER, 1992).

**Figura 5:** Organização celular no sistema nervoso central

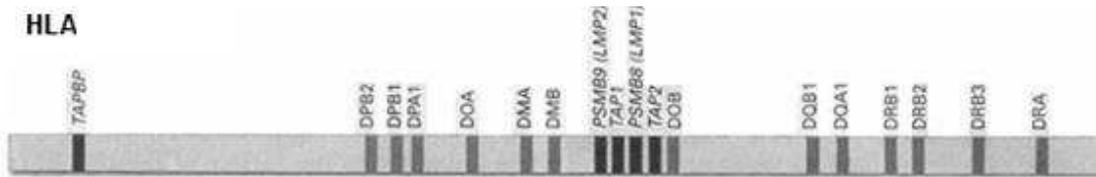


**Fonte:** CÉLULAS DE SCHWANN E CÉLULAS DA GLIA, 2008-2018.

Genes HLA são altamente polimórficos, com mais de 15.000 alelos identificados até o momento. O primeiro relato da importância do HLA em relação à susceptibilidade para EM foi publicado em 1972, quando glicoproteínas de superfície codificadas por HLA-A3 e HLA-B7 foram encontrados em alta concentração em pacientes com EM por sorologia (JERSILD; FOG, 1972; JERSILD et al., 1973; DIDONNA; OKSENBERG, 2017).

Apesar das primeiras associações terem sido demonstradas para alelos de classe 1, HLA-A e HLA-B, estudos mais aprofundados demonstraram que a maior susceptibilidade está ligada à HLA-DRB1, locus na região de classe 2 do MHC (Figura 6). O alelo HLA-DRB1\*15:01 é o mais implicado. Entretanto, complexas relações hierárquicas entre alelos, inclusive com sinais de proteção, especificamente em locus de região de classe 1 também foram documentados (Figura 7) (RAMAGOPALAN; MORRIS; DYMENT, 2007; DIDONNA; OKSENBERG, 2017).

Populações portadoras do alelo DRB1\*15 predominam no norte da Europa e América, correlacionando positivamente a presença do mesmo com a prevalência de EM (EBERS, 2008; DIDONNA; OKSENBERG, 2017).

**Figura 6:** Genes HLA classe 2

Fonte: SERVIÇO ESPECIALIZADO DE EPIDEMIOLOGIA E BIOLOGIA MOLECULAR, 2018.

Usando dados de estudos globais de genoma (*Genome-wide Association Studies – GWAS*), o Consórcio Internacional de Estudos Genéticos para Esclerose Múltipla (*International Multiple Sclerosis Genetics Consortium – IMSSGC*) reportou, em 2013, o isolamento de 11 fatores independentes na região de MHC: seis alelos HLA-DRB1 e um alelo HLA-DPB1 na região centromérica em classe 2; um alelo HLA-A e dois HLA-B na região telomérica em classe 1 (Figura 7) e um alelo em região de classe 3 (DIDONNA; OKSENBERG, 2017).

Mais recentemente, a análise de polimorfismo singular de nucleotídeo (PSN) (*single-nucleotide polymorphism – SNP*) na região do MHC em população europeia, demonstrou alelos protetores de HLA de classe 1 (A\*02:01; B\*44:02; B\*38:01 e B\*55:01) que, agora se somam aos já conhecidos alelos de risco de HLA classe 2 (DRB1\*15:01; DRB1\*13:03; DRB1\*03:01; DRB1\*08:01 E DQB1\*03:02). Também foram demonstradas evidências de interação entre pares de alelos de classe 2 (DQA1\*01:01 – DRB1\*15:01 e DQB1\*03:01 – DQB1\*03:02). Estudos multicêntricos no futuro serão capazes de encontrar novos alelos independentes ou interativos que tenham importância para EM (FOGDELL-HAHN et al., 2000; RAMAGOPALAN; MORRIS; DYMENT, 2007; BRYNEDAL; HILLERT, 2011; ONTANEDA et al., 2012; DIDONNA; OKSENBERG, 2017).

**Figura 7:** Genes HLA classe 1

Fonte: SERVIÇO ESPECIALIZADO DE EPIDEMIOLOGIA E BIOLOGIA MOLECULAR, 2018.

Como verificado anteriormente, está claro no momento que vários fatores independentes em relação à susceptibilidade para EM estão dentro da região HLA. Todavia, ainda não é possível avaliar se esses genes influenciam também as

características de evolução da doença. Alelos de ambas as regiões (classes 1 e 2) foram testados em relação à variabilidade clínica dos pacientes, mas os resultados foram inconsistentes. A única relação forte encontrada é que HLA-DRB1\*15 presente significa um início mais precoce da doença (cerca de 18 meses) em comparação a outros alelos (SMESTAD; BRYNEDAL; JONASDOTTIR, 2007; BRYNEDAL; HILLERT, 2011).

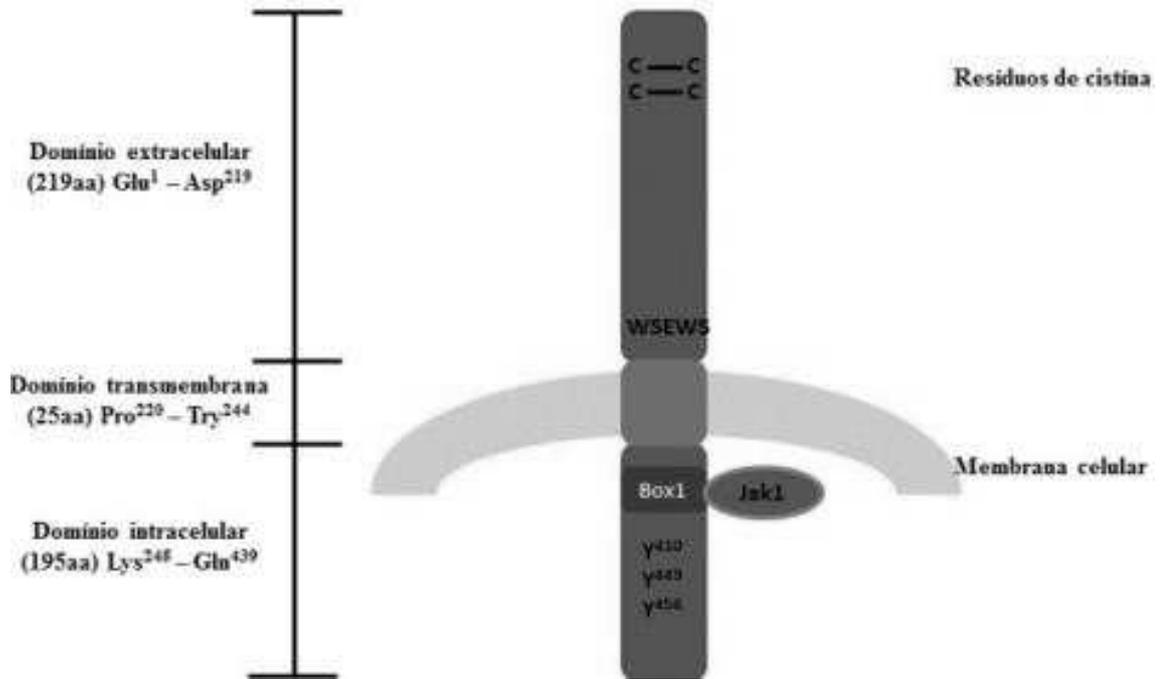
Estudo envolvendo 1457 pacientes com EM genotipados para HLA-DRB1 e HLA-A e avaliados quanto à idade de início da doença, seu curso e severidade (medido em escore clínico), demonstrou que apenas os portadores do alelo DRB1\*15 tiveram diferenças em relação a esses parâmetros (SMESTAD; BRYNEDAL; JONASDOTTIR, 2007; BRYNEDAL; HILLERT, 2011).

#### 2.1.1.3.2 Genes não-HLA

##### 2.1.1.3.2.1 Gene IL-7R

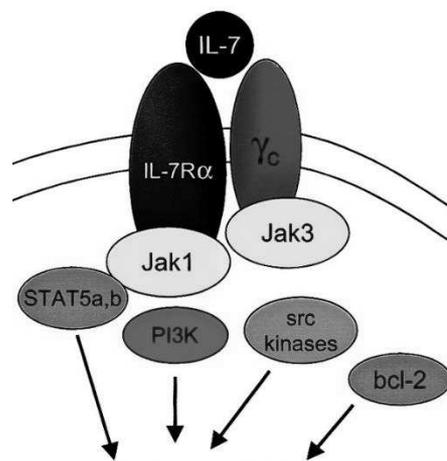
O gene IL-7R foi o primeiro fator de risco não HLA identificado. Codifica a cadeia alfa de IL7R que é vital para sinalização de IL-7. A interação IL-7/IL-7R $\alpha$  é importante para a manutenção de células T de memória, proliferação de células B e T (especialmente células T $\gamma\Delta$ ) presentes nas regiões com aspecto inflamatório em pacientes com EM. A molécula IL7R- $\alpha$  é também parte do receptor de linfopoetina do estroma tímico, que é importante para o desenvolvimento e amadurecimento de células dendríticas (CD). O alelo C, mais associado ao PSN, aumenta a proporção de forma solúvel e membranar de IL7R- $\alpha$ , através da disrupção de um domínio transmembranar, evidente em células T e em CD (Figura 8). Além disso, IL-7R $\alpha$  solúvel apresentou capacidade de inibir atividade de células T CD8<sup>+</sup> (Figura 9) (TERRY; MACKALL, 2002; CRAWLEY et al., 2010; BRYNEDAL; HILLERT, 2011; NISCHWITZ; MÜLLER-MYHSOK; WEBER, 2011; DIDONNA; OKSENBERG, 2017).

**Figura 8:** Representação da cadeia alfa do receptor da interleucina 7 (IL-7R $\alpha$ ).



Fonte: ZENATTI, 2012.

**Figura 9:** Vias de sinalização desencadeadas pelo IL-7R $\alpha$ <sup>1</sup>



Fonte: TERRY; MACKALL, 2002.

<sup>1</sup> Durante o desenvolvimento das células T no timo, a sinalização desencadeada pela IL-7 participa do rearranjo gênico do TCR através da demetilação do DNA e acetilação da histona (esquerda). Em todas as células T, a sinalização mediada por IL-7 é iniciada através de JAK1, JAK3 e PI3K, resultando na fosforilação de fatores de transcrição, como STAT5. Isto resulta em mudanças na expressão de membros da família BCL-2, tais como aumento na expressão de BCL-2 e MCL-1 e diminuição na expressão de Bax, Bim e Bad (proteínas pró-apoptóticas). A sinalização iniciada por IL-7 também leva à diminuição nos níveis de p27Kip (supressor tumoral), aumento nos níveis de CDC25A e mudanças na expressão dos moduladores de TCR como CBL-B. O resultado das vias de sinalização disparadas por IL-7 é aumento na sobrevivência celular, na proliferação, nos sinais de TCR e, para as células T recém emigradas do timo, proliferação independente de TCR (MACKALL et al., 2011).

#### 2.1.1.3.2.2 Gene CD58

De Jager et al (2009), demonstraram que o alelo rs2300747<sup>G</sup> do gene CD58 atrasa o desenvolvimento da EM. Esse alelo é correlacionado com expressão mais alta de RNAmCD58 em linfoblastos e mononucleares sanguíneos de pacientes com EM, também durante a fase silenciosa da doença. Importante destacar que essa região é responsável pela codificação da molécula coestimulatória LFA-3.

#### 2.1.1.3.2.3 Gene IL2RA

O complexo do receptor de IL-2 (IL-2R) é um marcador de linfócitos T FOXP3+ reguladores. Altas concentrações de cadeias de IL2RA solúvel (IL2RAs) foram encontradas em soro de indivíduos saudáveis, mas também durante infecções, inflamações e no curso de doenças autoimunes. Foi demonstrado que variantes associadas à susceptibilidade para EM tem proporção elevada de IL2RAs e também que o nível de IL2RAs era mais alto em indivíduos com doença mais severa (MAIER; ANDERSON; SEVERSON, 2009; BRYNEDAL; HILLERT, 2011).

Investigar as consequências fenotípicas de variantes genéticas é uma tarefa laboriosa (Figura 10). O primeiro passo normalmente é a avaliação dos fatores de transcrição. A hipótese de que a variante de um gene associado afeta níveis de expressão do outro gene demonstrando efeito fenotípico é altamente plausível, o que tem sido demonstrado para algumas variantes associadas à EM. Até agora, leucócitos foram escolhidos como alvo para estudos genéticos, uma escolha prática e lógica em se tratando de doenças autoimunes. Além do mais, o ataque às bainhas de mielina é orquestrado por linfócitos, que vêm, aparentemente, da circulação periférica. Entretanto, muitos tipos diferentes de células fazem parte desse ataque e algumas variantes associadas podem exercer seu papel patológico apenas em subpopulações específicas. Em adição, o dano é localizado no SNC e variantes genéticas que afetam a habilidade regenerativa dos oligodendrócitos podem ser outros componentes plausíveis na etiologia (BRYNEDAL; HILLERT, 2011).

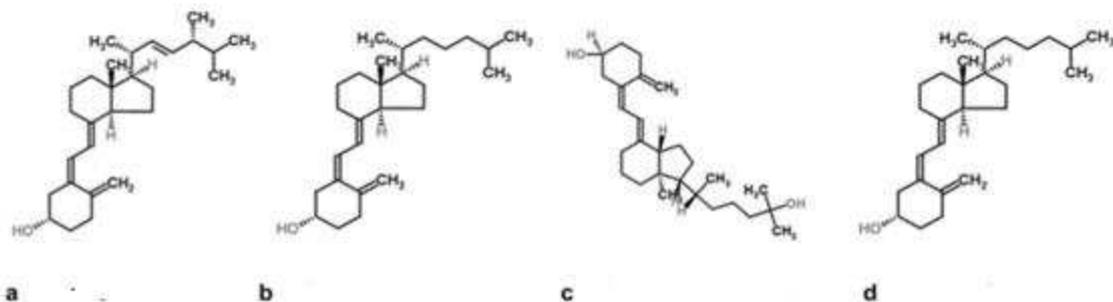


contribuir de forma independente no risco para a doença. Baixos níveis de vitamina D são comuns em EM e a sua administração previne o desenvolvimento em EAE. A radiação ultravioleta poderia exercer seu papel influenciando células imunoregulatórias ou biossíntese de vitamina D (SOSPEDRA; MARTIN, 2005; ASCHERIO; MUNGER, 2007; ASCHERIO; MUNGER; SIMON, 2010; ONTANEDA et al., 2012).

### 2.1.1.5 Vitamina D

É uma vitamina lipossolúvel que apresenta ações semelhantes à hormônios. Diferente de outras vitaminas pode ser sintetizada no nosso organismo. A forma ativa de vitamina D; 1,25 dihidroxivitamina D (1,25[OH]<sub>2</sub>VD), também conhecida como calcitriol, apresenta semelhanças químicas em relação à hormônios, como a testosterona, estrogênio e cortisol. As principais fontes são radiação solar, dieta (peixes, óleo de fígado de bacalhau) e suplementação. Ergocalciferol (vitamina D<sub>2</sub>) é encontrada em vegetais e juntamente com o colecalciferol também no leite, cereais, suco de laranja, queijos e suplementos vitamínicos (Figura 11). Contudo, fontes alimentares são muito pobres se comparadas à radiação solar. Ambas as formas de vitamina D, colecalciferol e ergocalciferol, são biologicamente inativas e sofrem transformação enzimática no fígado até a forma 25 (OH)D (calcidiol). Estimulado pelo paratormônio, o calcidiol passa por uma segunda hidroxilação nos rins e em outros tecidos à calcitriol, o metabólito ativo (SINTZEL; RAMETTA; REDER, 2018).

**Figura 11:** Estruturas químicas das vitaminas metabolicamente inativas D<sub>2</sub> e D<sub>3</sub> (a e b); O metabólito intermediário (c) de D<sub>3</sub> (hidroxivitamina D - 25[OH]D); metabólito ativo (d) calcitriol (1,25[OH]<sub>2</sub>VD)



Fonte: CHEMSPIDER, 2017.

Estudos epidemiológicos de prevalência para EM mostram um predomínio maior para a doença em altas latitudes com menor exposição à radiação ultravioleta (produção de vitamina D). Foi demonstrado que níveis adequados de vitamina D reduzem o risco de EM e afetam o curso da doença. Ainda são necessários estudos mais consistentes para a verificação se a associação inversa é verdadeira. Em adição, em algum grau, dietas ricas em óleo de peixe poderiam reduzir esse risco. Contudo, o “aspecto latitude” parece ter reduzido nas últimas décadas e, talvez, esse fato esteja ligado ao crescente costume de se evitar a exposição solar (ASCHERIO; MUNGER; SIMON, 2010).

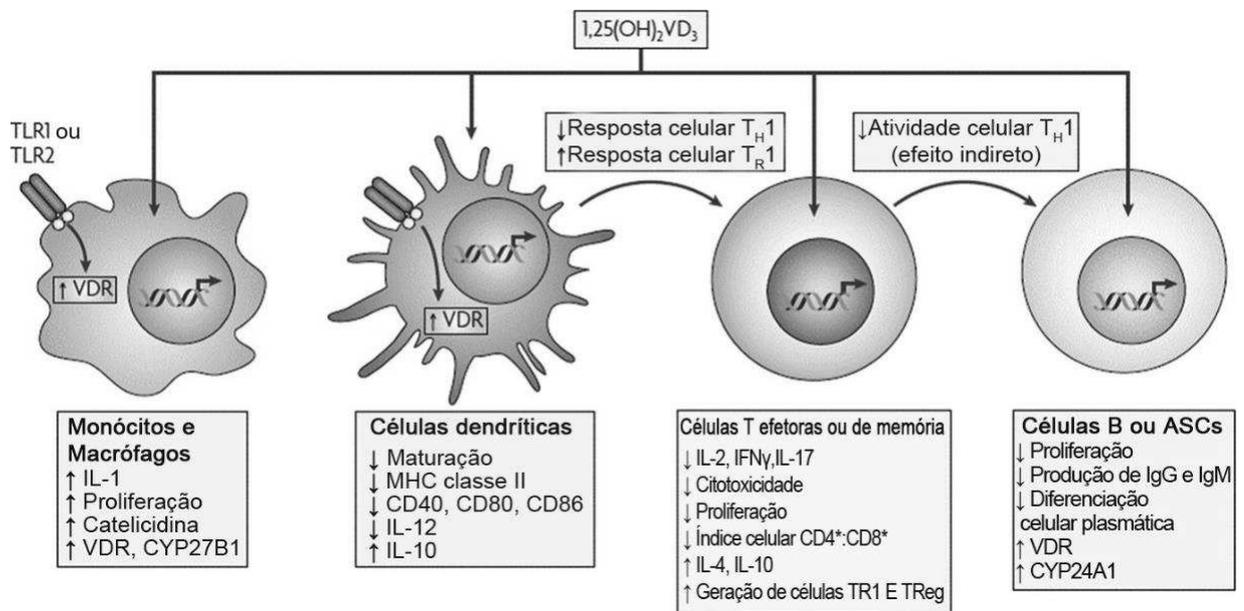
A fim de melhor relacionar vitamina D com EM, é importante caracterizar os mecanismos imunológicos que normalmente são influenciados por essa vitamina. A forma ativa de vitamina D desempenha um papel essencial na ativação e proliferação de linfócitos, diferenciação de células T auxiliares, migração de células T para tecidos, determinação de isotipos de anticorpos e regulação geral da resposta imune através de macrófagos e CD. A Figura 12 apresenta os principais efeitos da vitamina D em relação às células que compõem o sistema imunológico (MORA; IWATA; VON ANDRIAN, 2008; SINTZEL; RAMETTA; REDER, 2018):

- 1) Macrófagos e CD constitutivamente expressam receptores para vitamina D (VDRs), enquanto que suas expressões em células T são reguladas apenas após ativação dessas células;
- 2) Em macrófagos e monócitos,  $1,25(\text{OH})_2\text{VD}$  causam um *feed back* positivo para seus próprios efeitos aumentando a expressão de seus próprios receptores (VDRs) e a proteína CYP27B1 via citocromo P450;
- 3) Alguns TLR podem sinalizar o aumento na expressão de VDRs;
- 4) A forma ativa de vitamina D induz proliferação de monócitos, expressão de IL-1 e catelicidina (peptide antimicrobiano) por macrófagos;
- 5) Calcitriol diminui a maturação de CD inibindo a expressão de MHC de classe 2, CD40, CD80, e CD86. Em adição, diminui a produção de IL-12 e induz produção de IL-10 por essas células;
- 6) Em relação às células T,  $1,25(\text{OH})_2\text{VD}$  reduz a produção de IL-2, IL-17, e IFN- $\gamma$ . Também atenua atividade citotóxica e proliferação de células T CD4+ e CD8+;

- 7) O metabólito ativo da vitamina D poderia também promover a ativação de FOXP3, levando ao surgimento de células T reguladoras, produtoras de IL-10 e TGF- $\beta$ ;
- 8) Calcitriol bloqueia proliferação de células B, diferenciação plasmática e produção de anticorpos.

Notavelmente, neste contexto, pode ser dito que os mecanismos imunoreguladores da vitamina D tem similaridades com mecanismos já descritos para o IFN- $\beta$ .

**Figura 12:** Mecanismos potenciais de imunomodulação pela vitamina D



**Fonte:** SINTZEL; RAMETTA; REDER, 2018.

### 2.1.1.6 Agentes infecciosos

Infecções virais e bacterianas são consideradas gatilhos possíveis para EM. Entre os vírus patogênicos para humanos, aqueles que induzem infecções persistentes, como o herpes e as retrovirose, são candidatos e têm sido amplamente estudados em EM. Herpes vírus são particularmente interessantes pelo seu neurotropismo e tendência a produzir infecções latentes. O vírus do herpes humano

tipo 6 (HHV-6) e Epstein-Barr (EBV) lideram como candidatos potenciais (SOSPEDRA; MARTIN, 2005).

Mononucleose e EM possuem distribuições geográficas similares. Virtualmente todos os indivíduos com EM (>99%) são infectados com EBV se comparados aos 95% da população geral adulta. Pessoas com altos títulos de anticorpos anti-EBV possuem risco maior de desenvolver EM comparados a indivíduos com títulos mais baixos e a presença de IgG anti-EBV antes do início da EM tem sido considerada forte preditor da doença (SOSPEDRA; MARTIN, 2005; RAMAGOPALAN; SADOVNICK, 2011; ONTANEDA et al., 2012).

Pacientes com EM que apresentam reativação de infecções latentes de EBV têm piora clínica da EM. Um histórico de mononucleose infecciosa é mais comum em pacientes com EM e o risco de desenvolvimento da mesma é maior em indivíduos que sofreram essa infecção na infância (SOSPEDRA; MARTIN, 2005).

O vírus HHV-6 pode causar meningoencefalite e sua presença foi demonstrada em oligodendrócitos e astrócitos de pacientes com EM. A presença de HHV-6 DNA e anti-HHV-6 IgG e IgM foi também demonstrada em soro e líquido de pacientes com EM (SOSPEDRA; MARTIN, 2005).

Outros agentes infecciosos virais têm sido citados, como poliomielite, Adenovírus, varicela zoster e Papovavírus (SOSPEDRA; MARTIN, 2005).

Em relação às bactérias, *Chlamydia pneumoniae* (Cpn) tem sido contraditoriamente associada à EM. Apesar de um estudo ter mostrado a presença de Cpn em líquido de elevada percentagem de pacientes com EM, houve dificuldade para corroborar essa demonstração (SOSPEDRA; MARTIN, 2005).

Os principais mecanismos propostos para explicar o desenvolvimento de EM a partir de infecções são (SOSPEDRA; MARTIN, 2005):

- 1) Mimetismo molecular: ativação de células autorreativas por reatividade cruzada entre antígenos próprios e agentes externos;
- 2) Ativação de espectadores: células autorreativas são ativadas por eventos inflamatórios não específicos que ocorrem durante infecções;
- 3) Combinação dos 2 anteriores.

## 2.1.2 Fisiopatologia

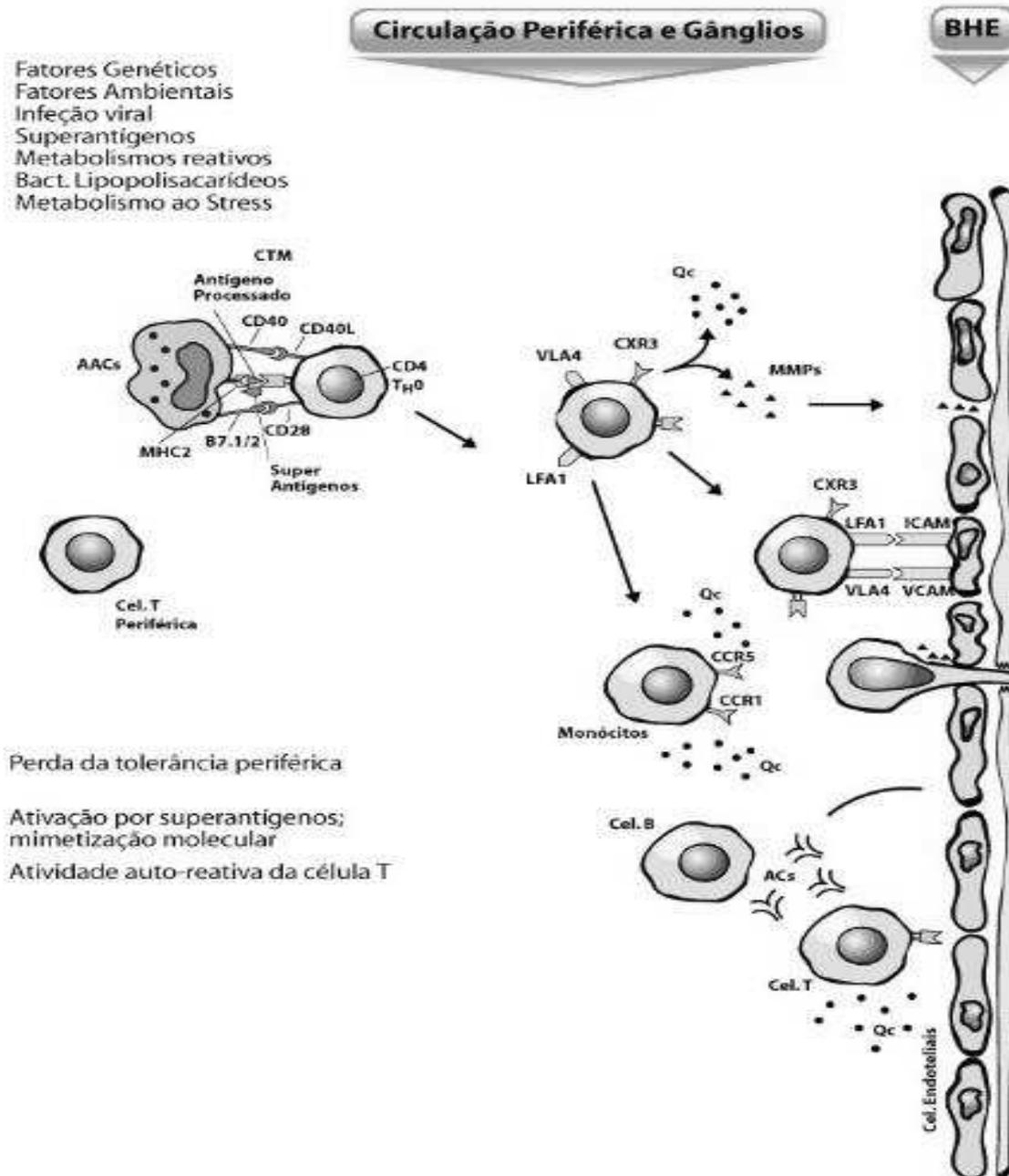
### 2.1.2.1 Aspectos Fisiopatológicos Gerais

A etiopatogênese e a fisiopatologia da EM ainda não estão completamente esclarecidas. Trata-se de uma doença autoimune com resposta a vários antígenos proteicos e lipídicos presentes na mielina do SNC. A fisiopatogenia da doença será descrita em etapas, de acordo com os mecanismos imunológicos, danos celulares e reparação neuronal conhecidos. Na fase inicial, as lesões desmielinizantes são o resultado de processo inflamatório centrado, principalmente, nos espaços periventriculares, do tronco cerebral, cerebelo, nervo óptico, medula espinhal, entre outros, no qual participam vários componentes do sistema imune inato e adaptativo (MACHADO et al., 2012).

Uma hipótese que explicaria a EM é a existência de células T no sistema imune periférico, sobreviventes do controle tímico durante a seleção negativa por depleção clonal, potencialmente autorreativas e que apresentam receptores específicos para componentes proteicos da mielina central. Estes linfócitos entrariam no SNC e, após expansão clonal local, agrediriam a mielina diretamente ou por meio de ação de outras células, causando os *déficits* neurológicos próprios da doença (Figuras 13 e 14). É importante salientar que, para iniciar a inflamação, células T específicas para antígenos de mielina devem ser ativadas na periferia. Após essas etapas iniciais, essas células devem ter acesso ao SNC e, já nessa região, devem ser reativadas por células apresentadoras de antígeno (APC) (SOSPEDRA; MARTIN, 2005; GOVERMAN, 2009; MACHADO et al., 2012).

O SNC oferece grandes desafios a esse processo inflamatório, pois é protegido da infiltração celular pela BHE, que circunda o parênquima das vênulas, e pela barreira líquórica, que circula o plexo coroide (onde o líquido é produzido) e as vênulas das meninges. Junções próximas entre células endoteliais e células epiteliais no SNC também impedem o acesso de células circulantes. No entanto, células T de memória ativadas podem atravessar essas barreiras por possuírem moléculas de adesão expressas, receptores de citocinas e integrinas (GOVERMAN, 2009).

Figura 13: Imunopatogenia da EM (parte 1)



Fonte: MACIEL, 2014.

As hipóteses etiopatogênicas mais plausíveis para EM são (SOSPEDRA; MARTIN, 2005; MACHADO et al., 2012):

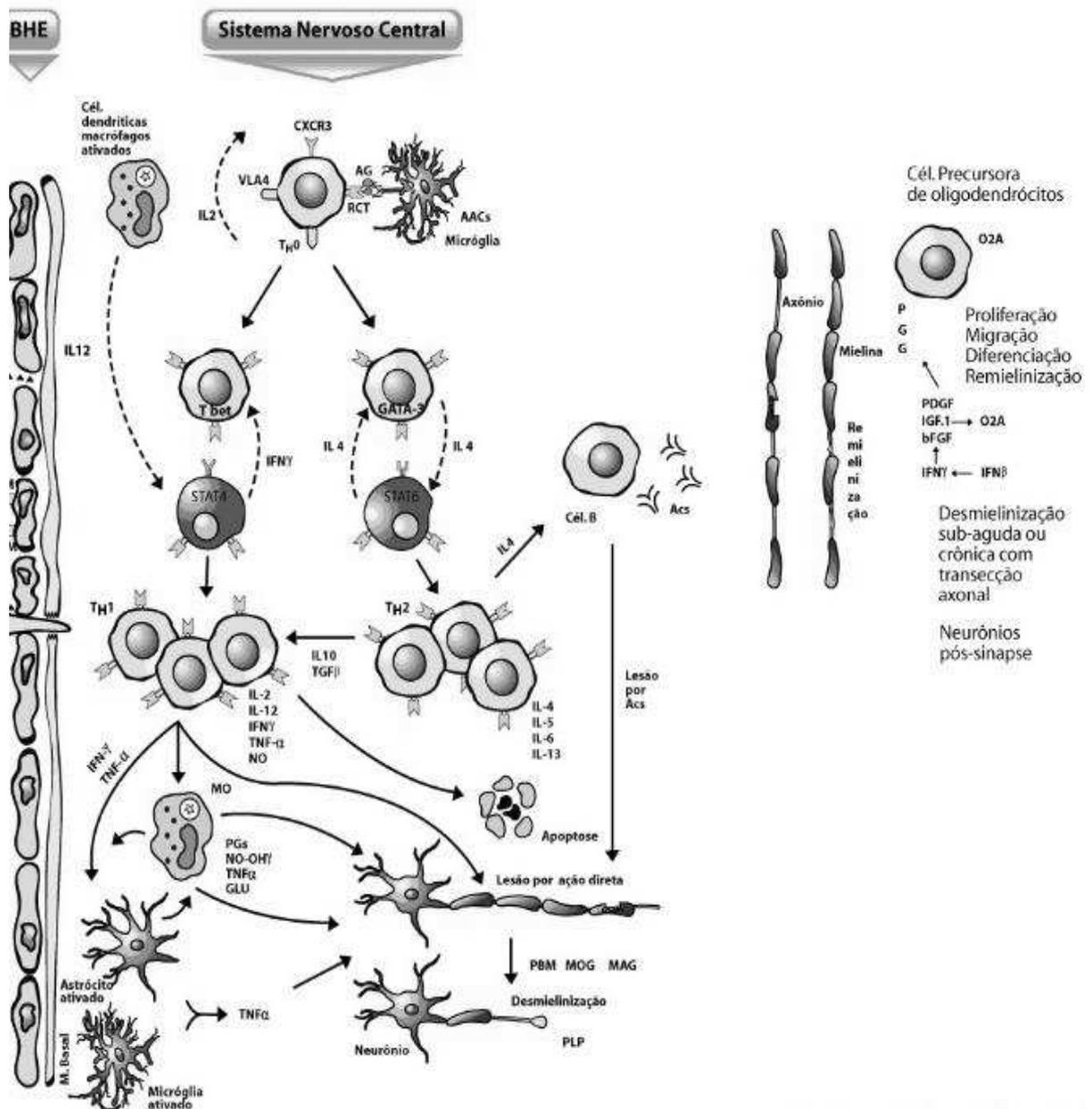
- 1) Presença de infecção viral persistente (infecção viral, superantígenos, metabolismo do estresse);
- 2) Processo autoimune com perda de tolerância para os antígenos da mielina central. São eles: proteína básica da mielina (PBM); proteína lipoproteica (PLP); glicoproteína de oligodendrócitos da mielina (MOG); glicoproteína

associada com a mielina (MAG); fosfodiesterase dos nucleotídeos cíclicos (CNPase); proteína básica oligodendrocítica associada à mielina (MOBP); glicoproteína específica oligodendrocitária (OSP); proteína Nogo-A. Outros antígenos não mielínicos ligados ao processo fisiopatológico incluem a proteína  $\alpha$ - $\beta$  cristalina, a proteína S100  $\beta$ , transaldolase-H (tal-H), as próprias imunoglobulinas, os gangliosídeos GM3 e GQ1b e os lipídeos da mielina.

Como dito anteriormente, células T específicas de mielina são ativadas na periferia para que possam penetrar no SNC. A PBM é componente tanto da mielina central quanto periférica, e está presente dentro de todos os tecidos linfoides (GOVERMAN, 2009).

Os mecanismos de ativação das células T específicas para outras proteínas de mielina que ocorrem fora do SNC ainda não foram identificados. Contudo, ratos apresentando receptores transgênicos de células T (TCR) específicos para outras proteínas como PLP ou PBM, expressam EAE espontaneamente. Aparentemente linfócitos T específicos de ambos os antígenos são ativados inicialmente nos linfonodos de drenagem cervicais do SNC. Isso sugere que antígenos mielínicos estão constitutivamente presentes nessas áreas e podem, sob certas condições, ser gatilhos do processo (GOVERMAN, 2009).

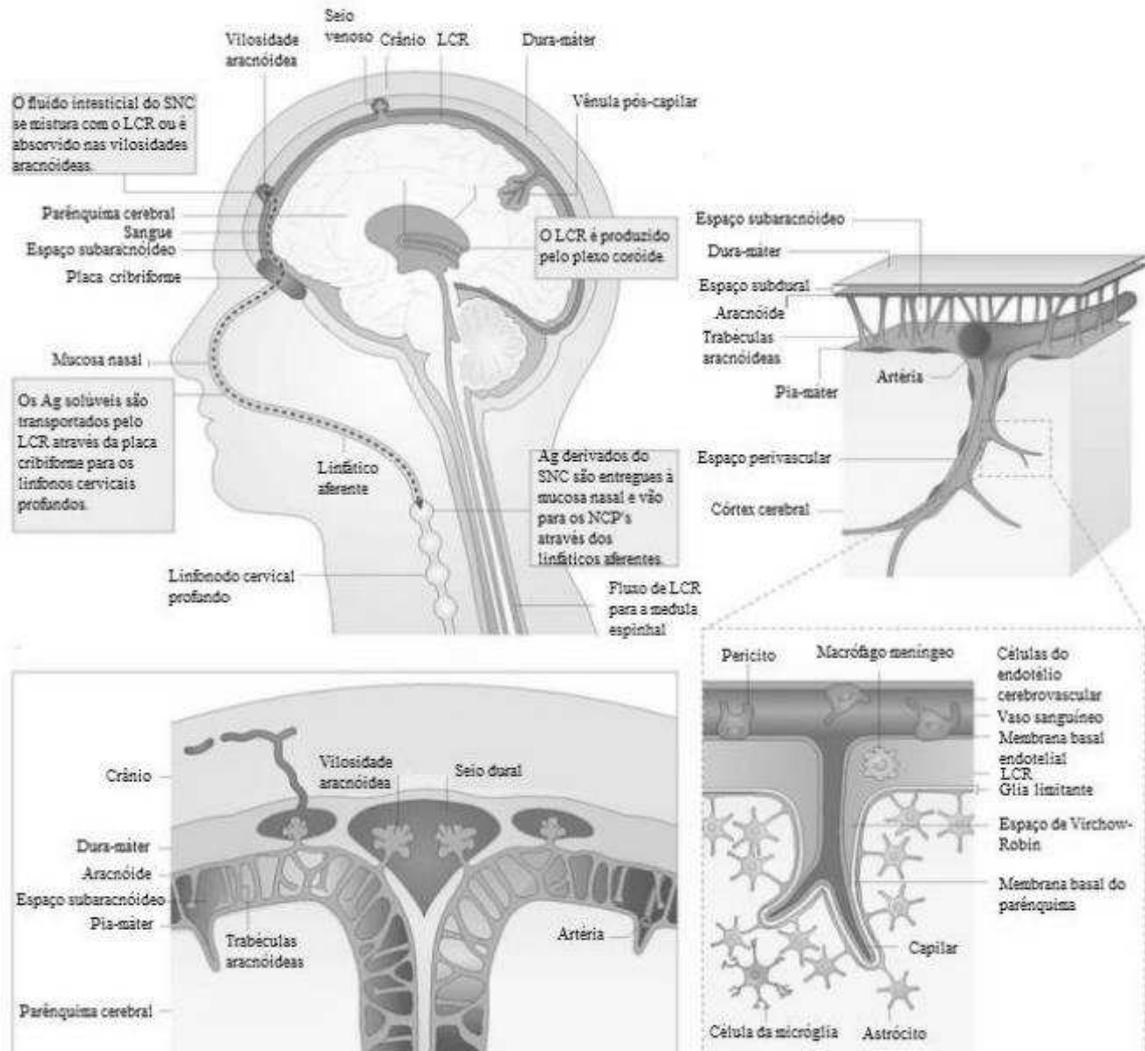
Figura 14: Imunopatogenia da EM (parte 2)



Fonte: MACIEL, 2014.

Células T acessam regiões diferentes do SNC e isso é determinado pela sua rota de chegada. Células que cruzam a barreira hematoliquórica (BHL) entram na região entre as membranas aracnoide e pia mãe, onde o líquido cefalorraquidiano circula, conhecido como espaço subaracnoide (ESA). Já as células T que cruzam a BHE entram no espaço perivascular que separa a membrana basal ligada às células endoteliais dos vasos de uma segunda membrana que compreende a base dos astrócitos e células da micróglia (Figura 15) (RANSOHOFF; KIVISAKK; KIDD, 2003; RANSOHOFF; ENGELHARDT, 2012).

**Figura 15:** Rotas possíveis para entrada de células T no SNC



Fonte: RANSOHOFF; ENGELHARDT, 2012.

Na ausência de processo inflamatório, contudo, células do endotélio cerebral não expressam moléculas de adesão necessárias para que células T ativadas se liguem às paredes dos vasos. Tem sido proposto que a imunovigilância ocorra primariamente em ESA por células T que inicialmente cruzem a BHL, onde selectinas e moléculas de adesão são constitutivamente expressas. A expressão do receptor de quimiocina 6 (CCR6) por um subconjunto de células T patogênicas têm demonstrado grande papel para facilitar a entrada dessas células em EAE. O ligante para CCR6 (CCL-20) é constitutivamente expresso em células epiteliais do plexo coroide de ratos e humanos, o que suporta a ideia de que células T primeiro cruzam a BHL para iniciar a EAE (GOVERMAN, 2009; REBOLDI et al., 2009).

Os mecanismos inflamatórios em EAE são inicialmente detectados em ESA. Estudos de imagens recentes mostram que este sítio é o primeiro onde células T CD4<sup>+</sup> são inicialmente ativadas por células MHC classe 2 positivas, com posterior proliferação e formação de grandes agregados de células T. Essa reativação é seguida pela ativação de células endoteliais perivasculares, que permitem o recrutamento de células T do espaço perivascular. Apesar do não conhecimento dos detalhes desse processo inflamatório, um estudo sugere que a ativação de células T em ESA é o gatilho para ativar células da micróglia que repousam abaixo da pia mãe, levando aos danos axonais locais (*“Wallerian damage”*). Esse processo leva à ativação distal de células da micróglia e aumento na expressão de moléculas de adesão no parênquima vascular (BROWN; SAWCHENKO, 2007).

Em adição à produção de citocinas, o TNF- $\alpha$  parece ter importante papel na indução da migração de células T CD4<sup>+</sup> do espaço perivascular para o parênquima. Foi também relatado que a potência de ativação das células T determina o grau de inflamação do parênquima e não a capacidade dessas células de penetrar no espaço perivascular. A potência na qual a célula T é ativada é proporcional à afinidade de seu receptor TCR ao peptídeo ligante (antígenos de mielina) e o número de peptídeos ligantes/moléculas MHC disponíveis na superfície da célula APC. É importante salientar também que células T fracamente ativadas expressam em elevada concentração o receptor de indução de morte programada (PCD1), o que resultaria na elevação da mortalidade dessas células. Assim, a reativação de células T dentro do ESA parece iniciar a inflamação e promover a entrada de células T no parênquima, mas a intensidade dessa reativação pode ser proporcional ao grau de inflamação que se segue (GOVERMAN, 2009).

O aprofundamento no processo fisiopatológico demonstrará, a partir de agora, que as lesões imunes são ativadas e coordenadas, na sua essência por linfócitos T auxiliares (CD4<sup>+</sup>) de fenótipo pró-inflamatório (Th1 e Th17) e inibidas e reguladas por fenótipos anti-inflamatórios (Th2) e T reguladoras (Treg). Também participam do processo células Th9, cujo papel ainda é controverso, APC como macrófagos e células da micróglia capazes de expressar moléculas de MHC de classe 2 e coestimuladoras, linfócito T citotóxicos (LTC), plasmócitos produtores de anticorpos anti-mielina, células da imunidade natural e proteínas do complemento (DURELLI et al., 2009; DOMBROWSKI et al., 2017; YIN et al., 2017; DITTMER et al., 2018).

### 2.1.2.2 Células T CD4+

Foi demonstrado por Rivers, em 1933, que a injeção de extrato de cérebro ou medula espinhal de coelhos em primatas saudáveis desencadearia uma doença similar à EM, levando à sugestão de que a mesma é uma doença autoimune. Décadas depois, pesquisadores demonstraram que a injeção de componentes proteicos de mielina associados à adjuvantes em animais susceptíveis causava uma encefalomielite, agora chamada EAE. A observação de que a EAE pode ser transferida por LT CD4+ específicos para mielina documentou, convincentemente, que a EAE pode ser induzida por células T autorreativas em animais “naive”. Contudo, em relação à transferência de anticorpos, EAE não se desenvolve (HAFLER, 2004; SOSPEDRA; MARTIN, 2005; MACHADO et al., 2012).

Dizer que EM é uma doença T-mediada nos dias de hoje tende a simplificar e superficializar sua fisiopatologia. Entretanto, dados ainda sustentam que células T autorreativas possuem papel central na patogênese e perpetuação da doença, pelos seguintes argumentos (SOSPEDRA; MARTIN, 2005; TENIENTE-SERRA; RAMO-TELLO; MARTINEZ-CACERES, 2017):

- 1) Células T estão presentes no infiltrado inflamatório do SNC e no líquido de pacientes com EM;
- 2) Grau substancial de risco genético conferido por moléculas HLA-DR e DQ;
- 3) Ratos transgênicos expressando HLA-DR e DQ são susceptíveis à EAE e ratos portadores de moléculas HLA-DR associadas a EM e TCR específicos para proteína básica de mielina (PBM) derivados de pacientes com EM desenvolvem EAE de forma espontânea ou induzida;
- 4) Um ensaio terapêutico com um peptídeo ligante alterado de PBM induziu reação cruzada de LT CD4+ Th1, o que levou a exacerbação da doença;
- 5) Produção de anticorpos, maturação de CD8+ e muitos outros passos da resposta imune adaptativa e natural são em partes orquestradas por LT CD4+.

A ativação de linfócitos T faz com que essas células adquiram a capacidade de expandir-se clonalmente, produzir diferentes citocinas e aumentar a expressão de selectinas, integrinas [(VLA-4 ( $\beta 1\alpha 4$ ) e LFA-1 ( $\beta 2\alpha 1$ )] e outras moléculas de adesão (VCAM-1 e ICAM-1) em sua superfície. Este evento permite aos linfócitos T interagir

com moléculas de adesão complementar, presentes nas células endoteliais, atravessar o espaço perivascular e alcançar o SNC (MACHADO et al., 2012).

Para que exista susceptibilidade à EAE é necessário que existam células T CD4+ que escapem dos processos de tolerância central e que possam ser ativadas nos tecidos periféricos. Esse processo é responsável pela deleção de células reativas a antígenos próprios que lhes são apresentados por células APC. Células que demonstrem receptores TCR com baixa afinidade pelos complexos MHC-mielina e tímócitos que sejam específicos a antígenos de mielina que não se liguem firmemente à fenda do MHC podem sobreviver, circular e, em órgãos linfoides secundários, ter sua afinidade aumentada a esses antígenos sob determinadas circunstâncias. Células APC respondendo a estímulos como infecções podem expressar moléculas coestimulatórias e antígenos em sua superfície que podem levar a um aumento na avidéz de interação entre as células APC e células T autorreativas, fazendo com que as mesmas coordenem respostas imunes para esses antígenos, antes ignorados (GOVERMAN, 2009).

Uma alta frequência de células T expressando TCR “degenerados” foram identificados. Esse tipo de receptor pode interagir com diferentes complexos peptídeos- MHC. Apesar desse fenômeno não estar ainda ligado diretamente aos processos de patogenicidade, há importantes implicações nessa teoria, na qual células T específicas para antígenos próprios são ativadas por reatividade cruzada a epítomos microbianos (LUNEMANN; MUNZ, 2009).

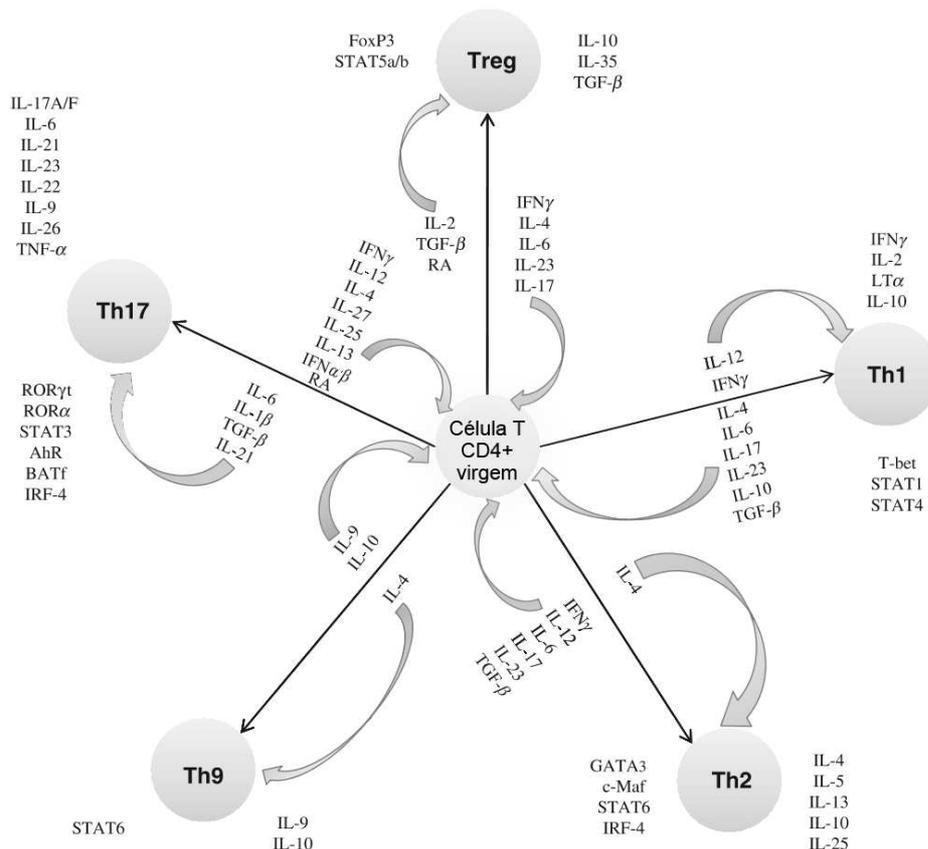
Até recentemente prevaleceu a ideia de que a fisiopatologia da EM e de seu modelo experimental EAE fosse ligada apenas às células Th1. Em um microambiente apropriado, na presença de IL-12 e INF- $\gamma$ , linfócitos T CD4 naive se diferenciam para essa população celular, reconhecida pela capacidade de secretar citocinas como IFN- $\gamma$ , IL-2 e TNF- $\alpha$  (Figura 16). Estas substâncias podem induzir dano direto na bainha da mielina, promover desmielinização mediada pela ação celular e ativar macrófagos, astrócitos e células da micróglia, as quais expressam TNF- $\alpha$  em lesões ativas. O IFN- $\gamma$  também promove a expressão de moléculas MHC de classe 2 em células da micróglia e macrófagos, permitindo-lhes atuar como APCs (GOVERMAN, 2009; MACHADO et al., 2012).

Adicionalmente, os macrófagos ativados por linfócitos Th1 participam ativamente do processo de degradação dos componentes da mielina. As células T CD4 podem também contribuir para ativação de linfócitos B, levando à diferenciação

de células plasmáticas e, conseqüentemente, produção de autoanticorpos contra diferentes componentes da mielina (indutores de desmielinização por ativação de complemento) (MACHADO et al., 2012).

Algumas observações têm modificado o entendimento do desenvolvimento fisiopatológico de EAE nas últimas décadas. Ratos deficientes em IL-12, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  desenvolvem severa EAE e aqueles deficientes em IL-23 são completamente resistentes à mesma. A citocina IL-23 é crucial para o desenvolvimento de células Th17 patogênicas, uma linhagem distinta de células produtora de IL-17A, IL-17F e IL-22. Estudos focados nessa linhagem celular demonstraram que essa diferenciação é dependente da sinalização mediada por TGF- $\beta$ , IL-6, IL-1 e ativação autócrina de IL-21 (GOVERMAN, 2009).

**Figura 16:** Diferenciação de células T CD4+ <sup>3</sup>



**Fonte:** JADIDI-NIARARAGH; MIRSHAFIEY, 2011.

<sup>3</sup> A diferenciação de células T CD4+ naive para as variadas linhagens de células CD4+ é controlada por numerosos fatores regulatórios, como fatores de transcrição específicos e citocinas inibitórias e estimulatórias. Provavelmente o balanço entre vários estímulos para cada linhagem e o local pode determinar o destino da célula T CD4+ Th0. Setas azuis indicam citocinas que estimulam a população e setas vermelhas indicam inibição da respectiva população. Na lateral direita ou em posição superior as citocinas produzidas e lateral esquerda ou posição inferior os fatores transcripcionais ativados.

As citocinas pró-inflamatórias originadas de células Th17 (IL-2, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , IL-12, IL-16, IL-17A, IL-17F, IL-22, IL-23 e IL-27) podem iniciar e perpetuar o dano tissular observado na EM (Figura 16). Podem também direcionar a síntese ou induzir outras células a produzir mediadores inflamatórios como IL-6, GM-CSF, metaloproteinases de matriz e quimiocinas da família CXC, incluindo CXCL8, um potente quimioatratador de neutrófilos (GOVERMAN, 2009).

Estudos em pacientes com EM demonstraram números elevados de células Th17, se comparados com lesões agudas e controles feitos com indivíduos normais. Além do mais, transferência de células Th17 parecem induzir EAE mais severa que na transferência de células Th1. Portanto, chegou-se a conclusão de que células Th17 são as “verdadeiras” efetoras da autoimunidade no SNC (KOMIYAMA et al., 2006; GOVERMAN, 2009).

Recentes estudos têm sugerido que células T coexpressando IL-17 e IFN- $\gamma$  podem ser cruciais para a patogênese da EAE. Surpreendentemente, entretanto, a necessidade de IL-17 não é do mesmo nível que a de IL-23. Enquanto ratos deficientes em IL-23 (IL-23<sup>-/-</sup>) são completamente resistentes à EAE, IL-17A<sup>-/-</sup> e IL-17F<sup>-/-</sup> continuam susceptíveis (GOVERMAN, 2009; TENIENTE-SERRA; RAMO-TELLO; MARTINEZ-CACERES, 2017).

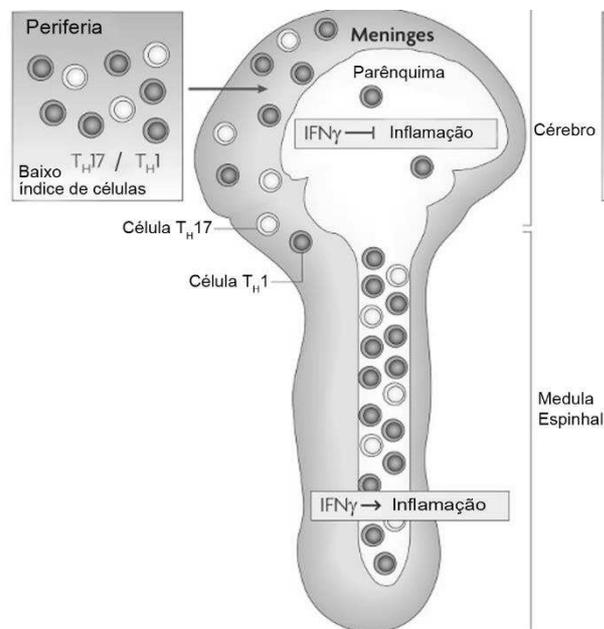
Devido aos diferentes processos quimiotáticos desencadeados por IFN- $\gamma$  e IL-17, macrófagos predominam nos infiltrados Th1, enquanto que neutrófilos predominam em infiltrados Th17. Devido ao fato de que nenhuma dessas citocinas é absolutamente necessária para o desenvolvimento de EAE, outras diferenças funcionais entre essas duas linhagens devem ainda ser identificadas. A falta de consenso em relação ao papel dessas duas linhagens caracterizam as dificuldades no entendimento completo das reações TCD4<sup>+</sup> na autoimunidade (GOVERMAN, 2009).

Mecanismos que determinam onde as lesões inflamatórias se localizam dentro do SNC afetam significativamente os aspectos clínicos, mas não são completamente compreendidos. Em muitos modelos murinos de EAE, alvos predominantes na inflamação são a medula espinhal, resultando nos clássicos sintomas de paralisia ascendente. Por outro lado, muitos pacientes com EM desenvolvem lesões inflamatórias no cérebro, apresentando diversidade maior de sintomas. Inflamação cerebral acompanhada de sintomas atípicos como ataxia, hiperreflexos e incapacidade proprioceptiva ocorrem em alguns modelos de EAE que

usam certas cepas e combinações de antígenos e em modelos com deficiência de IFN- $\gamma$  (LEES et al., 2008; GOVERMAN, 2009).

O papel do IFN- $\gamma$  foi demonstrado em experimento de transferência de células T específicas para MOG em ratos selvagens, o que levou à indução de inflamação apenas na medula espinhal. Em contraste, a mesma transferência de células T em ratos com deficiência de receptores para IFN- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ R) levou a processo inflamatório específico no cérebro. Esses dados sugerem que a sinalização de IFN- $\gamma$ R em medula espinhal é necessária para induzir inflamação nesse sítio, mas no cérebro essa sinalização a inibe (Figura 17) (LEES et al., 2008; GOVERMAN, 2009).

**Figura 17:** Células Th1/Th17. Mecanismos de diferenciação em EM (parte 1)

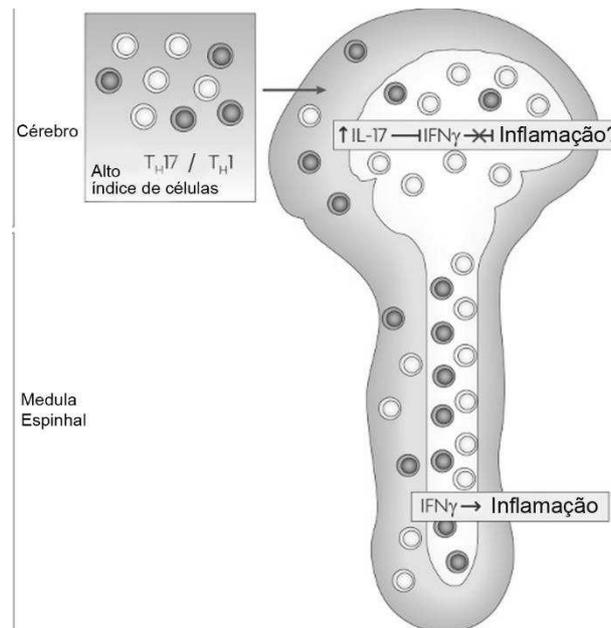


**Fonte:** GOVERMAN, 2009.

Em recente experimento com modelo de EAE, células T específicas foram geradas para três diferentes epítopos de MOG após imunização com MOG recombinante. A transferência de células T adotivas que eram específicas para MOG induziram, preferencialmente, inflamação cerebral, enquanto que células T específicas para os outros dois epítopos induziram inflamação apenas na medula espinhal (Figura 17). Foi demonstrado também que indução da inflamação no parênquima cerebral ocorreu apenas quando o número de células Th17 era maior que células Th1 nas meninges. Essa limitação não foi demonstrada em relação à

infiltração na medula espinhal (Figura 18). Esses dados indicam que o balanço Th17/Th1 no infiltrado é um fator crucial para determinar se as células inflamatórias serão recrutadas para o cérebro e se iniciarão o processo inflamatório (GOVERMAN, 2009).

**Figura 18:** Células Th1/Th17. Mecanismos de diferenciação em EM (parte 2)



Fonte: GOVERMAN, 2009.

O balanço entre Th17 e outras células T CD4+, incluindo Th1 e Treg no local da inflamação é um importante parâmetro para determinação do tipo de patologia, locais de inflamação e estágios da doença. Em EAE foi demonstrado que Th1 causa danos inflamatórios na medula espinhal, enquanto que a inflamação cerebral é mediada por células Th17. O balanço entre Th17 e células Treg pode determinar o *status* da doença. Foi sugerido que a proporção relativa dessas duas células pode determinar se a inflamação no SNC se tornará crônica ou não. Esses fatos provavelmente se reproduzem em EM, todavia, é importante observar que os resultados obtidos à partir de modelos de EAE não são diretamente aplicados à EM (JADIDI-NIARAGH; MIRSHAFIEY, 2011).

Células Th9 são o subtipo mais recente de células T auxiliares descoberto, caracterizado pela secreção de altas concentrações de IL-9. Estudos prévios demonstraram que essas células são capazes de induzir EAE e, de forma relevante,

células Th9 e mastócitos apresentam funções efetoras contra a BHE (ZHOU et al., 2011).

Em estudo recente, o bloqueio de IL-9 atrasou a evolução clínica e diminuiu a severidade de EAE, com diminuição do infiltrado de mastócitos no SNC. De forma consistente com esse estudo, a ablação genética de IL-9R ou bloqueio de IL-9 por anticorpos específicos atenuou EAE devido a diminuição de Th17 dentro do SNC. É importante salientar que outro estudo sugere que deficiência na sinalização de IL-9 exacerba EAE. Portanto, IL-9 parece apresentar efeitos diversos na patogênese de EAE (YIN et al., 2017).

As células Th2 e Treg que secretam citocinas como IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 e TGF- $\beta$  estão associadas à inibição e/ou regulação da resposta imune. Foi demonstrado recentemente que a depleção de células Treg prejudica a remielinização “in vivo” e que fatores liberados por essas células promovem diferenciação de oligodendrócitos, fundamentais para a síntese de mielina. O desenvolvimento de respostas Th1/Th17 ou Th2/Treg se encontra condicionado pelas citocinas presentes durante a apresentação antigênica, pelo tipo de peptídeo estimulante, pela coestimulação recebida e pelos fatores de transcrições envolvidos (MACHADO et al., 2012; DOMBROWSKI et al., 2017; DITTMER et al., 2018).

#### 2.1.2.2.1 Células Th17

A primeira sugestão de um novo subtipo de linfócito T auxiliar (LTA), diferente de Th1 e Th2, surgiu pela observação de células T CD4<sup>+</sup> produtoras de altos níveis de IL-17 sem expressão de IFN- $\gamma$  ou IL-4 (citocinas reciprocamente reconhecidas como marcadoras de células Th1 e Th2). Outras importantes pistas foram fornecidas por estudos em animais. Patologias como EAE foram inicialmente atribuídas à mediação de Th1. Entretanto, inconsistências com essa teoria foram demonstradas, pois depleções de citocinas como IFN- $\gamma$ , seu receptor IFN- $\gamma$ R, ou receptor de IL-12 (IL-12R $\beta$ 2), o maior indutor de fenótipo Th1, elevam a susceptibilidade à EAE (JADIDI-NIARAGH; MIRSHAFIEY, 2011).

Em 2006 três grupos independentes demonstraram que TGF- $\beta$  é necessário para o desenvolvimento de células Th17 (Figura 19). Essa citocina está implicada em processos de imunossupressão pela indução da expressão de Foxp3 e células Treg. Todavia, é claro agora que promove repostas pró-inflamatórias através do desenvolvimento de Th17, em presença de citocinas inflamatórias como IL-6. Portanto, o papel de TGF- $\beta$  como indutor de Treg ou Th17 é dependente da presença ou ausência de IL-6. Essa citocina é capaz de inibir a expressão de Foxp3, impedindo a diferenciação de células Treg CD4/CD25 positivas (DURELLI et al., 2009; JADIDI-NIARAGH; MIRSHAFIEY, 2011).

Em ratos, foi demonstrado que IL-6 ativa proteína transdutora de sinal e ativadora de transcrição 3 (STAT-3), induzindo a expressão do fator de transcrição ROR $\gamma$ t, o que induz a produção de IL-17. Em adição, a presença de IL-6 é crítica para surgimento de moléculas de adesão cerebrovasculares, como molécula 1 de adesão vascular (VCAM-1), que é essencial para migração leucocitária ao SNC (DURELLI et al., 2009; JADIDI-NIARAGH; MIRSHAFIEY, 2011).

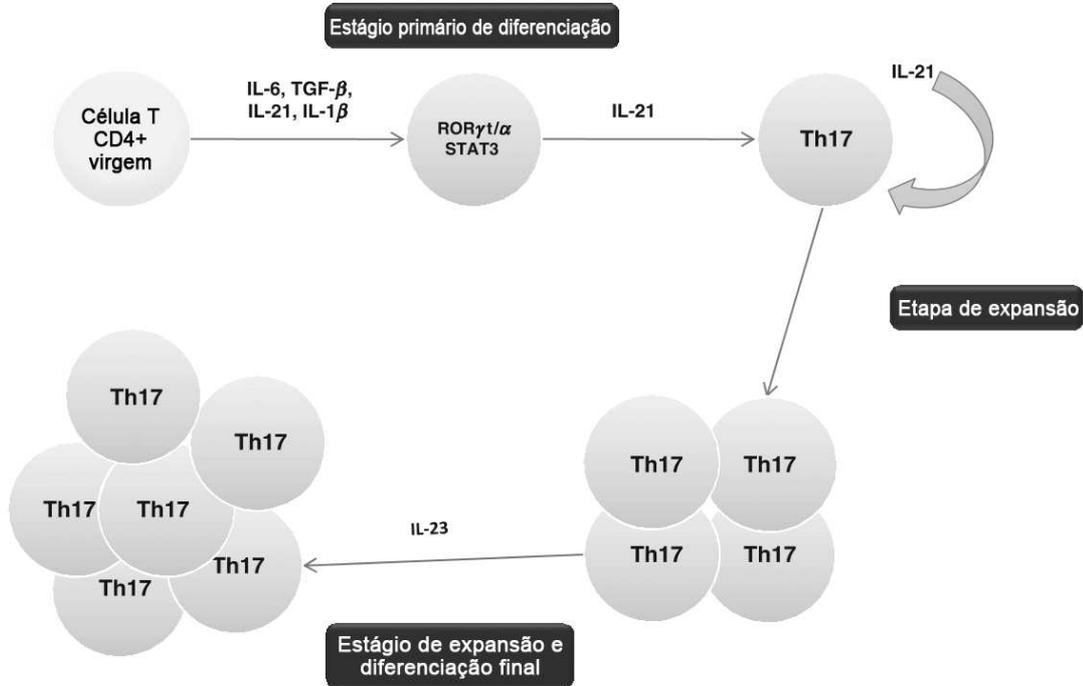
Presentes no mesmo ambiente, IL-6 e TGF- $\beta$  induzem outro fator de transcrição para Th17 chamado ROR $\alpha$ , que, em cooperação com o fator ROR $\gamma$ t, promove alta produção de IL-17A e IL-17F. Foi demonstrado também que deficiências em ambos leva à completa inibição de diferenciação Th17.

A IL-6 também é capaz de desencadear uma cascata de sinalização dependente de citocinas que levam à ampliação de Th17. Essa citocina induz a expressão de receptor de IL-23 (IL-23R) nas células, tornando-as responsivas à mesma. Já foi claramente demonstrado na literatura que IL-23 é perfeitamente dispensável para o desenvolvimento de Th17, porém, recentemente, foi demonstrado que promove diferenciação de Th17 por inibir T-bet e FoxP3 e ativar STAT3, importante fator de transcrição para Th17 (Figura 20) (VELDHOEN; HIROTA; WESTENDORF, 2008; YANG; PAPPU; NURIEVA, 2008; JADIDI-NIARAGH; MIRSHAFIEY, 2011).

A IL-21 não demonstra papel essencial para o comprometimento de células T naive com a linhagem Th17 e não demonstra importante papel na fisiopatologia de EAE e da EM. Todavia essa citocina é capaz de induzir expressão de IL-17 em colaboração com TGF- $\beta$ , mesmo em ausência de IL-6. Da mesma forma que IL-6, a IL-21 inibe Foxp3 induzida por TGF- $\beta$ . A IL-21 é produzida por células Th17 sob

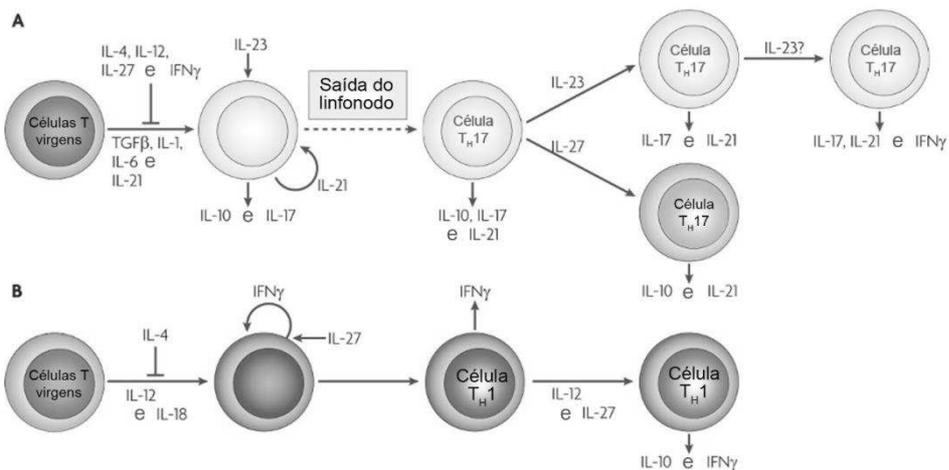
indução de IL-6 e, de forma autócrina, provoca a síntese de IL-23R (NURIEVA et al., 2007; JADIDI-NIARAGH; MIRSHAFIEY, 2011).

**Figura 19:** Diferenciação de células Th17 <sup>4</sup>



Fonte: JADIDI-NIARAGH; MIRSHAFIEY, 2011.

**Figura 20:** Células Th1/Th17. Mecanismos de diferenciação em EM



Fonte: JADIDI-NIARAGH; MIRSHAFIEY, 2011.

<sup>4</sup> A diferenciação de células T CD4+ naive para as variadas linhagens de células CD4+ é controlada por numerosos fatores regulatórios, como fatores de transcrição específicos e citocinas inibitórias e estimulatórias. Provavelmente o balanço entre vários estímulos para cada linhagem e o local pode determinar o destino da célula T CD4+ Th0.

Outro regulador positivo para Th17 é IL-1 por aumentar a ação de IL-6 e TGF- $\beta$  (VELDHOEN; HIROTA; WESTENDORF, 2008).

As vias de sinalização de IL-18, e não a citocina em si, podem também estar envolvidas no comprometimento da linhagem Th17. Foi demonstrado que ratos deficientes de IL-18 eram susceptíveis à EAE, enquanto que animais deficientes em IL-18R $\alpha$  eram resistentes, demonstrando deficiência em resposta Th17. Portanto, é proposto que a via de sinalização de IL-18 esteja envolvida pela ligação de um outro ligante distinto de IL-18 (GUTCHER et al., 2006; NURIEVA et al., 2007; JADIDI-NIARAGH; MIRSHAFIEY, 2011).

O receptor de dioxina (*aryl hydrocarbon receptor-AhR*) é também um importante fator de transcrição apenas expresso por Th17. Sua deficiência leva à diminuição de sua maturação. Ademais, evidências apontam que a presença desse receptor é fundamental para a síntese de IL-22. Células endoteliais apresentam receptores para IL-22, além de receptores IL-17R, permitindo que essas duas citocinas em conjunto atuem quebrando a integridade da BHE (VELDHOEN; HIROTA; WESTENDORF, 2008; JADIDI-NIARAGH; MIRSHAFIEY, 2011).

Outros fatores de transcrição recentemente relacionados ao estímulo para linhagem Th17 são o fator regulador de interferon 4 (IRF-4) e BATf (*basic leucine zipper transcription factor*) (JADIDI-NIARAGH; MIRSHAFIEY, 2011).

Da mesma forma que fenótipos Th1/Th2 são capazes de se inibir pelas citocinas IFN- $\gamma$  e IL-4 respectivamente, há evidências de que essas citocinas também antagonizem os passos iniciais para fenótipo Th17. Entretanto, uma vez desenvolvido o fenótipo, não podem mais suprimir ou reverter o processo. IFN- $\gamma$  pode prevenir a expansão de células Th17 via IL-23 e elevar a expressão de T-bet, desencadeando grande redução na geração de IL-17. Por outro lado, T-bet pode, surpreendentemente, se ligar a IL-23R e promover o desenvolvimento de Th17 (JADIDI-NIARAGH; MIRSHAFIEY, 2011).

Os fatores de transcrição STAT 1 e STAT 4 possuem a função de mediar a sinalização para produção de IFN- $\gamma$  e IL-12, sendo reguladores negativos para linhagem Th17. Células deficientes em STAT 1 apresentam elevação de produção de IL-17 (JADIDI-NIARAGH; MIRSHAFIEY, 2011).

A citocina IL-4 (típica de células Th2) é capaz de inibir o desenvolvimento de Th17. Sua sinalização passa pelos fatores de transcrição GATA-3, cMaf e STAT6 (Figura 20) (JADIDI-NIARAGH; MIRSHAFIEY, 2011).

Um dos principais reguladores negativos de Th17 é IL-27. Citocina estruturalmente relacionada à IL-6, sua sinalização ocorre de forma semelhante ao IFN- $\gamma$  (STAT 1). Foi demonstrado que a ausência de sinalização de IL-27 aumenta a inflamação crônica e se correlaciona diretamente com elevação na expressão de células Th17. Além do mais, essa citocina promove produção de IL-10, outra citocina inibidora desse fenótipo (BATTEN et al., 2006; STUMHOFER et al., 2006).

Inicialmente reconhecida como citocina produzida por fenótipos Th2, a IL-10 é atualmente também relacionada a células Th1 e Treg. É ligada de forma inequívoca à limitação da imunopatologia inflamatória pela regulação negativa da atividade Th17 (MCGEACHY et al., 2007).

Apesar de IL-25 estar incluída na família IL-17, não é produzida por Th17, mas por Th2 e mastócitos. Apresenta papel de regulação negativa para Th17 e está envolvida na expressão de produtos de Th2, como IL-5 e IL-13. Sua deficiência está relacionada à inflamação patogênica, com elevação de IL-17 e IL-23 (FORT et al., 2001; KLEINSCHEK et al., 2007).

A citocina IL-2 é reconhecidamente fator de crescimento para células T e sua deficiência leva à doença autoimune sistêmica. Esse fato pode ser explicado, em parte, pelo envolvimento dessa citocina na diferenciação e sobrevivência de Treg. Além disso, foi também demonstrado que IL-2 apresenta papel antagônico ao perfil Th17, restringindo a produção de IL-17 e que sua deficiência promove diferenciação de Th17 via STAT5a/b (JADIDI-NIARAGH; MIRSHAFIEY, 2011).

As células Th17 são caracterizadas pela produção de tipos distintos de citocinas, incluindo IL-17A (identificada em 1995), IL-17F, IL-6, IL-9, IL-21, IL-22, IL-23, IL-26 e TNF- $\alpha$ . Produção de IL-17 é uma importante característica das células Th17, mas também pode ser produzida por outros tipos celulares como neutrófilos, células NK, células  $\gamma\Delta$  e células T. São 6 tipos de citocinas pertencentes à família IL-17: IL-17A, B, C, D, E (IL-25) e F (JADIDI-NIARAGH; MIRSHAFIEY, 2011).

Em adição à célula Th17CD4+IL-17+, um novo fenótipo de células T (Th17-1) IL-17+ IFN- $\gamma$  foi identificado. Sua diferenciação em relação à Th17 pode ser feita por seus receptores de citocinas. Enquanto células Th17 expressam CCR6 e CCR4, células Th17-1 expressam CCR6 e CCR3 (JADIDI-NIARAGH; MIRSHAFIEY, 2011).

As células Th17-1 não tiveram esclarecidas sua origem, biologia e função. São classificadas em 2 subtipos baseados em sua expressão de receptores e níveis de produção de citocinas. Foi demonstrado que CCR1+CCR5- produzem grandes

quantidades de IL-17 e pouco IFN- $\gamma$ , enquanto CCR2+CCR5+ produzem grande quantidade de IFN- $\gamma$  e IL-17 (JADIDI-NIARAGH; MIRSHAFIEY, 2011).

O principal mediador de Th17 em relação à encéfalo-patogenicidade é IL-17A e possui receptores em células endoteliais, células epiteliais, fibroblastos, células mieloides e sinoviócitos. A citocina é potente indutora de infiltração neutrofílica e estimula a síntese e a liberação de muitos mediadores inflamatórios como IL-8, CXCL1, CXCL6, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , fator estimulador de colônias de granulócitos e monócitos (GM-CSF), proteína 2 inflamatória de macrófagos (MIP-2), proteínas quimotáticas de monócitos (MCP-1) e fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF) (IVANOV; MCKENZIE; ZHOU, 2006).

Além de todo o estímulo inflamatório desencadeado por IL-17, parece que sua principal função na patogênese é a quebra da BHE. Ao aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em células endoteliais de cérebro, foi verificado que o estresse oxidativo media a ativação da maquinaria contrátil do endotélio. Além disso, ROS levam à elevação da expressão de moléculas de adesão no endotélio e aumento de adesão e migração de células inflamatórias via BHE. A IL-17 ativa receptor endotelial para IL-17 (IL-17R), o que é sucedido pelo aumento na geração de ROS mediado por NAD(P)H, oxidase e xantina-oxidase. O estresse oxidativo ativa o sistema contrátil endotelial pela elevação de concentração de cadeias leves de miosina fosforiladas (MLC). Cadeias de miosina fosforiladas se associam com o citoesqueleto de actina, levando à contração celular e aumento dos espaços intercelulares da camada endotelial monocelular (KROENKE et al., 2008).

### 2.1.2.3 Células $\gamma\delta$ T

As células  $\gamma\delta$ T são uma população distinta de linfócitos que possuem funções imunológicas e imunoregulatórias. A expressão de receptores de células NK inibitórias em  $\gamma\delta$ T indicam papel na imunidade tumoral e em processos autoimunes. Duas frações foram descritas para essas células. A fração  $\gamma\delta$ T que expressa  $\nu\gamma$ 1 dentro dos tecidos epiteliais, onde promove primeira linha de defesa contra infecções e câncer. A segunda fração expressa  $\nu\gamma$ 2 e representa a grande maioria das células  $\gamma\delta$ T periféricas. Há necessidade de maior esclarecimento no papel fisiopatológico

dessas células já que as mesmas foram demonstradas em infiltrados de lesões crônicas e foram detectadas no líquido de pacientes com EM (SOSPEDRA; MARTIN, 2005).

#### 2.1.2.4 Células APC para CD4+

No SNC, para indivíduos saudáveis, macrófagos foram identificados como células predominantes a expressar MHC de classe 2 no espaço perivascular e líquido, possuindo papel central nas fases iniciais de EAE. A depleção dessas células inibe o desenvolvimento da doença (GOVERMAN, 2009).

Foi demonstrado que CD dentro do SNC ativam células T naive específicas para mielina e facilitam sua diferenciação para Th17. Em contraste, foi reportado que CD mieloides isoladas do SNC permitem diferenciação de ambos os tipos celulares Th1 e Th17, mas que as células isoladas no pico da doença são diferentes das presentes no início, sugerindo que essa modificação fenotípica possa contribuir para a remissão. É interessante notar que a depleção de CD plasmocitoides, que também podem infiltrar no SNC durante a inflamação, não facilitam o espriamento de epítomos, sugerindo que essas células regulam negativamente as respostas de células TCD4+ nesse ambiente (MILLER et al., 2007; DESHPANDE; KING; SEGAL, 2007).

Astrócitos e células da microglia provavelmente não são mediadoras iniciais de ativação de células T, pois apresentam baixa expressão de MHC em SNC de indivíduos saudáveis. Em contraste, durante a inflamação, células microgliais expressam MHC de classe 2 e moléculas coestimulatórias (IL-12 e IL-23). Essas células parecem fundamentais para manutenção da resposta autoimune no SNC. Astrócitos produzem citocinas/quimiocinas incluindo IL-33 e contribuem para degranulação de mastócitos e também interagem com essas células via CD40-CD40L. Todavia, análises mais detalhadas devem ser feitas para que o papel dessas células nos estágios mais avançados de EAE seja esclarecido, pois têm sido relatadas reduções na expressão de MHC classe 2 e reduções na expressão de moléculas coestimulatórias, se tornando APCs menos eficientes nos estágios de remissão da EAE (GOVERMAN, 2009; ELIEH-ALI-KOMI; CAO, 2017).

Apesar do papel pouco definido dos astrócitos como APC, essas células influenciam a resposta inflamatória através da produção de quimiocinas e citocinas. Astrócitos expressam galectina 9, que é ligante para *T cell immunoglobulin mucin domain 3 receptor* (TIM 3) de células T. A sinalização TIM 3 nessas células parece promover fenótipos pro-inflamatórios (GOVERMAN, 2009).

Em relação às células da micróglia, foi demonstrado que sustentam respostas autoimunes no SNC por desencadear a produção de mediadores inflamatórios pelas células T, causando posteriormente a morte das mesmas. A participação dessas células na inflamação está diretamente ligada à ativação do fator transcricional NF-kappa  $\beta$ , um regulador central de processos inflamatórios por codificar genes de citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 (GOVERMAN, 2009; GUO et al., 2014).

Em resumo, macrófagos e CD são provavelmente as APCs que ativam células T assim que infiltram no SNC; células da micróglia se tornam APCs competentes para CD4+ apenas após a inflamação, mas sua ativação também pode desencadear morte de células T; CD favorecem espraiamento de antígenos pela ativação de células T naive, enquanto que CD plasmocitóides diminuem respostas T CD4+ (GOVERMAN, 2009).

#### 2.1.2.5 Células T CD8

Dentro do contexto funcional, células T CD8 são mais adequadas à geração de danos no SNC que células T CD4 pelas razões abaixo (JADIDI-NIARAGH; MIRSHAFIEY, 2011):

- 1) Exceto pela neuróglia, nenhuma célula residente do SNC expressa MHC de classe 2. Isso pode ser induzido em astrócitos por IFN- $\gamma$ , mas não em oligodendrócitos ou neurônios, sendo, portanto, apenas reconhecidos por células T CD8;
- 2) Proliferação proeminente de células T CD8 de memória foi demonstrada em líquido, tecido cerebral e sangue de pacientes com EM;

- 3) Há mais células T CD8 em tecido cerebral de pacientes com EM que células T CD4;
- 4) Moléculas de MHC classe 1 podem ser induzidas em neurônios funcionalmente comprometidos;
- 5) Epítomos de mielina restritos ao HLA de classe 1 foram descritos para MBP, PLP, MAG e outros. Além disso, a resposta T citotóxica para MBP está aumentada em pacientes com EM;
- 6) Células T CD8 específicas para mielina secretam quimioatraentes (IL-16 e IP-10) para linfócitos T CD4 específicos para mielina.

#### 2.1.2.6 Células B e anticorpos

A observação que Igs estão elevadas no líquido de pacientes com EM foi a mais importante e inicial evidência do papel dos plasmócitos em EM e a não observação desse mesmo fenômeno no soro caracterizam essa produção dentro do SNC. Correlações entre elevação de anticorpos no líquido com episódios de piora também corroboram a importância humoral na patogênese (SOSPEDRA; MARTIN, 2005; ELIEH-ALI-KOMI; CAO, 2017).

Células B não atravessam a BHE intacta. Entretanto, assim que o processo inflamatório é instalado, células B, anticorpos e complemento podem entrar no SNC. Células B e anticorpos podem contribuir para a doença por diversos mecanismos (SOSPEDRA; MARTIN, 2005; ELIEH-ALI-KOMI; CAO, 2017):

- 1) Células B podem servir como APC para células T autorreativas;
- 2) Células B fornecem coestimulação para células T autorreativas;
- 3) Células B e anticorpos ligados aos tecidos podem recrutar células T autorreativas para o SNC;
- 4) Células T específicas podem ser ativadas no líquido por anticorpos e essas células, por sua vez, sustentam a ativação das células B produtoras de autoanticorpos;
- 5) A produção de anticorpos específicos contra mielina parece ser a forma mais importante de células B contribuírem para a patogênese.

Análises histopatológicas de tecido do SNC e análise de líquido demonstraram presença de células B, plasmócitos, anticorpos anti-mielina em lâminas de pacientes com EM em áreas de desmielinização ativa. Anticorpos podem participar diretamente do processo de desmielinização por opsonização da mielina para ação posterior de fagócitos. Outro mecanismo de ação dos anticorpos seria a ativação do complemento (presença demonstrada em áreas de desmielinização), levando à formação do complexo de ataque à membrana (CAM) e citólise mediada por complemento (GENAIN et al., 1999).

Os antígenos específicos para os anticorpos no líquido em EM devem ser ainda identificados. Muitos desses anticorpos não são direcionados contra os componentes principais da mielina, mas contra agentes infecciosos (SOSPEDRA; MARTIN, 2005).

MOG é o candidato mais interessante como autoantígeno para células B em EM. Anticorpos anti-MOG são capazes de causar destruição de mielina em EAE, em contraste com anticorpos anti-MBP ou anti-PLP. Anticorpos anti-MOG foram também encontrados em EM. Todavia, como esses anticorpos também são detectados em controles (GENAIN et al., 1999).

De forma surpreendente, anticorpos podem também desempenhar papéis protetores, supostamente por dois mecanismos importantes (SOSPEDRA; MARTIN, 2005):

- 1) Podem induzir resposta Th2;
- 2) Anticorpos contra componentes do SNC podem promover reparo miélinico. Anticorpos IgM contra certos antígenos de SNC estimulam remielinização em diferentes modelos de EAE.

### 2.1.2.7 Imunidade inata e seus mecanismos na EM

Receptores semelhantes ao Toll são (Toll-Like Receptors-TLR) expressos por diversos tipos celulares e, não somente, por aquelas que possuem papel imunológico. TLR têm importância no reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPS) gerando sinais pró-inflamatórios que deflagram os mecanismos da imunidade inata (SOSPEDRA; MARTIN, 2005).

Um aumento na expressão de TLR dentro do SNC é observada durante a EM, mesmo em ausência de envolvimento microbiano. Esses receptores sob estímulo de seus ligantes como dsRNA (TLR3), LPS (TLR4), peptídeos glicanos (TLR2 com TLR1/6) e DNA CpG viral (TLR9) induzem uma grande variedade de funções imunológicas em células gliais, como secreção de IFN tipo 1  $\alpha/\beta$ , citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e aumento na expressão de moléculas MHC classes 1 e 2 (ELIEH-ALI-KOMI; CAO, 2017).

A sinalização inapropriada de TLR pode contribuir para doenças como EM. A ocupação desses receptores em CD inibe efeitos imunossupressores de linfócitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> via IL-6. Já foi demonstrado que ratos deficientes em IL-6 são mais resistentes à indução de doenças autoimunes (PASARE; MEDZHITOV, 2003; SOSPEDRA; MARTIN, 2005).

Os TLRs podem também quebrar a tolerância periférica a antígenos próprios durante infecções crônicas. Assumindo que células T autoimunes são parte da população normal de células T, tem sido hipotetizado que, sob condições normais, APCs permanecem em estado inativo e induzem tolerância em células autorreativas. Portanto, estímulos podem ativar APCs e transformar linfócitos T autorreativos tolerantes em células efetoras. A exacerbação clínica de pacientes com EM durante infecções virais suporta essa teoria (SOSPEDRA; MARTIN, 2005).

A ativação dependente de TLR em macrófagos, micróglia e células dendríticas resultam na indução de citocinas como IL-6, IL-15 e TNF- $\alpha$  que participam da quebra de BHE e atração linfocitária, inflamação e modulação da imunidade adquirida (ELIEH-ALI-KOMI; CAO, 2017).

### 2.1.2.8 Mastócitos

Mastócitos surgem a partir de precursores CD 34<sup>+</sup>/CD117<sup>+</sup> e circulam no sangue como precursores, finalizando seus processos de maturação sob a influência de fatores de crescimento nos tecidos (DONG; ZHANG; QIAN, 2014).

Mastócitos são, comprovadamente, relacionados a doenças atópicas como asma, rinite alérgica e dermatite atópica. Essas células participam dos eventos da imunidade natural e adquirida, favorecendo ou levando a danos para o hospedeiro (SOSPEDRA; MARTIN, 2005; RYAN, 2009; CONSTANZA et al., 2012; ELIEH-ALI-KOMI; CAO, 2017).

Em relação à EM autores têm buscado elucidar o papel dos mastócitos na fisiopatologia da doença. Altos níveis de triptase e histamina são encontrados no líquido de pacientes com EM, sugerindo sua ativação. Acúmulos em sítios inflamatórios em áreas de desmielinização no cérebro e na medula espinhal foram também demonstrados (SOSPEDRA; MARTIN, 2005; RYAN, 2009; CONSTANZA et al., 2012; ELIEH-ALI-KOMI; CAO, 2017).

O acesso dos progenitores de mastócitos no cérebro se dá pelas leptomeninges durante os primeiros estágios de desenvolvimento da doença via vasos sanguíneos. É importante salientar que se distribuem em todos os tecidos, mas apresentam normalmente baixa concentração no SNC e sua elevação em EM foi relacionada à produção de quimiocinas, *Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted* (RANTES). Avaliações histológicas demonstraram, em cortes de cérebro de pacientes com EM, a presença da maioria dos mastócitos nas bordas das regiões de placas, agrupadas em áreas restritas de vênulas e capilares, representando as principais áreas de formação de edemas no cérebro (SOSPEDRA; MARTIN, 2005; RYAN, 2009; CONSTANZA et al., 2012; ELIEH-ALI-KOMI; CAO, 2017).

Mastócitos de roedores são classificados de acordo com a distribuição anatômica e conteúdo de seus grânulos em duas subpopulações: mastócitos de mucosas (MM), residindo nos tratos respiratório e gastrointestinal, e mastócitos de tecido conectivo (MTC), presentes na pele, cavidade peritoneal e tecido conectivo. Os MM são geralmente menores que MTC e se diferenciam também pelo conteúdo de proteases, proteoglicanos e histamina em seus grânulos. Em humanos, a presença

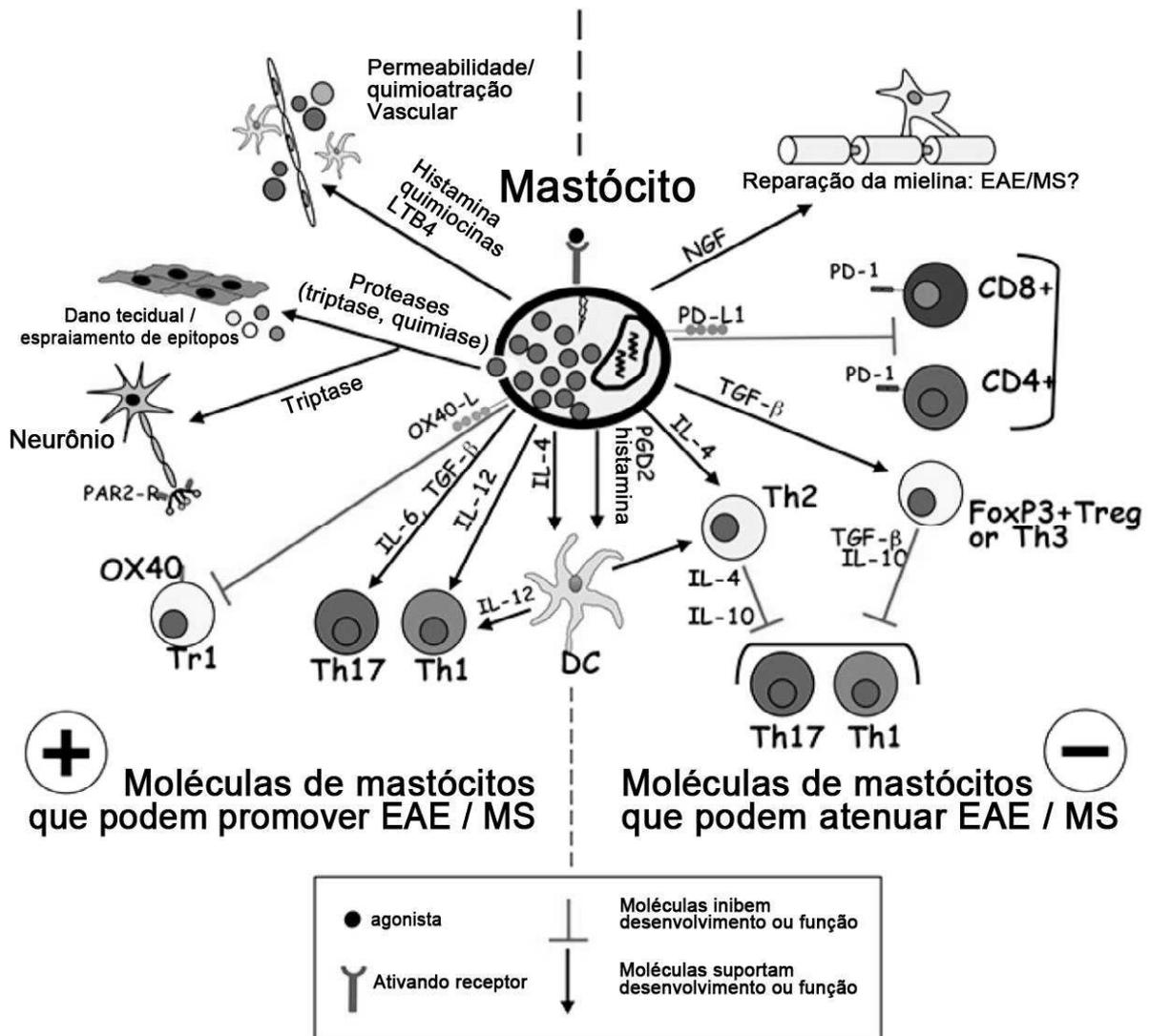
de triptase e quinase é usada para diferenciar dois subconjuntos de mastócitos. Os que possuem triptase e estão presentes no pulmão e na mucosa intestinal (MT) e os mastócitos que possuem triptase e quinase (MTQ) encontrados na pele (GALLI et al., 2011; MUKAI et al., 2018).

Dependendo das condições inflamatórias do tecido e de estímulos específicos, mastócitos têm demonstrado respostas biológicas variadas e até antagônicas “*in vivo*” e “*in vitro*” (Figura 21). Essa peculiaridade pode ser demonstrada pela interação entre mastócitos e células Treg (Foxp3+). Quando estimulados “*in vitro*” com lipopolissacáride (LPS) ou IFN- $\gamma$ , mastócitos têm desempenhado papéis de células APC, com preferencial expansão e diferenciação de células T naive específicas para Treg. Como parte dessa inter-relação, Treg apresenta, por sua vez, a capacidade de suprimir a degranulação de mastócitos dependente de Fc $\epsilon$ RI através da interação OX40-OX40L (KAMBAYASHI et al., 2009; CONSTANZA et al., 2012).

Mastócitos também podem direcionar diferenciação de células T para perfis Th1, Th2 e Th17 pelas citocinas que produzem (IL-4, IL-10, IL-13, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6). Além disso, expressam IL-4, IL-12, IL-15, e TNF- $\alpha$  e moléculas coestimulatórias CD154 e OX40L, que influenciam a maturação tanto de células dendríticas quanto de células T. Citocinas como IL-4, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e MIP- $\alpha$  podem afetar o tráfego de células por quimiotaxia direta e/ou proporcionar o surgimento de moléculas de adesão no endotélio (ELIEH-ALI-KOMI; CAO, 2017).

Em humanos e roedores, como dito anteriormente, a presença dessas células nas leptomeninges levou ao questionamento em relação ao papel dessas células no tráfego de células imunes através da BHE, aumentando a infiltração no SNC por recrutamento, adesão, rolamento e liberação de citocinas/quimiocinas de leucócitos (IL-16, TNF- $\alpha$ , IL-1) levando à indução de molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1) e molécula de adesão celular vascular 1 (VCAM-1) favorecendo assim o recrutamento de neutrófilos. Mastócitos humanos expressam receptor de corticotropina liberada (CRHR), cuja ativação leva à liberação de VEGF, que possui capacidade de neovascularização e vasodilatação (SOSPEDRA; MARTIN, 2005; SAYED et al., 2010; CONSTANZA et al., 2012; ELIEH-ALI-KOMI; CAO, 2017).

**Figura 21:** Prováveis mecanismos de atuação de mastócitos em EAE/EM



Fonte: NORTHWESTERN UNIVERSITY, 2017.

A participação de mastócitos na EM humana tem sido investigada indiretamente pelo seu papel em EAE. Muitos estudos histológicos têm examinado a frequência e distribuição de mastócitos em SNC e órgãos linfoides periféricos durante o curso da EAE em diferentes espécies animais. Alguns trabalhos relatam diminuição dessas células na dura-máter e no tálamo durante a fase aguda da doença em ratos, enquanto outros descrevem que não há modificações quantitativas. Resultados com aumento de três vezes na concentração dessas células também são citados na literatura. Entretanto, apesar das discordâncias quantitativas, muitos desses estudos são concordantes em apresentar resultados que apontam para elevação na porcentagem de mastócitos degranulados em cérebro de ratos que tenham

desenvolvido EAE, sugerindo a participação dessas células na fase ativa da doença (STANLEY; JACKSON; ORR, 1990; DIMITRIADOU; PANG; THEOHARIDES, 2000; CONSTANZA et al., 2012).

Em contraste com o demonstrado em ratos, no desenvolvimento de EAE em camundongos (WBB6F1 e C57BL/6), não foram identificados mastócitos degranulados ou infiltrado dessas células em áreas de desmielinização aguda (CONSTANZA et al., 2012).

Camundongos WBB6F1-Kit<sup>W/W<sup>v</sup></sup> carregam dois alelos mutantes (W) no cromossomo 5, correspondente ao gene c-Kit. A mutação W é pontual com substituição de guanina para adenina, levando à produção de um gene c-Kit truncado, com perda do domínio transmembrânico que não é expresso na superfície da célula. A mutação W-v é pontual com substituição de citosina por timina (resultando na mudança Thr660Met) no domínio tirosina quinase em c-Kit, resultando em diminuição expressiva de seu receptor de sinalização. Camundongos Kit<sup>W/W<sup>v</sup></sup> apresentam deficiência de mastócitos e outras anormalidades, como melanogênese, esterilidade, anemia, neutropenia e deficiência de células intersticiais de Cajal (NOCKA et al., 1990; HAYASHI et al., 1991; GRIMBALDESTON et al., 2005; KAWAKAMI, 2009).

Trabalhos iniciais demonstraram que camundongos WBB6F1-Kit<sup>W/W<sup>v</sup></sup> desenvolveram EAE crônica induzida por MOG<sub>35-55</sub> com menor severidade que os controles sem a mutação. Posteriormente, estudos do mesmo grupo comprovaram o papel dessas células no desenvolvimento da doença, agindo em órgãos linfoides secundários e no SNC. De fato, mastócitos foram identificados como necessários para o estabelecimento de uma resposta Th1 encefalocitogênica ótima em linfonodos e baço (SECOR et al., 2000; GREGORY et al., 2005).

Experimentos de reconstituição em ratos W/W<sup>v</sup> com precursores de mastócitos derivados de medula óssea de ratos selvagens (BMMCs) têm se mostrado extremamente práticos para o estudo de mastócitos “*in vivo*”. Tanzola et al. (2003) examinaram a cinética de distribuição tecidual de mastócitos derivados de medula óssea de ratos selvagens marcados com proteína fluorescente em ratos W/W<sup>v</sup> reconstituídos para identificar a influência de mastócitos antes e durante a EAE. Eles revelaram que o número de mastócitos em órgãos linfoides secundários muda com a progressão da EAE.

Além disso, mastócitos não foram detectados no cérebro ou medula espinhal durante o curso da doença, sugerindo que podem contribuir com a evolução da

doença por mecanismos fora do SNC. De fato, mastócitos são células dinâmicas capazes de migrar aos sítios de ativação de linfócitos T, onde, por sua vez, podem influenciar a geração de células da imunidade adaptativa (TANZOLA et al., 2003; ELIEH-ALI-KOMI; CAO, 2017).

A avaliação histológica de órgãos linfoides periféricos durante a fase de indução da EAE em camundongos C57BL/6 revelou grande número de mastócitos em certo grau de agrupamento dentro das áreas perifoliculares ricas em células T dos linfonodos de drenagem e presença de mastócitos ativados demonstrando interações espaciais com células Th17 e Treg. Esses achados sugerem uma potencial modulação mastocitária nas funções de Treg e Th17 fora do SNC (CONSTANZA et al., 2012).

Para determinar se mastócitos residentes afetam a infiltração de células T no cérebro e na medula espinhal, Gregory e colaboradores utilizaram populações de ratos selvagens (WT), ratos  $W/W^v$  e ratos  $W^{-/-}$  com suas populações de precursores de mastócitos reconstituídas por infusão venosa (BMMCs). O estímulo para EAE foi feito com MOG<sub>35-55</sub> e análise das populações de células T no SNC por citometria de fluxo. O trabalho demonstrou redução na porcentagem de células T CD4 e CD8 no SNC de ratos  $W/W^v$  quando comparados com controles selvagens. Em relação aos ratos reconstituídos, células T CD4, diferentemente de células T CD8 (requerem sinais de mastócitos do SNC), puderam infiltrar (GREGORY et al., 2005).

A fim de investigar melhor o papel das citocinas originadas de mastócitos, Gregory et al. (2005) usaram um modelo de reconstituição de mastócitos e investigaram o papel de IL-4 derivada de mastócitos promovendo resposta Th1 *in vivo*. Apesar de IL-4 ser melhor conhecida como promotora de população Th2, já foi demonstrada sua participação em respostas Th1. Nesse experimento  $W/W^v$  foram reconstituídos por células progenitoras de animais selvagens e uma segunda população de  $W/W^v$  recebeu células IL-4<sup>-/-</sup>. Ambos os grupos foram imunizados por MOG<sub>35-55</sub>. Análises mostraram que IL-4 influencia aumentando lesões neuronais na EAE promovendo células Th1 (ELIEH-ALI-KOMI; CAO, 2017).

Apesar de vários estudos, como os citados anteriormente, terem caracterizado a importância de mastócitos no desenvolvimento de EAE em ratos e camundongos, há importantes discrepâncias na literatura, demonstrando, por exemplo, desenvolvimento de EAE em  $WBB6F1\text{-Kit}^{W/W^v}$  com igual, ou até maior severidade, que em animais selvagens. As razões para esses dados conflitantes

devem ser melhor investigadas, mas é possível que possam estar relacionadas às diferentes técnicas de indução utilizadas nos experimentos (SECOR et al., 2000; PICONESE et al., 2011; CONSTANZA et al., 2012).

O protocolo do trabalho original usado por Secor et al. (2000), para indução de EAE, que demonstrou proteção para EAE em Kit<sup>W<sup>W</sup>v</sup> foi muito mais forte que os protocolos que geralmente são usados para induzir EAE em rotina. Nos trabalhos que demonstraram susceptibilidade total de camundongos c-Kit<sup>W<sup>W</sup>v</sup> para EAE, a doença foi desencadeada por concentrações menores de peptídeos e adjuvantes. De fato, foi demonstrado que camundongos c-Kit<sup>W<sup>W</sup>v</sup> desenvolveram EAE mais branda que controles apenas sob um protocolo de “forte” imunização. Quando um protocolo mais brando foi aplicado, EAE foi levemente exacerbada nesses animais (SECOR et al., 2000; PICONESE et al., 2011; CONSTANZA et al., 2012). Além do mais, trabalhos demonstraram que, mesmo sob condições de imunização relativamente branda, houve relatos de diminuição da severidade de EAE em c-Kit<sup>W<sup>W</sup>v</sup> sugerindo que outros fatores, além da técnica de imunização, influenciam no desenvolvimento de EAE após o estímulo (BENNETT et al., 2009; FEYERABEND et al., 2011; PICONESE et al., 2011; CONSTANZA et al., 2012).

Esses dados controversos tiveram sua análise ainda mais dificultada quando comparados a trabalhos com camundongos C57BL/6-Kit<sup>W-sh/W-sh</sup> (camundongos com essa mutação para inativação do gene c-kit apresentam severa deficiência em mastócitos) (NOCKA et al., 1990; HAYASHI et al., 1991). Surpreendentemente, foi demonstrado que EAE nesses animais foi exacerbada em relação aos controles com início precoce e progressão mais severa, sob diferentes condições de imunização (NOCKA et al., 1990; HAYASHI et al., 1991; GRIMBALDESTON et al., 2005; KAWAKAMI, 2009; PICONESE et al., 2011).

Alguns trabalhos descrevem um perfil mais pró-inflamatório de células T autorreativas em órgãos linfoides periféricos de animais Kit<sup>W-sh/W-sh</sup>. De fato, células T específicas para mielina em camundongos deficientes de mastócitos apresentam resposta proliferativa maior a estímulo por MOG<sub>35-55</sub>, elevação de secreção de citocinas Th1/Th17, como IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-17A e diminuição de citocinas supressoras de Th2, como IL-4, IL-5, IL-10. Severidade clínica elevada também foi relacionada a diminuição da frequência de Treg no baço e no SNC (PICONESE et al., 2011; LI et al., 2011).

Coletivamente, os trabalhos discutidos acima descrevem um cenário ambíguo sobre o envolvimento de mastócitos na fisiopatologia da EAE. De fato, em modelos c-Kit, uma certa variabilidade no resultado da doença nas mesmas cepas deficientes de mastócitos, como em Kit<sup>W/W<sup>v</sup></sup> versus Kit<sup>W-sh/W-sh</sup> foi demonstrado. No todo, a expressão de EAE em Kit<sup>W/W<sup>v</sup></sup> parece ser afetada pelas condições de imunização, enquanto que em camundongos Kit<sup>W-sh/W-sh</sup>, a doença se desenvolve de forma similar ou mais intensa que em controle que desenvolveram EAE sem as mutações supracitadas (LI et al., 2011; CONSTANZA et al., 2012; YIN et al., 2017).

Diferentes resultados obtidos no mesmo modelo deficiente em mastócitos pode refletir a plasticidade e sua variável resposta a diferentes formas de estímulos, mas também às condições ambientais dos camundongos, composição de sua microbiota intestinal ou outras razões ainda não esclarecidas. Divergências entre modelos Kit<sup>W/W<sup>v</sup></sup> e Kit<sup>W-sh/W-sh</sup> podem variar de acordo com a constituição genética ou resultar de alterações hematopoéticas complexas nesses animais (LI et al., 2011; CONSTANZA et al., 2012; YIN et al., 2017).

Um trabalho buscou avaliar a contribuição de mastócitos em EAE em um novo modelo de camundongos deficientes de mastócitos, independentes de anormalidades de c-Kit. A inserção de uma Cre-recombinase no *locus* carboxipeptidase A3 (Cpa3) de mastócitos por recombinação resulta em seletiva deleção da linhagem mastocitária. Em ratos heterozigotos Cpa3<sup>cre/+</sup> revelou ablação nas populações de mastócitos de mucosas e tecido conjuntivo no intestino, pele e cavidade peritoneal, além de redução parcial nos basófilos esplênicos. Ratos Cpa3<sup>cre/+</sup> desenvolveram EAE com severidade clínica, infiltração de SNC por células do sistema imune e resposta periférica de células T à MOG<sub>35-55</sub> comparável aos controles. Coletivamente, os dados obtidos em modelo Cpa3<sup>cre/+</sup> indicaram que mastócitos não promovem e nem diminuem a resposta autoimune que ocorre no SNC durante EAE e desempenham papel redundante na expressão clínica da doença (FEYERABEND et al., 2011).

Em resumo, tem sido sugerido que mastócitos participam da fisiopatologia de EAE e EM da seguinte forma (SOSPEDRA; MARTIN, 2005):

- 1) Têm a capacidade de agir como APCs e influenciar EM modulando resposta Th1/Th2.
- 2) Possuem atividade pró-inflamatória em EAE de acordo com o protocolo de estímulo.

- 3) Possuem atividade pró-inflamatória em EM.
- 4) Em modelos de EAE que utilizam camundongos, exercem sua influência de forma mais contundente a partir de órgãos linfoides secundários, já que diversas técnicas histológicas não demonstraram sua presença significativa no SNC desses animais.
- 5) A degranulação de mastócitos em resposta a MBP pode levar a desmielinização *in vitro* via enzimas proteolíticas com destruição de neurônios.
- 6) A maior prevalência da EM em mulheres pode provavelmente estar relacionada ao fato de que mastócitos apresentam receptores de estrogênio.

#### 2.1.2.9 Neutrófilos

Apesar de ainda não ter sido provado o tráfico de neutrófilos pelas meninges, trabalhos confirmaram a entrada precoce de neutrófilos no SNC em EAE, um evento mastócito-dependente (BROWN; MCFARLIN; RAINE, 1982; SAYED et al., 2010; CHRISTY, 2013).

O papel dos neutrófilos em EM e em outras doenças de SNC permanece controverso. Apesar de serem detectados em SNC, possuem vida curta e compreendem uma proporção relativamente menor das células do infiltrado, o que talvez obscureça seu papel na fisiopatologia dessas doenças. Todavia, em EAE, aparecem bem documentados (CHRISTY, 2013).

Foi demonstrado na literatura que neutrófilos são fundamentais para a quebra da BHE em EAE e seu desenvolvimento pelo uso de anticorpos para depleção de CXCR2 (receptor de quimiocinas em neutrófilos). Doenças associadas a quebra de BHE e susceptibilidade a essas doenças pode ser restaurada pela transferência de neutrófilos de ratos selvagens à ratos CXCR2<sup>-/-</sup>, indicando ser essa sinalização fundamental para funções neutrofilicas em EAE (CARLSON, 2008).

A chegada precoce e relativamente sustentada por, pelo menos, 22 dias de neutrófilos nas meninges é consistente com a ideia de que essas células inicialmente exercem papéis mais localizados em termos de permeabilidade vascular através de

alterações da BHE que permeia os vasos sanguíneos das meninges (CHRISTY, 2013).

A destacada inflamação das meninges, refletida na grande expressão de mediadores imunológicos e no influxo de células, sugere que, talvez, a localização inicial dos neutrófilos seja um pré-requisito para o processo patológico no SNC associado à EM/EAE. Citocinas, por sua vez, possuem papéis centrais no desenvolvimento desse ambiente inflamatório. O TNF- $\alpha$  que, além de estimular o recrutamento de neutrófilos e CDs, ativa em neutrófilos a expressão de mediadores (alguns dos quais expressos nos estágios iniciais da doença nas meninges) capazes de recrutar células Th1 (CCL2, CXCL9 e CXCL10) e células Th17 (CCL2 e CCL20). Em adição à essa escalada inflamatória, Th17 libera IL-17, que recruta neutrófilos, e GM-CSF, que prolonga a vida dessas células no tecido (CHRISTY, 2013).

#### 2.1.2.10 Células *natural killer* (NK)

Essas células parecem exercer importante papel imunoregulatório em EM. A associação entre queda de atividade de células NK e a evolução clínica da EM foi descrita pela primeira vez em 1980. Trabalhos com citometria de fluxo demonstraram a real diminuição dessas células em pacientes com EM, apontando para importante papel imunorregulatório das mesmas nessa doença (KASTRUKOFF et al., 1998; SOSPEDRA; MARTIN, 2005; ELIEH-ALI-KOMI; CAO, 2017). Sua queda se reflete em sangue periférico, líquor e nas regiões de desmielinização no SNC. Células NK podem suprimir autoimunidade pela produção de citocinas (IL-5, IL-13, TGF- $\beta$ ) ou por indução de lise via perforina. Em relação à EAE, foi também demonstrado que a queda dessas células leva a um aumento da severidade e da mortalidade dos animais em estudo (KASTRUKOFF et al., 1998; SOSPEDRA; MARTIN, 2005; ELIEH-ALI-KOMI; CAO, 2017).

#### 2.1.2.11 Células NKT

Essas células exercem papel imunorregulatório importante em doenças autoimunes. Ambas células NKT CD4 positivas e CD4 negativas expressam um TCR

de cadeia alfa (V $\alpha$ 24j $\alpha$ Q) pareado com segmento V $\beta$ 11. Células NKT reconhecem glicolípides presentes em moléculas não MHC clássicas, como CD1d. Uma considerável redução de V $\alpha$ 24j $\alpha$ Q entre células V $\alpha$ 24+ tem sido observada no sangue de pacientes com EM (ILLES et al., 2000; SOSPEDRA; MARTIN, 2005).

O papel dessas células em EM é teorizado por dados em EAE. Um glicolípido sintético, análogo à alfa-galactosilceramida que se liga à CD1d e estimula NKT em humanos e ratos, suprime EAE por indução seletiva de IL-4. NKT CD4+ são provavelmente as células NKT de maior atividade regulatória (VAN DER VLIET et al., 2001; SOSPEDRA; MARTIN, 2005).

#### 2.1.2.12 Macrófagos e radicais livres de oxigênio

Os macrófagos são os principais responsáveis pelo dano à mielina e os produtos de degradação de mielina podem ser encontrados no interior dos mesmos. Possuem também capacidade enzimática de gerar altas concentrações de radicais livres de oxigênio e nitrogênio, que são detectadas em lesões de SNC de pacientes com EM (SOSPEDRA; MARTIN, 2005).

Por outro lado, macrófagos estimulam reparo tecidual (remielinização) pois células progenitoras de oligodendrócitos respondem à lesões desencadeadas pelos mesmos, se dividem e se diferenciam em células ativas, promotoras da síntese de novas camadas de mielina (FRANKLIN et al., 2012; ELIEH-ALI-KOMI; CAO, 2017).

### 2.1.2.13 Complemento

Todos os principais componentes celulares do SNC são capazes de produzir proteínas do complemento. Astrócitos são as principais fontes de complemento no SNC, favorecendo proteção contra patógenos ou promovendo lesão em algumas doenças. A desmielinização na EM ocorre também com a contribuição das proteínas do complemento, tanto pela via clássica como pela ativação direta após ligação dessas proteínas à mielina. MOG pode ser capaz de ligar e ativar o componente C1q do complemento, pois carrega um domínio similar à região de ligação de C1q à anticorpos (JOHNS; BERNARD, 1997; SOSPEDRA; MARTIN, 2005).

A ativação de complemento é mais um fator desencadeante de lise de oligodendrócitos, além de promover quimiotaxia de macrófagos para a região. A susceptibilidade dos oligodendrócitos à essa atividade pode ser facilitada pela falta de expressão de inibidores do complemento como CR1 (CD35), proteína cofatora de membrana (CD46), fator homólogo de restrição ou heterogeneidade de outros, como CD59 (JOHNS; BERNARD, 1997; SOSPEDRA; MARTIN, 2005).

### 2.1.2.14 Citocinas

Na manutenção da homeostase, um balanço dinâmico entre citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias é necessário. As citocinas pró-inflamatórias provavelmente desempenham papel importante na patogênese da EM via sistema imune na periferia e/ou por dano direto à estrutura mielina/oligodendrócito (SOSPEDRA; MARTIN, 2005).

Elevadas concentrações de TNF $\alpha$  no soro e células mononucleares de sangue periférico (PBMC) secretoras têm sido relatadas em pacientes com EM. Sua expressão é elevada em áreas de desmielinização se comparadas com regiões de remielinização ou inativas. Além de seu papel na inflamação, TNF- $\alpha$  também está envolvido nos processos de reparo tecidual no cérebro (BITSCH et al., 2000).

Resultados em relação ao IFN- $\gamma$  no sangue de pacientes com EM são conflitantes. Existe a percepção de que células T secretoras de IFN- $\gamma$  são

encefalitogênicas, mas animais “*knock out*” para IFN- $\gamma$  desenvolveram formas mais graves e até letais de EAE comparados à controles. A IL-12 (o maior estimulador para produção de IFN- $\gamma$ ) tem sido implicada como citocina pró-inflamatória e IL -23, citocina que compartilha a cadeia p40 com IL-12, é o principal mediador desses efeitos (SOSPEDRA; MARTIN, 2005).

Há diferentes mecanismos propostos para justificar a desmielinização por estímulo de citocinas (SOSPEDRA; MARTIN, 2005):

- 1) TNF $\alpha$  e IFN- $\gamma$  podem ser tóxicos para oligodendrócitos;
- 2) Citocinas podem ativar macrófagos e micróglia, que irão fagocitar mielina;
- 3) Citocinas pró-inflamatórias podem estar envolvidas na indução de apoptose e desmielinização.

A IL-17 está também em concentração relevante no SNC de pacientes com EM, assim como IL-6, uma citocina de atividade anti e pro-inflamatória que foi demonstrada no soro de paciente com EM (SOSPEDRA; MARTIN, 2005).

Dados em relação às citocinas anti-inflamatórias em EM são similarmente contraditórios. Queda de células PBMC secretando IL-10 e baixas concentrações de IL-10, em EM foram relatados. Além do mais, investigadores têm descrito quedas na expressão de IL-10, mas alto número de PBMC expressando RNAm para IL-10 antes das recidivas clínicas (LINK et al., 1994; HUANG et al., 1999; SOSPEDRA; MARTIN, 2005).

Alta concentração de PBMC expressando RNAm para IL-4 tem sido observada de forma não esperada em líquido de pacientes com lesões de EM. Estudos com IL-10 e IL-6 têm se mostrado contraditórios. Assumindo papel protetor para perfil Th2, pelo menos duas interpretações podem ser propostas (LINK et al., 1994; HUANG et al., 1999; SOSPEDRA; MARTIN, 2005):

- 1) Essas citocinas, principalmente IL-10, podem estar envolvidas na patogênese por promover proliferação de células B, diferenciação e produção de anticorpos;
- 2) Presença de IL-4, IL-10 e TGF- $\beta$  em líquido de EM pode refletir o contínuo dos mecanismos imunorregulatórios que são iniciados após exacerbação da doença e são também importantes para resolução/prevenção de EAE.

### 2.1.2.15 Quimiocinas

Quimiocinas e seus receptores têm papéis centrais no recrutamento de células durante o processo inflamatório. Essas moléculas favorecem o processo de migração de linfócitos T e monócitos através da BHE mediante dois mecanismos (MACHADO et al., 2012):

- 1) Quimiotaxia;
- 2) Ativação da união de integrinas linfocitárias a receptores específicos de células endoteliais.

As quimiocinas que atuam nestes processos e foram identificadas são MIP-1 $\alpha$  (CCL3), MCP-1 (CCL7) e MIP-2, IP-10 (CXCL10) e RANTES (CCL5), assim como seus respectivos receptores CXCR3 e CCR5. Estudos demonstram que este grupo de quimiocinas são preferencialmente quimioatrativos para linfócitos Th1 (MACHADO et al., 2012).

A chegada de células T inflamatórias no SNC inicia com a fraca adesão e rolamento no endotélio da BHE, seguido pela firme ligação da célula no endotélio e posterior diapedese através da mesma. Quimiocinas induzem o surgimento de moléculas de adesão leucocitárias que medeiam essa firme adesão e estabelecem um gradiente quimiotático que resulta no recrutamento de células que tenham aderido. Outro processo que facilita a quebra da BHE é a indução de enzimas proteolíticas durante o desenvolvimento desse processo (SOSPEDRA; MARTIN, 2005).

Entre vários receptores de quimiocinas, CCR5 e CXCR3 têm recebido atenção como receptores chave para respostas orquestradas por população Th1, assim como CCR3 e CCR4 para Th2. Além desses, CCR7, um importante marcador para capacidade de migração de mononucleares à órgãos linfoides secundários, também é alvo de interesse. Abaixo estão os principais achados de quimiocinas no sangue, líquor e nas lesões de pacientes com EM (STRUNK et al., 2000; SORENSEN et al., 2001; CALABRESI et al., 2002; SOSPEDRA; MARTIN, 2005).

#### 2.1.2.15.1 Sangue

Expressão de CCR5 está elevada em células T circulantes de pacientes com EM, inclusive durante as recaídas. Também está documentada a elevação da expressão de CXCR3 em células T circulantes. É importante ressaltar que células T expressando CCR5 e CXCR3 em EM produzem altas quantidades de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , e células Th1 MPB específicas expressam altas concentrações de CXCR3 e CXCR6 (STRUNK et al., 2000; SORENSEN et al., 2001; CALABRESI et al., 2002; SOSPEDRA; MARTIN, 2005).

#### 2.1.2.15.2 Líquor

As moléculas RANTES e CXCL10 estão elevadas no líquido de pacientes com EM, enquanto CCL2 (MCP-1) está significativamente diminuída. Esse fato foi confirmado durante exacerbações da doença e não ocorre nas remissões. CCL3 tem sido encontrado no líquido de pacientes com EM, assim como em outras doenças neuroinflamatórias (STRUNK et al., 2000; SORENSEN et al., 2001; CALABRESI et al., 2002; SOSPEDRA; MARTIN, 2005).

Em relação à receptores de citocinas, estudos iniciais documentaram elevada proporção de células T no líquido que expressam CXCR3 e CCR5 comparados com PBMC. CXCR3 provavelmente facilita a entrada de células T no líquido, e CXCL10 media a retenção dessas células no SNC inflamado. Células Th1 CCR5+ e CXCR3+ no líquido também expressam CCR7. Monócitos infiltrados no líquido expressam CCR1 e CCR5 em altos níveis. Todavia, resultados similares foram obtidos em controles, sugerindo que a presença de monócitos CCR1+/CCR5+ é independente da inflamação no SNC (STRUNK et al., 2000; SORENSEN et al., 2001; CALABRESI et al., 2002; SOSPEDRA; MARTIN, 2005).

### 2.1.2.15.3 Lesões cerebrais

Algumas quimiocinas e seus receptores foram detectados em lesões cerebrais, indicando que possam ser alvos terapêuticos. CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ), CCL4 (MIP-1 $\beta$ ) e CCL5 (RANTES) são expressos dentro de lesões de EM. O CCL4 está presente nas células inflamatórias do parênquima (macrófagos e micróglia), CCL3 também no parênquima das células inflamatórias e neuróglio ativada e CCL5 nas células inflamatórias perivasculares e em menor concentração nos astrócitos. Outras quimiocinas ativas em lesões de EM incluem CCL2 (MCP-1), CCL7 (MCP-3), CCL8 (MCP-2) e CXCL10 (IP-10). O CXCR3 é expresso na maioria das células perivasculares em lesões cerebrais de EM e CCR5 em um subconjunto dessas células. Elevadas expressões de CCL2, CCL3, CCL5 e CXCL10 em EAE são associadas com a progressão da doença e a depleção *in vivo* melhora a EAE. Ratos deficientes em CCR2, e em uma menor extensão em CCR1, falham em exibir sintomas de EAE (SOSPEDRA; MARTIN, 2005).

Em contraste, ratos deficientes em CCR5 demonstraram severidade da doença similar em relação aos controles. Esses dados sugerem que CCR5 não participa do processo de acúmulo de células T no SNC durante a EAE (SOSPEDRA; MARTIN, 2005).

Polimorfismos em genes de quimiocinas e seus receptores foram sugeridos como fatores de susceptibilidade ou resistência à EM. Como exemplo pode ser citado o polimorfismo de CCR5 $\Delta$ 32. Essa mutação leva a um receptor não funcional e tem sido associada a uma queda na severidade de EM. Polimorfismos em CCL7(MCP-3) também foram associados com resistência à EM (SOSPEDRA; MARTIN, 2005).

As metaloproteinases (MMP) também permitem a passagem de células inflamatórias para dentro do SNC (células T e monócitos) e representam uma família de enzimas proteolíticas. São produzidas por células T ativadas, monócitos, astrócitos e células da micróglia, podendo provocar dano direto à bainha de mielina (MACHADO et al., 2012).

## 2.2 ANTÍGENOS DE MIELINA

### **2.2.1 Proteína básica de mielina (PBM)**

A PBM é a segunda proteína mais abundante na constituição da mielina (30 a 40%) e a melhor estudada em EM, sendo a primeira a ser exaustivamente usada em protocolos para desenvolvimento de EAE. São 5 isoformas diferentes em mamíferos com variação de 14 a 21 KDa. A PBM mais básica é posicionada na superfície intracelular das membranas de mielina e está envolvida com a manutenção da estrutura compacta da mesma. É encontrada em quantidades significantes na mielina central e periférica e seus transcritos foram demonstrados em órgãos linfoides secundários. EAE pode ser induzida com PBM em diferentes cepas de ratos e camundongos, porquinhos da Índia e primatas não humanos. Evidência adicional para PBM em EM inclui reação cruzada entre células Th1 específicas para PBM e uma sequência idêntica no antígeno U24 de vírus HHV-6 (BRUNO et al., 2002; SEAMONS; PERCHELLE; GOVERMAN, 2003).

### **2.2.2 Proteína proteolipídica (PPL)**

A PPL é a proteína hidrofóbica mais abundante na mielina do SNC (aproximadamente 50%). Em ratos há dois transcritos principais, uma isoforma com 276 aminoácidos e uma isoforma (DM-20) não encefalitogênica na qual faltam 35 aminoácidos em sua estrutura. Esta última é expressa principalmente no cérebro e medula espinhal anterior à mielinização, mas também em órgãos linfoides periféricos, onde a isoforma completa é raramente encontrada. A PPL tem grande capacidade de desencadear encefalite se comparado com PBM, particularmente em modelos usando ratos SJL/J (BRUNO et al., 2002; SEAMONS; PERCHELLE; GOVERMAN, 2003).

### **2.2.3 Glicoproteína de mielina dos oligodendrócitos (MOG)**

Entre proteínas importantes de mielina a MOG é a menos abundante (0,01 a 0,05%). É uma glicoproteína com 218 resíduos de aminoácidos transmembrânicos. Está localizada na superfície externa da membrana dos oligodendrócitos e, devido a essa localização, é diretamente acessível à resposta imune humoral e celular, sendo provavelmente um alvo importante para essas respostas em EM. MOG é expressa somente no cérebro, medula espinhal e retina. Está ausente em inervação periférica e quase completamente ausente em órgãos linfoides periféricos. EAE induzida por MOG é melhor verificada em ratos C57/BL6, onde há evolução crônica, não recidivante da doença (MENDEL et al., 1995; BRUNO et al., 2002; SEAMONS; PERCHELLE; GOVERMAN, 2003).

#### **2.2.4 Outros antígenos mielínicos e não mielínicos para LTCD4+**

##### **2.2.4.1 Glicoproteína associada a mielina (MAG)**

Glicoproteína de elevado PM (100KDa) localizada na face interna da bainha de mielina. Representa menos de 1% das proteínas de mielina no SNC e menos abundante ainda no sistema nervoso periférico. Sua relevância patogênica foi documentada por neuropatias causadas por anticorpos IgM anti-MAG. Desencadeia EAE em ratos ABH (H-2A<sup>97</sup>) e linfócitos B e T específicos foram observados em líquido de pacientes com EM por técnica de ELISPOT. A localização periférica das lesões no cerebelo e prosencéfalo (encéfalo frontal) em EAE MAG-induzida em ratos Lewis suporta a teoria de que a localização das lesões é relacionada à especificidade antigênica (ANDERSSON et al., 2002).

##### **2.2.4.2 Nucleotídeo cíclico 3' fosfodiesterase (CNPase)**

CNPase existe em 2 variantes (CNPase 1 e 2, com 46 KDa e 48KDa respectivamente) e fazem um total de 3 a 4% do total de proteínas da mielina. Presente em oligodendrócitos, células de Schwann e em menor concentração nos órgãos linfoides. É imunogênica em roedores e humanos. Uma área C terminal é um dos epítomos reconhecidos pela elevada afinidade a linfócitos T específicos de pacientes com EM (BIELEKOVA et al., 2004; SOSPEDRA; MARTIN, 2005).

#### 2.2.4.3 Proteína básica de mielina de oligodendrócito (MOBP)

Existem variantes, sendo que, a forma com 81 aminoácidos, é mais abundante em mielina de roedores e humanos. Exclusivamente expressa em oligodendrócitos, aparecendo tardiamente na mielinização, é localizada na linha mais densa e compacta de mielina. Desencadeia EAE em ratos SJL/J. Estudos preliminares de resposta celular anti-MOBP em pacientes com EM identificaram uma região imunodominante e atividade de células T específicas se mostraram coerentes com áreas de atividade inflamatória em imagens de ressonância magnética (IRM) (HOLZ et al., 2000; KAYE et al., 2000).

#### 2.2.4.4 Glicoproteína específica de oligodendrócito (OSP)

É a terceira mais abundante proteína de mielina (7%) expressa no SNC e pertence ao grupo de proteínas de junção-firme, sendo renomeadas como OSP/Claudin-11. Muitos desses peptídeos induzem EAE em ratos SJL/J e anticorpos anti-OSP são encontrados no líquido de pacientes com EM tipo remitente recorrente (EMRR) (VU et al., 2001).

#### 2.2.4.5 $\alpha$ - $\beta$ Cristallin ( $\alpha$ - $\beta$ -C)

Ao contrário das proteínas de mielina discutidas anteriormente,  $\alpha$ - $\beta$ -C foi identificada como uma proteína candidata a alvo para o sistema imune em pacientes com EM e não em modelos de EAE. É o maior constituinte das lentes dos olhos, mas também são expressas em astrócitos e oligodendrócitos em pacientes com lesões ativas de EM (CHOU et al., 2004; SOSPEDRA; MARTIN, 2005).

#### 2.2.4.6 Proteína S100 $\beta$

Kawakami et al. (2004), examinaram a proteína S100 $\beta$  ligante de cálcio derivada de astrócitos em ratos Lewis e encontraram intensa resposta imune contra epítopos dessa proteína. De forma diferente dos antígenos de mielina, a transferência de células T específicas para esta proteína levou a uma panencefalite. Entretanto, houve déficit clínico insignificante, relacionado à ausência de recrutamento de macrófagos, apesar do extenso infiltrado de linfócitos.

#### 2.2.4.7 Transaldolase-H (Tal-H)

Foi descoberta com homologia para a proteína gag p17 do vírus linfotrópico humano tipo 1 (HTLV1). É uma enzima da via metabólica da pentose fosfato e é expressa em oligodendrócitos, células de Schwann e tecidos linfoides. Anticorpos de elevada afinidade para essa proteína foram isolados em líquido de pacientes com EM (SOSPEDRA; MARTIN, 2005).

#### 2.2.4.8 Imunoglobulinas como antígenos T

Holmoy, Vandvik e Vartdal (2003), examinaram a hipótese de que a síntese intratecal de imunoglobulinas (Ig) está envolvida na perpetuação da resposta de células T. Encontraram reações proliferativas de LT no líquido de 14 entre 21 pacientes com EM e em 4 de 17 controles. Esses achados suportam a hipótese de que IgG possa servir como antígenos próprios, o que perpetuaria a autorreatividade de células T.

#### 2.2.4.9 Componentes lipídicos como antígenos para células T CD4+ em EM

Paralelamente à observação de elevada concentração de anticorpos antiganglicosídeos na forma crônica progressiva de EM, Pender et al. 2003, encontraram células T com reatividade para ganglicosídeos GM3 e GQ1b apenas em esclerose múltipla primária progressiva (EMPP). Esses resultados sugerem que células T específicas para ganglicosídeos podem contribuir para o dano axonal nessa forma clínica de EM.

### 2.3 ENCEFALOMIELEITE AUTOIMUNE EXPERIMENTAL

A EAE é uma doença inflamatória do SNC induzida através da imunização ativa ou através da transferência adotiva de células T CD4<sup>+</sup> reativas contra a mielina. Pela similaridade clínica, morfológica e histológica com a EM humana, é aceita como modelo animal para a mesma. Experimentos de vacina contra a raiva realizados por Pasteur em 1875 permitiram a caracterização inicial da doença pois ao inocular o vírus cultivado no SNC de animais de experimentação, havia o desenvolvimento de encefalomielite pós vacinal em alguns animais devido a presença de componentes da mielina na preparação da vacina (HUYNH et al., 2008; MIX et al., 2010; FONTES, 2013).

Os primeiros animais utilizados em experimentos (imunizados com estratos cerebrais de coelhos) com EAE foram os macacos Rhesus. Há atualmente variações do modelo de acordo com o tipo de animal utilizado e o material escolhido para indução (Quadro 1) (FONTES, 2013). Em ensaios subsequentes, à medida que os processos fisiopatológicos de EAE foram melhor esclarecidos, pesquisadores impulsionaram a resposta imune com adjuvante de Freund (CFA) e toxina Pertussis (MIX et al., 2010; FONTES, 2013).

Até os anos 80 ratos da espécie *Leius* eram os animais de laboratório de escolha para EAE. Quando induzidos com PBM desenvolvem a doença cuja evolução clínica pode ser comparada a EM secundária progressiva (EMSP). Porém, a ausência da desmielinização, característica presente na EM humana, fez com que outros modelos fossem cada vez mais usados (CROXFORD; KURSCHUS; WAISMAN, 2010; MIX et al., 2010; FONTES, 2013).

O uso do peptídeo PLP em camundongos de linhagem SJL produz a doença de evolução comparável à EM remittente recorrente (EMRR), exceto pela ausência de evolução à fase secundária progressiva (SP), comum nos pacientes com EMRR (CROXFORD; KURSCHUS; WAISMAN, 2010; MIX et al., 2010; FONTES, 2013).

O modelo mais utilizado atualmente para indução de EAE é o de imunização de camundongos geneticamente suscetíveis a doença, da linhagem C57BL/6 pelo peptídeo MOG<sub>35-55</sub>. As lesões desencadeadas demonstram, a nível histológico, lesões inflamatórias desmielinizantes em cérebro, medula espinhal e nervo óptico, sendo o sistema nervoso periférico poupado (padrão semelhante ao encontrado na EM remittente recorrente – EMRR) (CROXFORD; KURSCHUS; WAISMAN, 2010; MIX et al., 2010; FONTES, 2013; FONTES et al., 2017).

Camundongos C57BL/6 são geneticamente modificados e, quando expostos a antígenos da mielina, expressam maior número de receptores de Células T (TCR) para MOG e um maior título de anticorpos anti-MOG, o que resulta em uma forma mais grave da EAE, com animais apresentando paralisia ascendente. Os infiltrados inflamatórios são perivasculares constituídos principalmente por macrófagos, linfócitos T e B. (CROXFORD; KURSCHUS; WAISMAN, 2010; MIX et al., 2010; FONTES, 2013).

**Quadro 1:** Modelos de EAE ativamente utilizados e suas aplicações

ESPÉCIE/ LINHAGEM	PEPTÍDEOS INDUTORES DA EAE	ESTUDOS E APLICAÇÕES
C57BL/6	MOG35–55; OSP179–207; rNo-go-66	Patogênese mediada por células CD4+ Th1/Th17; validação pré-clínica de compostos terapêuticos; sistema nervoso periférico poupado.
SJL/J	MOG92–106; PLP139–151; PLP178–191; PLP104–117; OSP57–72; MOBP37–60; MOBP15–36; MBP; MBP89–101; Nogo-66	Estudo dos mecanismos do surto; controle genético de doença autoimune; desmielinização mediada por anticorpo; validação pré-clínica de compostos terapêuticos.
B10.PL e PL/J	MBP Ac1–11; MOG35–55	Estudo de Treg; mimetismo molecular e influências ambientais; mecanismos de tolerância; validação pré-clínica de compostos terapêuticos.
Ratos Lewis	MBP; MBP29–84; MBP61–82; MBP80–105; MBP170–186; $\beta$ -Synuclein93–111	Estudo de comportamento migratório de células T autoimunes; ausência de mielinização; validação pré-clínica de compostos terapêuticos.
Ratos DA, BN	MOG	Desmielinização mediada por anticorpos; mimetismo molecular; controle genético da autoimunidade.
Macaco Rhesus ( <i>Macaca mulatta</i> )	MBP; MOG34–56	Patologia axonal; infiltrados perivascularares; desmielinização no cérebro e medula espinhal; desmielinização mediada por anticorpos; validação pré-clínica de compostos terapêuticos.
Sagüi comum ( <i>Callithrix jacchus</i> )	MOG; MOG14–36	Similar ao macaco Rhesus.

Fonte: FONTES, 2013.

## 2.4 TRATAMENTOS PARA A ESCLEROSE MÚLTIPLA

Os corticosteroides marcaram o início da terapia medicamentosa para pacientes com EM. Administrados principalmente durante os surtos, por um período

de três a cinco dias, com posterior uso em menores concentrações, por até duas semanas. Há expressiva diminuição do infiltrado celular inflamatório no SNC a curto prazo, porém, como limitação importante, sem impacto significativo a longo prazo. Uma série de efeitos secundários indesejáveis também são apresentados pelos pacientes como elevação de pressão arterial, osteoporose, Síndrome de Cushing, erupção cutânea pustular, úlceras, risco de sangramento gástrico, entre outros (MOREIRA et al., 2002; FLETCHER et al., 2010; MIX et al., 2010; BISAGA et al., 2012).

As limitações dos corticosteroides anteriormente mencionadas levaram à necessidade de pesquisas para que novas terapias fossem desenvolvidas. Vários medicamentos foram lançados nos últimos anos levando a um controle parcial da doença (MOREIRA et al., 2002; FLETCHER et al., 2010; MIX et al., 2010; DEVONSHIRE et al., 2011; BISAGA et al., 2012).

Os tratamentos disponíveis consistem em interferon  $\beta$ -1 $\alpha$  (*Avonex*® e *Rebif*®) e do interferon  $\beta$ -1 $\beta$  (*Betaseron*® nome comercial nos EUA, *Betaferon*® na Europa e Japão). Os mecanismos de ação pelos quais os Interferons- $\beta$  exercem seus efeitos terapêuticos na EM ainda não estão totalmente compreendidos. Além de possuir propriedades antivirais, estes fármacos apresentam uma complexa atividade imunomoduladora, diminuindo as concentrações de citocinas inflamatórias como IL-12 e aumentando as citocinas anti-inflamatórias como a IL-10. A porcentagem de pacientes não responsivos para tratamento com interferon é cerca de 30% (MOREIRA et al., 2002; FLETCHER et al., 2010; MIX et al., 2010; BISAGA et al., 2012).

O acetato de glatiramer (*Copaxone*®), com utilização diária, é constituído por uma mistura de polipeptídeos sintéticos compostos por quatro aminoácidos (alanina, glutamina, lisina e tirosina). É estruturalmente semelhante à PBM, porém não causa encefalite. Os mecanismos propostos para a atividade biológica deste medicamento são a indução de células T supressoras antígeno-específicas e a inibição competitiva de resposta imune para antígenos da PBM (MOREIRA et al., 2002; FLETCHER et al., 2010; MIX et al., 2010; BISAGA et al., 2012).

Na EMSP, mais agressiva, que muitas vezes não responde aos medicamentos considerados “tradicionais”, a tendência é mudar o esquema terapêutico para o Natalizumab (*Tysabri*®) (MOREIRA et al., 2002; FLETCHER et al., 2010; MIX et al., 2010; BISAGA et al., 2012; BAR-OR et al., 2014).

Natalizumab é um anticorpo monoclonal que bloqueia integrinas  $\alpha$ -4 (glicoproteína expressa em linfócitos e monócitos), essenciais para o processo de migração através da BHE. Com isso, há o bloqueio da migração de células inflamatórias, principalmente linfócitos, para dentro do SNC (MOREIRA et al., 2002; FLETCHER et al., 2010; MIX et al., 2010; BISAGA et al., 2012; BAR-OR et al., 2014).

A mitoxantrona (Mitostate<sup>®</sup>) é um imunossupressor de mecanismo de ação não completamente elucidado. É um agente DNA-reativo, ligando-se ao DNA e produzindo quebra das fitas, inibindo a síntese tanto do DNA quanto do RNA (MORRIS; YÄNNIKAS, 2012).

O fingolimod (Gilenya<sup>®</sup>) é um modulador do receptor esfingosina-1-fosfato, sendo seu protótipo um produto natural com atividade imunossupressora. Foi obtido através de modificação molecular de um composto isolado a partir de cultura caldos de *Isaria sinclairii*, um fungo que ataca os insetos. É a primeira droga imunomoduladora oral para o tratamento de EM (PINSCHER; BRINKMANN; MERKLER, 2011; CHIBA; ADACHI, 2012; CHIARINI et al., 2015).

As comparações entre os imunomoduladores demonstram que o mais eficaz é o natalizumab em termos de redução da taxa de recaída. Os dados preliminares apontam para um efeito na progressão da doença, mas estudos de longo prazo são necessários (BISAGA et al., 2012).

Mitoxantrona é provavelmente o mais eficaz de todos eles a curto prazo. Sua cardiotoxicidade não permite sua utilização a longo prazo (BISAGA et al., 2012; MORRIS; YÄNNIKAS, 2012; DOOSTI et al., 2018).

Mesmo com o uso adequado desses medicamentos citados, nem todos os pacientes são responsivos a estas terapias. Ademais, efeitos adversos também são citados como fatores que limitam a utilização desses fármacos (BISAGA et al., 2012; MORRIS; YÄNNIKAS, 2012; WILLIAMS; COLES; AZZOPARDI, 2013; DOOSTI et al., 2018).

Abaixo estão demonstrados, segundo o protocolo clínico de diretrizes terapêuticas para Esclerose Múltipla do Ministério da Saúde do Brasil (2015), os mais importantes efeitos adversos dos principais fármacos disponíveis para tratamento de EM (Quadro 2) (MOREIRA et al., 2002; FLETCHER et al., 2010; MIX et al., 2010; BISAGA et al., 2012):

**Quadro 2:** Efeitos adversos dos principais medicamentos para tratamento de EM

MEDICAMENTO	EFEITOS ADVERSOS
Interferon $\beta$ -1 $\alpha$	Desmaios, sangramentos, mudança de humor, febre, calafrios, dores musculares, náuseas, diarreia, dor de cabeça, dor ou desconforto no local de aplicação da injeção;
Interferon $\beta$ -1 $\beta$	Depressão, ansiedade, confusão, mudanças no ciclo menstrual, diarreia, prisão de ventre, vômitos, dor de estômago, tonturas, nervosismo, arritmias cardíacas, febre, calafrios, dores musculares, dor de cabeça, cansaço e fraqueza. No local de aplicação da injeção pode ocorrer dor, coceira e vermelhidão;
Acetato de glatiramer	Alguns minutos após aplicação do medicamento podem ocorrer aperto no peito ou garganta, sensação de calor, ansiedade, taquicardia e taquipneia. No local de aplicação da injeção pode ocorrer dor, coceira e vermelhidão;
Natalizumad	Infecções das vias urinárias, naso-faringite, urticária, reações de hipersensibilidade, cefaleia, tonturas, leuco-encefalopatia multifocal progressiva (LMP), vômitos e náuseas;
Fingolimod	Infecções trato respiratório alto, bradicardia e hipertensão, susceptibilidade à infecção por Influenza, elevação da incidência de cânceres de pele. Usando concomitantemente com corticosteroides pode levar a encefalite por HSV;
Mltoxantrona	Arritmias cardíacas, taquicardias, insuficiência cardíaca congestiva, hipotensão, conjuntivite, convulsões, cor amarelada na pele ou nos olhos, cefaleia, febre, aplasias medulares, infecções, alopecia, diarreia, dor abdominal, inflamação na boca, náuseas, vômitos, dificuldade para respirar, dor no tórax, sangramento gastrointestinal, tosse, equimoses, erupções e necrose da pele (se houver extravazamento do líquido da injeção), urticárias, flebite no local da injeção e insuficiência renal.

Além do fato das terapias imunomodulatórias apresentarem vários efeitos adversos os custos são muito elevados. Em recente estudo multicêntrico, ao analisar pacientes atendidos em clínicas das regiões Sul e Sudeste do Brasil, foi determinada uma estimativa de custo por paciente por ano para EM da ordem de US\$ 19.000 (DA SILVA et al., 2016).

## 2.5 O USO DE PRODUTOS NATURAIS COMO FONTES PARA NOVOS FÁRMACOS

A utilização de plantas com fins medicinais para o tratamento, cura e prevenção de doenças é uma das formas mais antigas de prática medicinal na humanidade. A maioria dos fármacos em uso clínico ou são de origem natural ou foram desenvolvidos por síntese química planejada a partir de produtos naturais (PUPO; GALLO, 2007; BARREIRO, 2009; COSTA, 2009).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 30-50% das drogas utilizadas como fármacos na China são de origem vegetal. Na Europa e América do Norte 50% da população já fez uso de fitoterápicos. Na Alemanha destaca-se um índice de 90% de uso de formas farmacêuticas contendo algum componente de origem vegetal. Sendo assim, o uso da fitoterapia está em processo de crescimento e movimenta bilhões de dólares no mundo. As estimativas nacionais apontam que 82% da população brasileira utiliza produtos à base de ervas. Com isso a OMS tem incentivado a utilização de plantas medicinais, mediante a Resolução WHA 31.33 (1978) e 40.33 (1987) (PUPO; GALLO, 2007).

No Brasil, o crescente interesse por medicamentos oriundos de plantas medicinais, mais especificamente os fitoterápicos, veio principalmente após, as resoluções RDC n° 17 de 24/02/2000 e RDC n° 48 de 16/03/2004, registrando-se as espécies mais popularmente conhecidas e utilizadas. Entre os medicamentos disponíveis na terapêutica atual estima-se que 40% foram desenvolvidos a partir de fontes naturais: 25% de plantas, 13% de microrganismos e 3% de animais. Com isso, o reconhecimento das propriedades biológicas de vários produtos naturais, vem alimentado a busca intensa por novos fármacos (PUPO; GALLO, 2007; COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009).

### 2.5.1 Produtos Naturais anti-inflamatórios

As plantas que apresentam potencial para utilização em processos infecciosos, no controle de febre, edema, doenças reumáticas ou atividade

cicatrizante possuem provavelmente capacidade anti-inflamatória, que deve ser corroborada a nível experimental (CARVALHO, 2004; DE CARVALHO et al., 2017).

A evolução no entendimento dos processos inflamatórios, bem como o desenvolvimento de técnicas *in vitro* (cultura de células e dosagem de mediadores inflamatórios; inibição de enzimas) como *in vivo* (indução de inflamação por agentes flogísticos ou irritantes em modelos animais variados) permitem que compostos com potencial anti-inflamatório tenham seus mecanismos de ação compreendidos dentro da fisiopatologia inflamatória (NABAS et al., 2009).

Diversos produtos naturais de origem vegetal, que são utilizadas na medicina tradicional, demonstraram potencial anti-inflamatório *in vivo*, tais como o óleo-resina de *Copaifera duckei* (copaíba), óleos das sementes de *Helianthus annuus* (girassol) e extrato obtido das folhas de *Memecylon edule*, entre várias outras (CARVALHO, 2004; NUALKAEW et al., 2009; COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009).

O fitoterápico Acheflan<sup>®</sup> (tratamento local de processos inflamatórios) é constituído de produto natural de origem 100% nacional, resultante de uma parceria entre universidades (Universidade Federal de Santa Catarina e Unicamp) e a Aché (Laboratório Farmacêutico), sendo encontrado nas formas de aerosol e de creme. O medicamento contém óleo essencial de erva-baleeira (*Cordia verbenacea*, *Borraginaceae*), cuja formulação contém sesquiterpenos. Seu uso é indicado para tendinites e dores musculares (FERNANDES et al., 2007; (COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009).

Os efeitos anti-inflamatórios dos sesquiterpenos são conhecidos, como por exemplo, o  $\alpha$ -humuleno, que leva a um aumento significativo na liberação de mediadores anti-inflamatórios em modelos de inflamação alérgica das vias aéreas de camundongos (ROGÉRIO et al., 2009).

#### 2.5.1.1 O óleo de Copaíba e o $\beta$ -cariofileno (BCP)

As copaibeiras são árvores comuns à América Latina e África Ocidental, sendo encontradas, no Brasil, nas regiões Sudeste, Centro-Oeste e Amazônica. Da árvore da copaíba é extraído um óleo/resina, de cor que varia de amarelo ouro a marrom, dependendo da espécie (Figura 22). Essa substância tem sido utilizada

desde a época da chegada dos portugueses ao Brasil na medicina tradicional popular e silvícola para diversas finalidades, e hoje se encontra como um dos mais importantes produtos naturais amazônicos comercializados, sendo também exportado para Estados Unidos, França, Alemanha e Inglaterra (PIERI; MUSSI; MOREIRA, 2009). Das 72 espécies conhecidas existem mais de 20 no país, sendo as principais *Copaifera officinalis* L., *Copaifera reticulata* Ducke, *C. Verbenaceae*, *Copaifera multijuga* Hayne (PIERI; MUSSI; MOREIRA, 2009; YAMAGUICHI; GARCIA, 2012).

A aplicação medicinal do óleo de copaíba é extensa, sendo inclusive utilizado pelas indústrias, por apresentar indicações, já comprovadas cientificamente, como ação diurética, laxante, antitetânico, antisséptico do aparelho urinário, cicatrizante, anti-inflamatória e antitumoral. Contudo, a atividade anti-inflamatória é, sem dúvida, a mais difundida na medicina popular e tem sido amplamente investigada no meio científico, sendo inclusive tradicionalmente utilizado no Brasil, principalmente na região amazônica, como anti-inflamatório (VEIGA JR et al., 2007; GUIMARÃES-SANTOS et al., 2012; YAMAGUICHI; GARCIA, 2012).

**Figura 22:** Figura ilustrando a espécie *Copaifera langsdorffii*

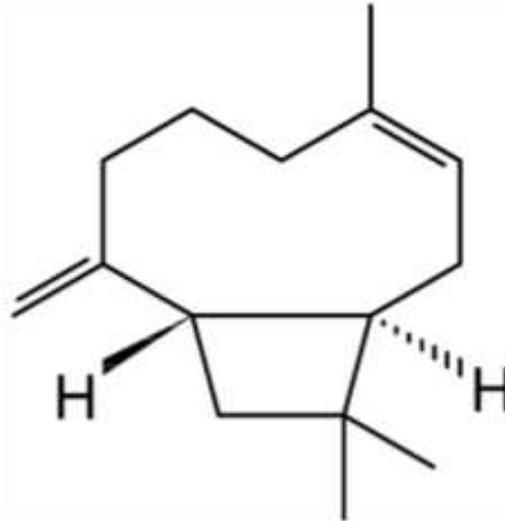


**Fonte:** PIERI; MUSSI; MOREIRA, 2009.

Quimicamente, o óleo-resina de copaíba é basicamente constituído por diterpenos e sesquiterpenos (Figura 23). Entre os sesquiterpenos, descata-se o BCP

(FERNANDES et al., 2007; VEIGA JR et al., 2007; YAMAGUICHI; GARCIA, 2012; GELMINI et al., 2013; GALÚCIO et al., 2016).

**Figura 23:** Estrutura do  $\beta$  – cariofileno (Trans-cariofileno)



**Fonte:** FONTES et al., 2017.

De acordo com Medeiros et al. (2007), BCP inibe a migração de neutrófilos induzida por LPS no edema de pata em ratos. Outros experimentos realizados demonstraram que BCP é capaz de reduzir a dor aguda e crônica em ratos, atenua disfunção inflamatória hepática desencadeada por álcool e que em colite induzida por dextran (modelo clássico de inflamação), BCP reduziu o infiltrado inflamatório no cólon, diminuindo os níveis de mieloperoxidase e de IL-6, acarretando com isso, uma melhora significativa no quadro da doença (CHO et al., 2007; PAULA-FREIRE et al., 2014; VARGA et al., 2018).

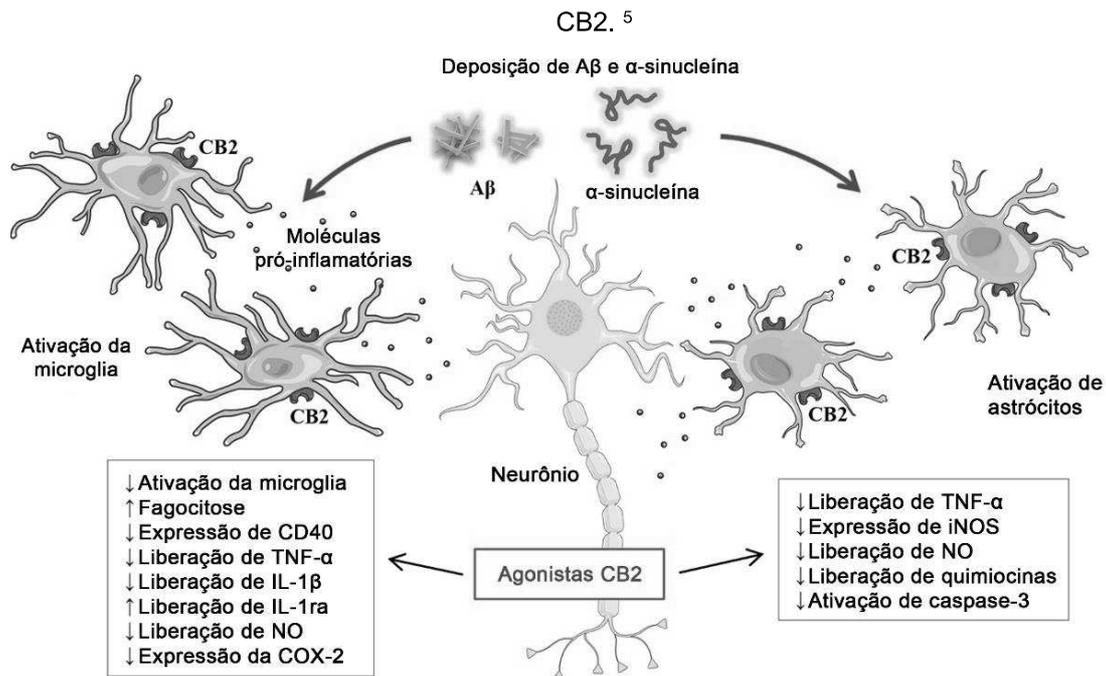
Em relação ao desenvolvimento de aterosclerose, BCP apresentou capacidade de inibir o processo por redução da expressão de moléculas endoteliais de adesão (VCAM-1) (ZHANG et al., 2017).

Os efeitos do BCP (administração por gavagem) em EAE foram recentemente investigados em ratos C57BL/6. Os animais foram avaliados de acordo com sua evolução clínica, produção de citocinas e produção de radicais livres de oxigênio. Substâncias pro-inflamatórias normalmente produzidas em EAE como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NO, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  foram inibidas *in vitro* por BCP em cultura de células originadas de ratos com EAE e houve redução do escore clínico e severidade da doença *in vivo*. Em relação aos aspectos histopatológicos e histomorfométricos, as análises confirmaram

redução significativa de infiltrado inflamatório, com diminuição de danos neurológicos no SNC desses animais (FONTES et al., 2017).

Os mecanismos propostos para os efeitos antioxidativos e anti-inflamatórios de BCP surgiram do fato de que esta substância apresenta agonismo seletivo para o receptor canabinoide tipo 2 (CB2R). Foi realmente demonstrado que BCP inibe significativamente a geração de espécies reativas de oxigênio nas mitocôndrias estimulada por hipóxia, assim como inibe a ativação de fator transcricional NF- $\kappa$ B na microglia (Figura 24). É importante salientar que esses efeitos inibitórios de BCP em relação à NF- $\kappa$ B podem ser abolidos por mutações no receptor CB2R por RNA de interferência (GERTSCH, 2008; GUO et al., 2014, AL MANSOURI et al., 2014; BAHI et al., 2014; DIAS et al., 2014; TEIXEIRA et al., 2017).

**Figura 24:** Representação esquemática das ações neuroprotetoras e anti-inflamatórias dos agonistas



Fonte: CASSANO et al., 2017.

<sup>5</sup> Representação esquemática das ações anti-inflamatórias e neuroprotetoras dos agonistas do CB2 em Doença de Alzheimer (DA) e Doença de Parkinson (DP). A DA e DP são caracterizadas, respectivamente, pela deposição de proteínas A $\beta$  e  $\alpha$ -sinucleína que, por sua vez, estão direta ou indiretamente envolvidas na ativação microglial e astrocitária. Essa ativação da microglia e dos astrócitos desencadeia uma resposta neuroinflamatória e imunológica que contribui para a progressão da DA e da DP. A ativação farmacológica dos receptores canabinóides CB2 microgliais e astrocitários com agonistas CB2 é uma abordagem terapêutica promissora, pois promove efeitos anti-inflamatórios e neuroprotetores, como a suspensão da liberação de citocinas pró-inflamatórias e o aumento de moléculas anti-inflamatórias.

Pelo exposto anteriormente, levando-se em consideração os mecanismos imunológicos da EAE, e considerando que o BCP exerce efeito inibitório sobre o IFN- $\gamma$ , NF-kappa  $\beta$  e TNF- $\alpha$ , torna-se relevante estudar os possíveis efeitos anti-inflamatórios do BCP no curso clínico e na modulação da resposta inflamatória da EAE induzida em camundongos C57BL/6 como modelo de estudo para a EM.

### 3 HIPÓTESE

A atividade anti-inflamatória e neuroprotetora do  $\beta$ -cariofileno diminui a expressão tecidual da citocina IL-17 e do fator de transcrição t-bet em animais com EAE, com elevação na expressão do fator transcricional GATA-3 e estímulo para remielinização no SNC de camundongos C57BL/6.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do BCP sobre a produção “*in situ*” de mediadores inflamatórios, fatores de transcrição e remielinização em tecido de SNC no modelo de estudo animal para a Esclerose Múltipla - Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE) em camundongos C57BL/6.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- A) Verificar a produção “*in situ*” dos mediadores inflamatórios IL-17 e fatores de transcrição T-bet e GATA-3 em cortes histológicos de SNC de camundongos C57BL/6 com EAE.
- B) Investigar o efeito do BCP sobre o processo de desmielinização em cortes histológicos de SNC de camundongos C57BL/6 com EAE.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

Os cortes histológicos com material de SNC foram obtidos de experimento anterior do nosso grupo, autorizado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal de Juiz de Fora – MG (Protocolo N° 039/2010) (FONTES et al., 2017).

Foram três grupos de camundongos da linhagem C57BL/6 fêmeas, com 8-12 semanas, provenientes do Biotério do Centro de Biologia da Reprodução (CBR) da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF).

Ao todo foram utilizados 15 animais, divididos em três grupos e eutanasiados no 19° dia pós-indução da EAE (pico da doença no camundongo C57BL/6):

**Grupo I (controle positivo):** camundongos C57BL/6 com a indução da EAE (n=05);

**Grupo II:** camundongos C57BL/6 com indução da EAE e tratados com BCP por gavagem com posologia de 25mg/kg/dia logo após início dos sinais (n=05);

**Grupo III:** camundongos C57BL/6 com indução da EAE e tratados com BCP por gavagem com posologia de 50mg/kg/dia após início dos sinais (n=05).

### 5.2 PROCEDIMENTOS DE INDUÇÃO

Para a indução de EAE os animais foram imunizados por via subcutânea (s.c.) em ambos os lados da base da cauda, com 100µl de emulsão antigênica contendo: 100µg do peptídeo MOG<sub>35-55</sub> (Sigma Chemical Co., Saint Louis, EUA) e adjuvante completo de Freund (Sigma) suplementado com 400µg de *Mycobacterium tuberculosis* (H37RA; Difco Laboratories, Detroit, EUA). No dia da imunização e após 48 horas, foram injetados intraperitonealmente (i.p.) 300ng de toxina pertussis

(Sigma). Os animais foram observados diariamente quanto ao aparecimento dos sinais clínicos (Quadro 3) sendo eutanasiados no 19º dia após a inoculação.

Após a indução da EAE, o BCP (adquirido comercialmente da Sigma-Aldrich; St. Louis, MO) foi suspenso em PBS e administrado por gavagem em 200µl nas dosagens de 25 e 50mg/Kg por dia, utilizando agulha de 20mm de gavagem. Ambas foram administradas a partir do início dos sintomas até expressão clínica máxima da doença de forma ininterrupta como mostrado nos grupos acima (FERNANDES et al., 2007).

Depois da inoculação os animais foram observados diariamente para avaliação do escore clínico durante duas horas. Os sinais clínicos foram registrados de acordo com Leadbetter et al. (1998), Mohamed et al. (2004), Peron et al. (2010) (Quadro 3):

**Quadro 3:** Escore clínico dos C57BL/6 com EAE

<b>ESCORE</b>	<b>SINAIS CLÍNICOS</b>
0	Sadio
1	Perda De Tônus Da Cauda
2	Paralisia Parcial Patas Traseiras
3	Paralisia Severa Patas Traseiras
4	Paralisia Severa Patas Traseiras E Paralisia Parcial Patas Da Frente
5	Paralisia Completa

### 5.3 COLETA E PREPARO DE MATERIAL PARA ANÁLISE HISTOLÓGICA

Cérebro, cerebelo e medula extraídos dos animais foram mantidos imersos em soluções fixadoras de formol tamponado a 10% (4g de fosfato de sódio monobásico, 6,5g de fosfato de sódio dibásico, 100ml de formol P.A e 900mL de água destilada). Após dissecação, os fragmentos foram desidratados em concentrações crescentes de etanol (70%, 90% e 100%) em banhos de 1 hora cada, sendo feitos 3 banhos em álcool absoluto. Posteriormente, foram clarificados em 3 banhos em xilol de 1 hora cada e, finalmente, feita a impregnação em parafina em estufa a 58°C e a inclusão na parafina a temperatura ambiente. Os cassetes histológicos contendo o material de SNC foram estocados (Figura 25) e, para preparação das lâminas para as

colorações histológicas e imunoistoquímica, os mesmos foram cortados em micrótono modelo "820" Spencer com espessura de 5 $\mu$ m (CORRÊA; VIEIRA; AARESTRUP, 2010).

**Figura 25:** Cassetes histológicos contendo partes do SNC parafinados, que foram utilizados nos experimentos.



Fonte: ARQUIVO PESSOAL DO AUTOR, 2018.

#### 5.4 DESPARAFINIZAÇÃO

Para que as técnicas de colorações teciduais e imunoistoquímicas fossem empregadas nos cortes histológicos dos componentes do SNC, foi realizado inicialmente o processo de desparafinização dos cortes segundo o Procedimento Operacional Padrão (POP) do CBR/UFJF:

- 1) Desparafinização em estufa 60 $^{\circ}$ C por 30 minutos;

- 2) Desparafinização em 3 banhos de xilol (xilol I; xilol II; xilol III) por 5 minutos em cada;
- 3) Hidratação em soluções de álcool etílico em sequência nas concentrações de 100%, 90%, 80%, 70% por 3 minutos em cada;
- 4) Lavagem em água corrente por 3 minutos;
- 5) Lavagem em água destilada por 1 minuto;
- 6) Montar em lâminas com entellan.

## 5.5 COLORAÇÕES HISTOLÓGICAS

### 5.5.1 Hematoxilina e Eosina (HE)

Estes corantes são utilizados na coloração de rotina para avaliação de tecidos em estado patológico ou não. Por meio desta técnica, podemos diferenciar partes basófilas (pela hematoxilina) e acidófilas, ou eosinófilas (pela eosina). A hematoxilina tem atração por substâncias ácidas (basófilas) dos tecidos, como os ácidos nucleicos. Já a eosina, sendo ácida, cora predominantemente o citoplasma, as fibras de colágeno e outras estruturas compostas por substâncias com caráter básico (acidófilas). Foi utilizada para avaliação do processo inflamatório no SNC e seus resultados foram publicados em trabalho anterior do grupo (FONTES et al., 2017).

Após desparafinização das lâminas, foi executado o seguinte procedimento:

- 1) Coloração durante 15 minutos pela Hematoxilina de Harris.
- 2) Esta é preparada com 5g de hematoxilina dissolvidos em 500mL de álcool absoluto e 100g de alúmen de amônio ou potássio em 1000mL de água destilada aquecida;
- 3) Retirar a última solução do fogo e misturar com a solução alcoólica de hematoxilina;
- 4) Após a fervura das soluções misturadas (agitando sempre com bastão de vidro), adicionou-se 2,5g de óxido de mercúrio lentamente;

- 5) Solução foi reaquecida até tornar-se púrpura escura, com posterior esfriamento rápido em banho de água fria;
- 6) Foram adicionados 2 a 4mL de ácido acético glacial por 100mL de solução para melhorar a coloração nuclear;
- 7) Solução foi filtrada antes do uso e guardada ao abrigo da luz;
- 8) Em um segundo momento foi feita coloração pela solução de eosina aquosa 1% durante 2 minutos e diferenciação em etanol a 70%;
- 9) Desidratadas e montadas em entellan.

### **5.5.2 Hematoxilina Férrica de Weigert – Pal – Russel**

Esta técnica é utilizada para visualização geral do tecido nervoso e, principalmente, da bainha de mielina. Nesta coloração, a bainha é corada em azul-negro, as células nervosas em variações de amarelo-palha a cinza, os nucléolos e os eritrócitos em negro e o fundo incolor. Após desparafinização das lâminas, foi executado o seguinte procedimento (BEHMER, 2003):

- 1) Desparafinização em 3 banhos de xilol por 5 minutos cada;
- 2) Reidratação dos cortes por mergulhos de minutos em soluções alcoólicas nas seguintes concentrações em sequência (100%; 90%; 80% e 70%);
- 3) Lavagem das lâminas em água corrente por 3 minutos e tratadas em solução aquosa de alúmen de ferro a 4% por 3 minutos;
- 4) Lavagem rápida após a etapa anterior para retirar excesso de alúmen;
- 5) Em seguida, foram coradas pela hematoxilina férrica de Weigert – Pal – Russel por 20 minutos. (Hematoxilina alcoólica a 10% em volume de 20mL, carbonato de lítio 1g em 80mL de água destilada);
- 6) Passagem imediata por 10 vezes em água corrente;
- 7) Desidratação em soluções alcoólicas nas seguintes concentrações em sequência (70%; 80%; 90% e 100%);
- 8) Diafanização em 3 banhos de xilol por 5 minutos cada;
- 9) Fazer a montagem lâmina/lamínula com entellan.

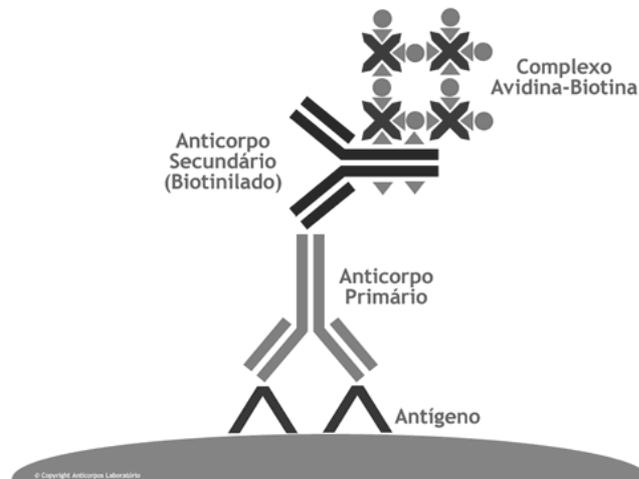
- 10) Foram selecionadas para captura digital 4 áreas representativas de cada corte em aumento de 400x e, após, foram submetidos á histomorfometria automática, pelo programa Zen2012, Zeiss. Foram obtidas as médias aritméticas de cada grupo e os resultados foram expressos em micrômetros quadrados.

## 5.6 IMUNOISTOQUÍMICA

Foram utilizados cortes com 5µm de espessura em lâminas silanizadas (3-aminopropyltriethoxysilane; Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA). Estes cortes foram desparafinizados como descrito no ítem 5.4.

- 1) O sistema peroxidase/anti/peroxidase avidina-biotina foi usado para coloração;
- 2) Cortes histológicos foram imersos em tampão citrato (1mM; pH=6.0) com posterior bloqueio de peroxidase endógena com 3% de peróxido de hidrogênio por 30 minutos;
- 3) Incubação com anticorpo primário (anticorpo policlonal de coelho anti-IL17, anti-T-bet e anti-GATA-3, diluído 1:100—Santa Cruz, CA) por 1 hora;
- 4) Em seguida, foram encubadas com anticorpo secundário biotinado por 30 minutos e com incubação posterior por mais 30 minutos para formação do complexo avidina-biotina (Figura 26);
- 5) Amostras foram coradas após adição do substrato cromogênico diaminobenzidina por 1 minuto.

**Figura 26:** Sequência de reações em imunistoquímica



**Fonte:** ANTICORPOS LABORATÓRIO, 2015.

- 6) Lâminas de controle negativo da reação foram preparadas à partir da omissão de incubação com o anticorpo primário;
- 7) As lâminas foram lavadas, desidratadas e montadas em entellan segundo procedimento operacional padrão (POP) do Centro de Biologia da Reprodução (CBR) da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF).
- 8) Os cortes foram analisados em microscópio óptico (400 vezes de aumento) e 10 fotografias foram selecionadas por seção e separadas por área de SNC (medula, cérebro e cerebelo) para contagem (Zeiss Axiostar, Zeiss, Germany).

## 5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para dados não paramétricos, foram usados os testes de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn. Para todos os testes foram considerados significativos os valores que apresentaram nível de significância  $p < 0,05$  (SOKAL; ROLF, 1994). Análises foram executadas em GraphPad Prism versão 5:00 para Windows (GraphPad instat Software, versão 3, São Diego, CA).

## **6 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados e discussão são apresentados na forma de artigo presente na cópia completa desta tese.

## 7 CONCLUSÃO

A presente pesquisa permitiu verificar o efeito imunomodulador do BCP sobre os aspectos inflamatórios da EAE em camundongos C57BL / 6 in situ.

Seu claro efeito na diminuição da expressão da citocina IL-17 e do fator de transcrição T-bet, a forte propriedade de remielinização observada, juntamente com o aumento da expressão do GATA-3 (cerebelo) demonstrada a nível tecidual, confirma o potencial terapêutico para o tratamento de doenças inflamatórias e desmielinizantes, tais como EAE, um modelo animal para MS.

## REFERÊNCIAS

AKKUS, Y; AKDEMIR, N. Improving the quality of life for multiple sclerosis patients using the nurse-based home visiting model. **Scand J Caring Sci.** v. 26, n. 2, p. 295-303, 2012.

AL MANSOURI, S. et al. The cannabinoid receptor 2 agonist,  $\beta$ -caryophyllene, reduced voluntary alcohol intake and attenuated ethanol-induced place preference and sensitivity in mice. **Pharmacol Biochem Behav.** v. 124, p. 260-268, 2014.

ANDERSSON, M. et al. Multiple MAG peptides are recognized by circulating T and B lymphocytes in polyneuropathy and multiple sclerosis. **Eur J Neurol.** v. 9, n. 3, p. 243-251, 2002.

ARANAMI, T.; YAMAMURA, T. Th17 cells and autoimmune encephalomyelitis (EAE/MS). **Allergol Int.** v. 57, n. 2, p. 115-120, 2008.

ASCHERIO, A.; MUNGER, K. L. Environmental risk factors for multiple sclerosis. part 1: the role of infection. **Ann Neurol.** v. 61, n. 4, p. 288-289, 2007.

ASCHERIO, A.; MUNGER, K. L.; SIMON C. Vitamin D and multiple sclerosis. **Lancet Neurol.** v. 9, n. 6, p. 599-612, 2010.

BAHI, A. et al.  $\beta$ -Caryophyllene, a CB2 receptor agonist produces multiple behavioral changes relevant to anxiety and depression in mice. **Physiol Behav.** v. 135, p. 119-124, 2014.

BALABANOV, R. et al. Suppressor of cytokine signaling 1 expression protects oligodendrocytes from the deleterious effects of interferon- $\gamma$ . **J Neurosci.** v. 26, n. 19, p. 5143-5152, 2006.

BAR-OR, A. et al. Teriflunomide and its mechanism of action in multiple sclerosis. **Drugs.** v. 74, n. 6, p. 659-674, 2014.

BARREIRO, E. J. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Quim Nova.** v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.

BATTEN, M. et al. Interleukin 27 limits autoimmune encephalomyelitis by suppressing the development of interleukin 17-producing T cells. **Nat Immunol.** v. 7, n. 9, p. 929-936, 2006.

BEHMER, O. A. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica.** 2. ed. Barueri: Manole, 2003.

BENNETT, J. L. et al. Bone marrow-derived mast cells accumulate in the central nervous system during inflammation but are dispensable for experimental autoimmune encephalomyelitis pathogenesis. **J Immunol.** v. 182, n. 9, p. 5507-5514, 2009.

BIELEKOVA, B. et al. Expansion and functional relevance of high-avidity myelin-specific CD4<sup>+</sup> T cells in multiple sclerosis. **J Immunol.** v. 172, n. 6, p. 3893-3904, 2004.

BISAGA, G. N. et al. Treatment of exacerbations of multiple sclerosis without the use of corticosteroids: the role of metabolic and antioxidant therapy. **Neurosci Behav Physiol.** v. 42, n. 2, p. 123-127, 2012.

BITSCH, A. et al. Tumor necrosis factor  $\alpha$  mRNA expression. In early multiple sclerosis lesions: correlation with demyelinating activity and oligodendrocyte pathology. **Glia.** v. 29, n. 4, p. 366-375, 2000.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para esclerose múltipla.** Brasília: Ministério da Saúde, 2015.

BROWN, A.; MCFARLIN, D. E.; RAINE, C. S. Chronologic neuropathology of relapsing experimental allergic encephalomyelitis in the mouse. **Lab Invest.** v. 46, n. 2, p. 171-185, 1982.

BROWN, D. A.; SAWCHENKO, P. E. Time course and distribution of inflammatory and neurodegenerative events suggest structural bases for the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. **J Comp Neurol.** v. 502, n. 2, p. 236-260, 2007.

BRUNO, R. et al. Multiple sclerosis candidate autoantigens except myelin oligodendrocyte glycoprotein are transcribed in human thymus. **Eur J Immunol.** v. 32, n. 10, p. 2737-2747, 2002.

BRYNEDAL, B.; HILLERT, J. Entering a new phase of multiple sclerosis genetic epidemiology. **Future Neurology.** v. 6, n. 4, 2011.

CALABRESI, P. A. et al. Chemokine receptor expression. On MPB-reactive T cells: CXCR6 is a marker of IFN- $\gamma$  producing effector cells. **J Neuroimmunol.** v. 127, n. 1-2, p. 96-105, 2002.

CARLSON, T. The Th 17-ELR<sup>+</sup> CXC chemokine pathway is essential for the development of central nervous system autoimmune disease. **J Exp Med.** v. 205, p. 811-823, 2008.

CARVALHO, J. C. T. Constituintes de plantas com atividade antiinflamatória. In: **Fitoterápicos anti-inflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas.** São Paulo: Tecmedd, 2004.

CASSANO, T. et al. Cannabinoid receptor 2 signaling in neurodegenerative disorders: from pathogenesis to a promising therapeutic target. **Front Neurosci.** v. 11, p. 1-11, 2017.

CHARCOT, J. Histologie de la sclérose en plaque. **Gazette des Hôpitaux.** v. 41, p. 554-566, 1868.

CHASTAIN, E. M. et al. The role of antigen presenting cells in multiple sclerosis. **Biochim Biophys Acta.** v. 1812, n. 2, p. 265-274, 2011.

CHEMSPIDER. **Search and share chemistry.** Disponível em: <<http://www.chemspider.com>>. Acesso em: 31 out. 2018.

CHIARINI, M. et al. Newly produced T and B lymphocytes and T-cell receptor repertoire diversity are reduced in peripheral blood of fingolimod-treated multiple sclerosis patients. **Mult Scler.** v. 21, n. 6, p. 726-734, 2015.

CHIBA, K.; ADACHI, K. Sphingosine 1-Phosphate Receptor 1 as a Useful Target for Treatment of Multiple Sclerosis. **Pharmaceuticals.** v. 5, n. 5, p. 514-528, 2012.

CHO, J. Y. et al. Amelioration of dextran sulfate sodium-induced colitis in mice by oral administration of  $\beta$ -caryophyllene, a sesquiterpene. **Life Sci.** v. 80, n. 10, p. 932-939, 2007.

CHOU, Y. K. et al. CD4 T-cell epitopes of human  $\alpha\beta$ -crystallin. **J Neurosci Res.** v. 75, p. 516-523, 2004.

CHRISTY, A. L. Mast cell activation and neutrophil recruitment promotes early and robust inflammation in the meninges in EAE. **J Autoimmun.** v. 42, p. 50-61, 2013.

CONSTANZA, M. et al. Mast Cells in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis and Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. **Int J Mol Sci.** v. 13, p. 15107-15125, 2012.

CORRÊA, J. O. A.; VIEIRA, B. J.; AARESTRUP, F. M. Effect of thalidomide and pentoxifylline on experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). **Exp Neurol.** v. 226, n. 1, p. 15-23, 2010.

COSTA, P. R. R. Produtos naturais como ponto de partida para a descoberta de novas substâncias bioativas: candidatos a fármacos com ação antiofídica, anticâncer e antiparasitária. **Rev Virtual Quim.** v. 1, n. 1, p. 58-66, 2009.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonoides: potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Rev Virtual Quim.** v. 1, n. 3, p. 241-256, 2009.

CRAWLEY, A. M.; FAUCHER, S.; ANGEL, J. B. Soluble IL-7R alpha (sCD127) inhibits IL-7 activity and is increased in HIV infection. **J. Immunol.** v. 184, n. 9, p. 4679-4687, 2010.

CROXFORD, A. L.; KURSCHUS, F. C.; WAISMAN, A. Mouse models for multiple sclerosis: Historical facts and future implications. **Biochim Biophys Acta.** v. 1812, n. 2, p. 177-183, 2010.

DA SILVA N. L. et al. Cost analysis of multiple sclerosis in Brazil: a cross-sectional multicenter study. **BMC Health Serv Res.** v. 16, n. 102, p. 1-12, 2016.

DE CARVALHO, L. S. A. et al. Parthenolide Modulates Immune Response in Cells from C57BL/6 Mice Induced with Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. **Planta Med.** v. 83, n. 8, p. 693-700, 2017.

DE JAGER, P. L. et al. The role of the CD58 locus in multiple sclerosis. **Proc Natl Acad Sci USA**. v. 106, n. 13, p. 5264-5269, 2009.

DESHPANDE, P.; KING, I. L.; SEGAL, B. M. Cutting edge: CNS CD11c<sup>+</sup> cells from mice with encephalomyelitis polarize Th17 cells and support CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cell-mediated immunosuppression, suggesting dual roles in the disease process. **J Immunol**. v. 178, n. 11, p. 6695-6699, 2007.

DEVONSHIRE, V. et al. The Global Adherence Project (GAP): a multicenter observational study on adherence to disease-modifying therapies in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. **Eur J Neurol**. v. 18, n. 1, p. 69-77, 2011.

DIAS, D. S. et al. Copaiba Oil Suppresses Inflammatory Cytokines in Splenocytes of C57BL/6 Mice Induced with Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE). **Molecules**. v. 19, p. 12814-12826, 2014.

DIDONNA, A.; OKSENBERG, J. R. The genetics of multiple sclerosis. In: ZAGON, I. S.; MCLAUGHLIN, P. J. **Multiple sclerosis: perspectives in treatment and pathogenesis**. Brisbane (AU): Codon Publications, 2017. Chapter 1.

DIMITRIADOU, V.; PANG, X.; THEOHARIDES, T. C. Hydroxyzine inhibits experimental allergic encephalomyelitis (EAE) and associated brain mast cell activation. **Int J Immunopharm**. v. 22, n. 9, p. 673-684, 2000.

DITTMER, M. et al. Characterization of a murine mixed neuroglia model and cellular responses to regulatory T cell-derived factors. **Mol Brain**. v. 11, n. 1, p. 25, 2018.

DOMBROWSKI, Y. et al. Regulatory T cells promote myelin regeneration in the central nervous system. **Nat Neurosci**. v. 20, n. 5, p. 674-680, 2017.

DONG, H.; ZHANG, X.; QIAN, Y. Mast cells and neuroinflammation. **Med Sci Monit Basic Res**. v. 20, p. 200-206, 2014.

DOOSTI, R. et al. Evaluation of the risk of cervical cancer in patients with Multiple Sclerosis treated with cytotoxic agents: a cohort study. **Iran J Neurol**. v. 17, n. 2, p. 64-70, 2018.

DURELLI, L. et al. T-helper 17 cells expand in multiple sclerosis and are inhibited by interferon-beta. **Ann Neurol**. v. 65, n. 5, p. 499-509, 2009.

EBERS, G. C. Environmental factors and multiple sclerosis. **Lancet Neurol**. v. 7, n. 3, p. 268-277, 2008.

ELIEH-ALI-KOMI, D.; CAO, Y. Role of mast cells in the pathogenesis of multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. **Clinic Rev Allerg Immunol**. v. 52, n. 3, p. 436-445, 2017.

ELLIOTT, C. et al. Functional identification of pathogenic autoantibody responses in patients with multiple sclerosis. **Brain**. v. 35, n. 6, p. 1819-1833, 2012.

FERNANDES, E. S. et al. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. **Eur J Pharmacol.** v. 569, n. 3, p. 228-236, 2007.

FEYERABEND, T. B. et al. Cre-mediated cell ablation contests mast cell contribution in models of antibody and T cell mediated autoimmunity. **Immunity.** v. 35, n. 5, p. 832-844, 2011.

FILIPPI, M.; PREZIOSA, P.; ROCCA, M. A. Vitamin A: yet another player in multiple sclerosis pathogenesis? **Expert Rev Clin Immunol.** v. 9, n. 2, p. 113-115, 2013.

FLETCHER, J. M. et al. T cell in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. **Clin Exp Immunol.** v. 162, n. 1, p. 1-11, 2010.

FOGDELL-HAHN, A. et al. Multiple sclerosis: a modifying influence of HLZ class 1 genes in a HLA class 2 associated autoimmune disease. **Tissue antigens.** v. 55, n. 2, p. 140-148, 2000.

FONTES, L. B. A. **Avaliação dos efeitos da licochalcona-A e trans-cariofileno sobre a encefalomielite auto-imune experimental (EAE).** 2013. 127 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais.

FONTES, L. B. A. et al. Immunomodulatory effects of licochalcone A on experimental autoimmune encephalomyelitis. **J Pharm Pharmacol.** v. 66, n. 6, p. 886-894, 2014.

FONTES, L. B. A. et al.  $\beta$  - Caryophyllene ameliorates the development of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice. **Biomed Pharmacother.** v. 91, p. 257-264, 2017.

FORT, M. M. et al. IL-25 induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th2-associated pathologies in vivo. **Immunity.** v. 15, n. 6, p. 985-995, 2001.

FRANKLIN, R. J. et al. Neuroprotection and repair in multiple sclerosis. **Nat Rev Neurol.** v. 8, n. 11, p. 624-634, 2012

FURLAN, R. et al. TNFalpha in experimental diseases of the CNS. **Methods Mol Med.** v. 98, p. 171-190, 2004.

GALLI, S. J. et al. Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. **Nat Immunol.** v. 12, n. 11, p. 1035-1044, 2011.

GALÚCIO, C. S. et al. Recuperação de sesquiterpenos do óleo-resina de copaíba a partir da destilação molecular. **Quim Nova.** v. 39, n. 7, p. 795-800, 2016.

GELMINI, F. et al. GC-MS profiling of the phytochemical constituents of the óleo resin from *Copaifera langsdorffii* Desf. and a preliminary in vivo evaluation of its antipsoriatic effect. **Int J Pharm.** v. 440, n. 2, p. 170-178, 2013.

GENAIN, C. P. et al. Identification of autoantibodies associated with myelin damage in multiple sclerosis. **Nat Med.** v. 5, n. 2, p. 170-175, 1999.

GERTSCH, J. Anti-inflammatory cannabinoids in diet: Towards a better understanding of CB2 receptor action? **Commun Integr Biol.** v. 1, n. 1, p. 26-28, 2008.

GOVERMAN, J. Autoimmune T cell responses in the central nervous system. **Nat Rev Immunol.** v. 9, n. 6, p. 393-407, 2009.

GREGORY, G. D. et al. Mast cells are required for optimal autoreactive T cell responses in a murine modelo of multiple sclerosis. **Eur J Immunol.** v. 35, n. 12, p. 3478-3486, 2005.

GRIMBALDESTON, M. A. et al. Mast cell-deficient *W-sash* c-kit mutant *Kit W-sh/W-sh* mice as a model for investigating mast cell biology in vivo. **Am J Pathol.** v. 167, n. 3, p. 835-848, 2005.

GUIMARÃES-SANTOS, A. et. al. Copaiba oil-resin treatment is neuroprotective and reduces neutrophil recruitment and microglia activation after motor cortex Excitotoxic injury. **Evid Based Complement Alternat Med.** v. 2012, p. 1-9, 2012.

GUO, K. et al. Trans-caryophyllene suppresses hipóxia-induced neuroinflammatory responses by inhibiting NF- $\kappa$ B activation in microglia. **J Mol Neurosci.** v. 54, n. 1, p. 41-48, 2014.

GUTCHER, I. et al. Interleucin 18-independent engagement if interleukin 18 receptor-alpha is required for autoimmune inflammation. **Nat Immunol.** v. 7, n. 9, p. 946-953, 2006.

HAFLER, D. A. Multiple sclerosis. **J Clin Invest.** v. 113, n. 6, p. 788-94, 2004.

HAYASHI, S. et al. Exon skipping by mutation of an authentic splice site of c-kit gene in *W/W* mouse. **Nucleic Acids Res.** v. 19, n. 6, p. 1267-1271, 1991.

HELTBERG, A.; HOLM, N. Concordance in twins and reccurence in sibships in MS. **Lancet.** v. 1, p. 1068, 1982.

HEMMER, B. et al. Identification of high potency microbial and self ligands for a human autoreactive class II-restricted T cell clone. **J Exp Med.** v. 185, n. 9, p. 1651-1659, 1997.

HOLMOY, T.; VANDVIK, B.; VARTDAL, F. T cells from multiple sclerosis patients recognize immunoglobulin G from cerebrospinal fluid. **Mult Scler.** v. 9, n. 3, p. 228-234, 2003.

HOLZ, A. et al. Myelin-associated oligodendrocytic basic protein: identification of na encephalitogenic epitope and association with multiple sclerosis. **J Immunol.** v. 164, p. 1103-1109, 2000.

HUANG, W. X. et al. Cytokine analysis in multiple sclerosis by competitive RT-PCR: a decreased expression of IL-10 and an increased expression. Of TNF- $\alpha$  in chronic progression. **Mult Scler.** v. 5, n. 5, p. 342-348, 1999.

HUNT, 2015. **Microbiology and Immunology On-line**. Illinois: University of South Carolina School of Medicine, 2015. Disponível em: <<http://www.microbiologybook.org/>>. Acesso em: 31 out. 2018.

HUYNH, W. et al. Post-vaccination encephalomyelitis: literature review and illustrative case. **J Clin Neurosci**. v. 15, n. 12, p. 1315-1322, 2008.

ILLES, Z. et al. Copolymer effects on microglia and T cells in the central nervous system of humanized mice. **Eur J Immunol**. v. 35, n. 12, p. 3683-3693, 2005.

ILLES, Z. et al. Differential expression of NKT cell V $\alpha$ 24j $\alpha$ Q invariant TCR chain in the lesions of multiple sclerosis na chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. **J Immunol**. v. 164, n. 8, p. 4375-4381, 2000.

IVANOV, I. I.; MCKENZIE, B. S.; ZHOU, L. The orphan nuclear receptor ROR $\gamma$  directs the differentiation program of proinflammatory IL – 17+ T helper cells. **Cell**. v. 126, n. 6, p. 1121-1133, 2006.

JADIDI-NIARAGH, F.; MIRSHAFIEY, A. Th17 cell, the new player of neuroinflammatory process in multiple sclerosis. **Scand J Immunol**. v. 74, n. 1, p. 1-13, 2011.

JERSILD, C. et al. Histocompatibility determinants in multiple sclerosis, with special reference to clinical course. **Lancet**. v. 2, n. 7840, p. 1221-1225, 1973.

JERSILD, C.; FOG, T. Histocompatibility (HL-A) antigens associated with multiple sclerosis. **Acta Neurol Scand**. v. 51, p. 377, 1972.

JOHNS, T. G.; BERNARD, C. C. Binding of complement component C1q to myelin oligodendrocyte glycoprotein: a novel mechanism for regulating CNS inflammation. **Mol Immunol**. v. 34, n. 1, p. 33-38, 1997.

KAKALACHEVA, K.; LUNEMANN, J.D. Environmental triggers of multiple sclerosis. **FEBS Lett**. v. 585, n. 23, p. 3724-3729, 2011.

KAMBAYASHI, T. et al. Inducible MHC class II expression by mast cells supports effector and regulatory T cell activation. **J Immunol**. v. 182, n. 8, p. 4686-4695, 2009.

KASTRUKOFF, L. F. et al. A role for natural killer cells in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. **J Neuroimmunol**. v. 86, n. 2, p. 123-133, 1998.

KAWAKAMI, N. et al. The Activation Status of Neuroantigen-specific T Cells in the Target Organ Determines the Clinical Outcome of Autoimmune Encephalomyelitis. **J Exp Med**. v. 199, n. 2, p. 185-197, 2004.

KAWAKAMI, T. A crucial door to the mast cell mystery knocked in. **J Immunol**. v. 183, n. 11, p. 6861-6862, 2009.

KAYE, J. F. et al. The central nervous system-specific myelin oligodendrocytic basic protein (MOBP) is encephalitogenic and a potential target antigen in multiple sclerosis (MS). **J Neuroimmunol**. v. 102, n. 2, p. 189-198, 2000.

KLAUKE, A. L. et al. The cannabinoid CB<sub>2</sub> receptor-selective phytocannabinoid beta-caryophyllene exerts analgesic effects in mouse models of inflammatory and neuropathic pain. **Eur Neuropsychopharmacol.** v. 24, n. 4, p. 608-620, 2014.

KLEINSCHEK, M. A. et al. IL-25 regulates Th17 function in autoimmune inflammation. **J Exp Med.** v. 204, n. 1, p. 161-170, 2007.

KOMIYAMA, Y. et al. IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. **J. Immunol.** v. 177, n. 1, p. 566-573, 2006.

KROENKE, M. A. et al. IL – 12 and IL – 23 modulated T cells induce distinct types of EAE based on histology, CNS chemokine profile, and response to cytokine inhibition. **J Exp Med.** v. 205, n. 7, p. 1535-1541, 2008.

LEADBETTER, E. A. et al. Experimental autoimmune encephalomyelitis induced with a combination of myelin basic protein and myelin oligodendrocyte glycoprotein is ameliorated by administration of a single myelin basic protein peptide. **J Immunol.** v. 161, n. 1, p. 504-512, 1998.

LEE, S. C. et al. Enhanced expression of constitutive and inducible forms of nitric oxide synthase in autoimmune encephalomyelitis 17 Induction of nitric oxide synthase activity in human astrocytes by interleukin-1beta and interferon-gamma. **J Neuroimmunol.** v. 46, n. 1-2, p. 19-24, 1993.

LEES, J. R. et al. Regional CNS responses to IFN-gamma determine lesion localization patterns during EAE pathogenesis. **J Exp Med.** v. 205, n. 11, p. 2633-2642, 2008.

LI, H. et al. Kit (W-sh) mice develop earlier and more severe experimental autoimmune encephalomyelitis due to absence of immune suppression. **J Immunol.** v. 187, n. 1, p. 274-282, 2011.

LINK, J. et al. Increased transforming growth factor-beta, interleukin-4, and interferon-gamma in multiple sclerosis. **Ann Neurol.** v. 36, n. 3, p. 379-386, 1994.

LUNEMANN, J. D.; MUNZ, C. Autophagy in CD4+ T-cell immunity and tolerance. **Cell Death Differ.** v. 16, n. 1, p. 79-86, 2009.

MACHADO, S. et al. **Recomendações esclerose múltipla.** São Paulo: Omnifarma, 2012.

MACIEL, D. R. K. **Imunopatogenia da esclerose múltipla.** Grupo Brasileiro de Neuroimunologia, 2014. Disponível em: <<http://neuroimunologia.com.br/materias/imunopatogenia-da-esclerose-multipla/>>. Acesso em: 31 out. 2018.

MACKALL, C. L. et al. Harnessing the biology of IL-7 for therapeutic application. **Nat Rev Immunol.** v. 11, n. 5, p. 330-342, 2011.

MACKAY, R. P.; MYRIANTHOPOULOS, N. C. Multiple sclerosis in twins and their relatives. **Arch Neurol.** v. 15, n. 5, p. 449-462, 1966.

MAIER, L. M.; ANDERSON, D. E.; SEVERSON, C. A. Soluble IL-2RA levels in multiple sclerosis subjects and the effect of soluble IL-2RA on immune responses. **J Immunol.** v. 182, n. 3, p. 1541-1547, 2009.

MCGEACHY, M. J. et al. TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology. **Nat Immunol.** v. 8, n. 12, p. 1390-1397, 2007.

MEDEIROS, R. et al. Effect of two active compounds obtained from the essential oil of *Cordia verbenacea* on the acute inflammatory responses elicited by LPS in the rat paw. **Br J Pharmacol.** v. 151, n. 5, p. 618-627, 2007.

MENDEL, I. et al. A myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide induces typical chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in H-2b mice: fine specificity and T cell receptor V $\beta$  expression of encephalitogenic T cells. **Eur J Immunol.** v. 25, n. 7, p. 1951-1959, 1995.

MILLER, D. et al. Clinically isolated syndromes suggestive of multiple sclerosis, part I: natural history, pathogenesis, diagnosis, and prognosis. **Lancet Neurol.** v. 4, n. 5, p. 281-288, 2005.

MILLER, S. D. et al. Antigen presentation in the CNS by myeloid dendritic cells drives progression of relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. **Ann N Y Acad Sci.** v. 1103, p. 179-191, 2007.

MIX, E. et al. Animal models of multiple sclerosis - potentials and limitations. **Prog Neurobiol.** v. 92, n. 3, p. 386-404, 2010.

MOHAMED, A. et al. The use of digital technology to assess the severity of the Experimental Allergic Encephalomyelitis (EAE) spinal cord lesion. **Biomed Sci Instrum.** v. 40, p. 419-423, 2004.

MORA, J.; IWATA, M.; VON ANDRIAN, U. Vitamin effects on the immune system: vitamins A and D take centre stage. **Nat Rev Immunol.** v. 8, n. 9, p. 685-698, 2008.

MOREIRA, M. A. et al. Consenso expandido do bctrim para o tratamento de esclerose múltipla. As evidências para o uso de glicocorticoides e imunomoduladores. **Arq Neuro-Psiquiatr.** v. 60, n. 3, p. 875-880, 2002.

MORRIS, K.; YIANNIKAS, C. Treatment update in multiple sclerosis. **Curr Allergy Asthma Rep.** v. 12, n. 3, p. 246-254, 2012.

MUKAI, K. et al. Mast cells as sources of cytokines, chemokines, and growth factors. **Immunol Rev.** v. 282, n. 1, p. 121-150, 2018.

MUNGER, K. L. et al. Vitamin D intake and incidence of multiple sclerosis. **Neurology.** v. 62, n. 1, p. 60-65, 2004.

NABAS, F. et al. Antiedematous effect of oils containing the fatty acids Omega-3 and 6 in mice. **Rev Bras Med.** v. 66, n. 4, p. 92-96, 2009.

NISCHWITZ, S.; MÜLLER-MYHSOK, B.; WEBER, F. Risk conferring genes in multiple sclerosis. **FEBS Lett.** v. 585, n. 23, p. 3789-3797, 2011.

NOCKA, K. et al. Molecular bases of dominant negative and loss of function mutations at the murine c-kit/white spotting locus: W37, Wv, W41 and W. **EMBO J.** v. 9, n. 6, p. 1805-1813, 1990.

NUALKAEW, S. et al. Anti-inflammatory, analgesic and wound healing activities of the leaves of *Memecylon edule* Roxb. **J Ethnopharmacol.** v. 121, n. 2, p. 278-281, 2009.

NURIEVA, R. et al. Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. **Nature.** v. 448, n. 7152, p. 480-483, 2007.

OLIVEIRA, E. M. L.; SOUZA, N. A. Esclerose múltipla. **Rev Neurociências.** v. 6, n. 3, p. 114-118, 1998.

ONTANEDA, D. et al. Multiple Sclerosis: New Insights in Pathogenesis and Novel Therapeutics. **Annu Rev Med.** v. 63, p. 389-404, 2012.

PAPENFUSS, T. L. et al. Sex differences in experimental autoimmune encephalomyelitis in multiple murine strains. **J Neuroimmunol.** v. 150, n. 1-2, p. 59-69, 2004.

PASARE, C.; MEDZHITOV, R. Toll pathway-dependent blockade of TCD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. **Science.** v. 299, n. 5609, p. 1033-1036, 2003.

PAULA-FREIRE, L. I. et al. The oral administration of trans-caryophyllene attenuates acute and chronic pain in mice. **Phytomedicine.** v. 21, n. 3, p. 356-362, 2014.

PENDER, M. P. et al. Increased circulating T cell reactivity to GM3 and GQ1b gangliosides in primary progressive multiple sclerosis. **J Clin Neurosci.** v. 10, n. 1, p. 63-66, 2003.

PÉPIN, C. C. et al. Preliminary biological evaluations of new thalidomide analogues for multiple sclerosis application. **Bioorg Med Chem Lett.** v. 19, n. 3, p. 878-881, 2009.

PERON, J. P. et al. Oral tolerance reduces Th17 cells as well as the overall inflammation in the central nervous system of EAE mice. **J Neuroimmunol.** v. 227, n. 1-2, p. 10-17, 2010.

PICONESE, S. et al. Exacerbated experimental autoimmune encephalomyelitis in mast cell deficient Kit W-sh/W-sh mice. **Lab Invest.** v. 91, n. 4, p. 627-641, 2011.

PIERI, F. A.; MUSSI, M. C.; MOREIRA, M. A. S. Óleo de copaíba (*Copaifera* sp.): histórico, extração, aplicações industriais e propriedades medicinais. **Rev Bras Plantas Med.** v. 11, n. 4, p. 465-472, 2009.

PINSCHEWER, D. D.; BRINKMANN, V.; MERKLER, D. Impact of sphingosine 1-phosphate modulation on immune outcomes. **Neurology.** v. 76, n. 8, suppl 3, p. 15-19, 2011.

PUGLIATI, M. et al. The epidemiology of multiple sclerosis in Europe. **Eur J Neurol.** v. 13, n. 7, p. 700-722, 2006.

PUPO, M. T.; GALLO, M. B. C. Biologia química: uma estratégia moderna para a pesquisa em produtos naturais. **Quim Nova.** v. 30, n. 6, p. 1446-55, 2007.

RAMAGOPALAN, S. V.; MORRIS, A. P.; DYMENT, D. A. The inheritance of resistance alleles in multiple sclerosis. **PLoS Genet.** v. 3, n. 9, p. 1607-1613, 2007.

RAMAGOPALAN, S.; SADOVNICK, A. D. Epidemiology of multiple sclerosis. **Neurol Clin.** v. 29, n. 2, p. 207-217, 2011.

RANSOHOFF, R. M.; ENGELHARDT, B. The anatomical and cellular basis of immune surveillance in the central nervous system. **Nat Rev Immunol.** v. 12, n. 9, p. 623-635, 2012.

RANSOHOFF, R. M.; KIVISAKK, P.; KIDD, G. Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. **Nat Rev Immunol.** v. 3, n. 7, p. 569-581, 2003.

REBOLDI, A. et al. C-C chemokine receptor 6-regulated entry of TH-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE. **Nat Immunol.** v. 10, n. 5, p. 514-523, 2009.

RIVERS, T. M.; SPRUNT, D. H.; BERRY, G. P. Observations on attempts to produce acute disseminated encephalomyelitis in monkeys. **J Exp Med.** v. 58, n. 1, p. 39-53, 1933.

ROGÉRIO, A. P. et al. Preventive and therapeutic anti-inflammatory properties of the sesquiterpene alpha-humulene in experimental airways allergic inflammation. **Brit J Pharmacol.** v. 158, n. 4, p. 1074-1087, 2009.

ROSATI, G. The prevalence of multiple sclerosis in the world: an update. **Neurol Sci.** v. 22, n. 2, p. 117-139, 2001.

RUULS, S. R. et al. Aggravation of experimental autoimmune encephalomyelitis by administration of nitric oxide synthase inhibitors. **Clin Exp Immunol.** v. 103, n. 3, p. 467-474, 1996.

RYAN, J. J. et al. Mast cell regulation of the immune response. **WAO Journal.** v. 2, p. 224-232, 2009.

SAYED, B. A. et al. Meningeal mast cells affect early T cell Central nervous System infiltration and blood-brain barrier integrity through TNF: A role for neutrophil recruitment? **J Immunol.** v. 184, n. 12, p. 6891-6900, 2010.

SEAMONS, A.; PERCHELLET, A.; GOVERMAN, J. Immune tolerance to myelin proteins. **Immunol Res.** v. 28, n. 3, p. 201-221, 2003.

SECOR, V. H. et al. Mast cells are essential for early onset and severe disease in a murine model of multiple sclerosis. **J Exp Med.** v. 191, n. 5, p. 813-822, 2000.

SINTZEL, M. B.; RAMETTA, M.; REDER, A.T. Vitamin D and multiple sclerosis: a comprehensive review. **Neurol Ther.** v. 7, n. 1, p. 59-85, 2018.

SMESTAD, C.; BRYNEDAL, B.; JONASDOTTIR, G. The impact of HLA-A and DRB1 on age at onset, disease course and severity in Scandinavian multiple sclerosis patients. **Eur J Neurol.** v. 14, n. 8, p. 835-840, 2007.

SMITH, M. E.; SOMMER, M. A. Association between cell-mediated demyelination and astrocyte stimulation. **Progr Brain Res.** v. 94, p. 411-422, 1992.

SOKAL, R. R.; ROLF, F. J. **Biometry**: the principles and practice of statistics in biological research. 4. ed. New York W. H.: Freeman & Company, 1994.

SORENSEN, T. L. et al. Chemokines CXCL10 and CCL2: differential involvement in intrathecal inflammation in multiple sclerosis. **Eur J Neurol.** v. 8, n. 6, p. 665-672, 2001.

SOSPEDRA, M.; MARTIN, R. Immunology of multiple sclerosis. **Annu Rev Immunol.** v. 23, p. 683-747, 2005.

STANLEY, N. C.; JACKSON, F. L.; ORR, E. L. Attenuation of experimental autoimmune encephalomyelitis by Compound 48/80 in Lewis rats. **J Neuroimmunol.** v. 29, n. 1-3, p. 223-228, 1990.

STRUNK, T. et al. Increased numbers of CCR5+ interferon- $\gamma$  and tumor necrosis factor- $\alpha$ -secreting T lymphocytes in multiple sclerosis patients. **Ann Neurol.** v. 47, n. 2, p. 269-273, 2000.

STUMHOFER, J. S. et al. Interleukin 27 negatively regulates the development of interleukin 17-producing T helper cells during chronic inflammation of the central nervous system. **Nat Immunol.** v. 7, n. 9, p. 937-945, 2006.

TANZOLA, M. B. et al. Mast cells exert effects outside the central nervous system to influence experimental allergic encephalomyelitis disease course. **J Immunol.** v. 171, n. 8, p. 4385-4391, 2003.

TEIXEIRA, F. B. et al. Copaiba oil-resin (*Copaifera reticulata* Ducke) modulates the inflammation in a model of injury to rats' tongues. **BMC Complement Altern Med.** v. 17, p. 313-321, 2017.

TENIENTE-SERRA, A.; RAMO-TELLO, C.; MARTINEZ-CACERES, E. M. Immunomonitoring lymphocyte subpopulations in multiple sclerosis patients. **Multiple Sclerosis: perspectives in treatment and pathogenesis.** Brisbane (AU): Codon Publications, 2017. p. 139-153. v. 1.

TERRY, J. F.; MACKALL, C. L. Interleukin-7: from bench to clinic. **Blood.** v. 99, p. 3892-3904, 2002.

TILBERY, C. P. et al. Multiple Sclerosis Functional Composite Measure (MSFC) standardized in the Brazilian population. **Arq Neuropsiquiatr.** v. 63, n. 1, p. 127-232, 2005.

VAN DER VLIET, H. J. et al. Circulating V $\alpha$ 24+V $\beta$ 11+ NKT cell numbers are decreased in a wide variety of diseases that are characterized by autoreactive tissue damage. **Clin Immunol.** v. 100, n. 2, p. 144-148, 2001.

VARGA, Z. V. et al.  $\beta$ -Caryophyllene protects against alcoholic steatohepatitis by attenuating inflammation and metabolic dysregulation in mice. **Br J Pharmacol.** v. 175, n. 2, p. 320-334, 2018.

VEIGA JR., V. F. et al. Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne-A comparative study. **J Ethnopharmacol.** v. 112, n. 2, p. 248-254, 2007.

VELDHOEN, M.; HIROTA, K.; WESTENDORF, A. M. The aryl hydrocarbon receptor links Th17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins. **Nature.** v. 453, n. 7191, p. 106-109, 2008.

VIRLEY, D. J. Developing therapeutics for the treatment of multiple sclerosis. **NeuroRx.** v. 2, n. 4, p. 638-649, 2005.

VU, T. et al. T-cell responses to oligodendrocyte-specific protein in multiple sclerosis. **J Neurosci Res.** v. 66, n. 3, p. 506-509, 2001.

WEBER, F. et al. Human astrocytes are only partially competent antigen presenting cells: possible implications for lesion development in multiple sclerosis. **Brain.** v. 117, n. 1, p. 59-69, 1994.

WILLIAMS, A. et al. Multiple sclerosis in twins. **Neurology.** v. 30, n. 11, p. 1139-1147, 1980.

WILLIAMS, T.; COLES, A.; AZZOPARDI, L. The outlook for alemtuzumab in multiple sclerosis. **Bio Drugs.** v. 27, n. 3, p. 181-189, 2013.

WUCHERPFENNIG, K. W. Autoimmunity in the central nervous system: mechanisms of antigen presentation and recognition. **Clin Immunol Immunopathol.** v. 72, n. 3, p. 293-306, 1994.

YAMAGUICHI, M. H.; GARCIA, R. F. Óleo de copaíba e suas propriedades medicinais: revisão bibliográfica. **Revista Saúde e Pesquisa.** v. 5, n. 1, p. 137-146, 2012.

YANG, X. O.; PAPPU, B. P.; NURIEVA, R. T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma. **Immunity.** v. 28, n. 1, p. 29-39, 2008.

YIN, J. J. et al. Neutralization of interleukin-9 decreasing mast cells infiltration in experimental autoimmune encephalomyelitis. **Chin Med J.** v. 130, n. 8, p. 964-971, 2017.

ZHANG, Z. et al. Inhibitory effect of trans-caryophyllene (TC) on leukocyte-endothelial attachment. **Toxicol Appl Pharmacol.** v. 329, n. 15, p. 326-333, 2017.

ZHOU, Y. et al. IL-9 promotes Th17 cell migration into the central nervous system via CC chemokine ligand-20 produced by astrocytes. **J Immunol.** v. 186, n. 7, p. 4415-4421, 2011.