

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Luan Crístian da Silva

**PARTICIPAÇÃO DA ENZIMA FOSFATIDILINOSITOL-3-QUINASE
GAMA (PI3K γ) EM PARÂMETROS CLÍNICOS E
NEUROINFLAMATÓRIOS DA ENCEFALOMIELEITE AUTOIMUNE
EXPERIMENTAL**

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)

da Silva, Luan Cristian.

PARTICIPAÇÃO DA ENZIMA FOSFATIDILINOSITOL-3 QUINASE
GAMA (PI3K γ) EM PARÂMETROS CLÍNICOS E
NEUROINFLAMATÓRIOS DA ENCEFALOMIELEITE AUTOIMUNE
EXPERIMENTAL / Luan Cristian da Silva. -- 2019.

186 f. : il.

Orientadora: Ana Paula Ferreira

Coorientadora: Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto
de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Imunologia e Genética, 2019.

1. EAE. 2. PI3K. 3. FTY720. I. Ferreira, Ana Paula, orient. II. de
Oliveira, Antônio Carlos Pinheiro, coorient. III. Título.

LUAN CRISTIAN DA SILVA

**A PARTICIPAÇÃO DA ENZIMA FOSFATIDILINOSITOL-3-QUINASE GAMA (PI3K GAMA)
EM PARÂMETROS CLÍNICOS E NEUROINFLAMATÓRIOS DA ENCEFALOMIELETTE
AUTOIMUNE EXPERIMENTAL**

Tese de Doutorado submetida à banca examinadora do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Ênfase em Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários para obtenção do Grau de Doutor em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 27 / 02 / 2019

BANCA EXAMINADORA:



Prof.ª Dr.ª Ana Paula Ferreira

Orientadora

Universidade Federal de Juiz de Fora

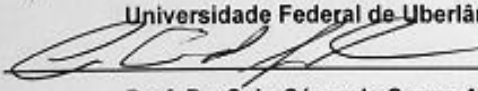
Prof. Dr. Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira

Universidade Federal Minas Gerais



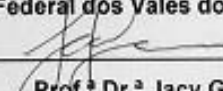
Prof.ª Dr.ª Maria Aparecida de Souza

Universidade Federal de Uberlândia




Prof. Dr. Caio César de Souza Alves

Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri



Prof.ª Dr.ª Jacy Gameiro

Universidade Federal de Juiz de Fora



Prof. Dr. Eugenio Damaceno Hottz

Universidade Federal de Juiz de Fora

Luan Crístian da Silva

**PARTICIPAÇÃO DA ENZIMA FOSFATIDILINOSITOL-3-QUINASE
GAMA (PI3K γ) EM PARÂMETROS CLÍNICOS E
NEUROINFLAMATÓRIOS DA ENCEFALOMIELEITE AUTOIMUNE
EXPERIMENTAL**

Tese de Doutorado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Área: Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias, para obtenção do Título de Doutor em Ciências Biológicas: Área: Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias.

Orientadora: Prof^a. Dra. Ana Paula Ferreira

Co-orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira

JUIZ DE FORA
2019

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho a todos (as) os (as)
pacientes com Esclerose Múltipla.*

“O rio atinge seus objetivos porque aprendeu a contornar os obstáculos.”

Lao-Tse

AGRADECIMENTOS

Após quatro anos, é chegada a hora de agradecer àqueles (as) que, de alguma forma, contribuíram para a realização e conclusão deste trabalho:

Àgradeço à Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (PPGCBIO) por me possibilitarem alcançar este objetivo;

À minha família, em especial, minha mãe Andreia, meu pai Wilton e minha irmã Rayanne, por sonharem este sonho junto comigo;

À Professora Ana Paula Ferreira, pelos oito anos de convivência, inspiração, ensinamentos e compreensão;

A todos os integrantes do Laboratório de Tecnologia Celular e Imunologia Aplicada (IMUNOCET), em especial, à Leidinha, Sirley, Viviane, Bárbara, Flávia, Erick, Marcilene, Marina, pelo companheirismo e por todo o período de convivência. Foram em meio aos muitos experimentos, erros e acertos, tensões e descontrações que nos aproximamos e construímos uma história que sempre será lembrada por mim;

Aos professores da Imunologia, Jacy Gameiro, Henrique Teixeira, Gilson Macedo e Juciane Catro pela contribuição na reafirmação de minha escolha pela Imunologia;

À Isabel Lima, que foi uma das grandes responsáveis pela projeção deste trabalho, meu muito obrigado pela paciência, disposição e amizade durante todo o período do doutorado;

Ao professor Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira pela co-orientação e por acreditar no meu trabalho;

Ao professor Mauro Almeida e seus alunos, em especial à Tais Correa, do Departamento de Química da UFJF pela síntese do análogo utilizado neste trabalho;

Ao professor Mauro Teixeira (ICB/UFMG) por fornecer os animais PI3K^{-/-} utilizados neste trabalho;

Aos (Às) amigos (as) que me aconselharam e auxiliaram a seguir quando surgiram momentos de desânimo e medo, em especial à Ana Guaberto, Jéssica Lana, Sarah Mesquita, Diego Assis, Sara Malaguti e Raíza Azevedo;

Aos (Às) amigos (as) e colegas do Colégio Apogeu, em especial, Luiz Rogério, Pedro, Wesley, Larissa, Keila, Priscila e Ricardo, agradeço por, diariamente, contribuírem para o meu crescimento como profissional e, acima de tudo, como pessoa. Vocês foram fundamentais para esta conquista também;

À Lilian Freire, por auxiliar o meu processo de autoconhecimento;

E aos membros da banca, por terem aceitado o convite para contribuir pela melhoria do meu trabalho.

RESUMO

Introdução: A Esclerose Múltipla (EM) é uma doença inflamatória autoimune desmielinizante que afeta o sistema nervoso central (SNC). A Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE) é um modelo animal para o estudo da EM. A enzima fosfatidilinositol-3-quinase- γ (PI3K γ) desempenha um papel importante na motilidade e sobrevivência de leucócitos em vários modelos de inflamação. **Objetivo:** Avaliar o papel da enzima PI3K γ no desenvolvimento da resposta imune da EAE e ainda, se a inibição desta via contribui de forma neuroprotetora na doença. **Metodologia:** Camundongos fêmeas C57BL/6 com 6 a 8 semanas de idade do tipo selvagem (WT) ou deficientes de PI3K γ (KO) foram imunizados com o peptídeo da Glicoproteína Mielínica de Oligodendrócitos (MOG₃₅₋₅₅) em adjuvante completo de Freund, suplementado com *Mycobacterium tuberculosis* H37RA e ainda, a Toxina pertussis. Primeiramente, a EAE foi avaliada até o 21ºdpi, sendo que nos 14º e 21º dpi, grupos de animais foram eutanasiados. Os cérebros, medulas espinhais e linfonodos inguinais foram removidos e submetidos a análises como a histopatologia, através da coloração de H&E para visualização de infiltrados inflamatórios e de Luxol *Fast-Blue*, do processo de desmielinização no SNC. Através de ELISA, foram mensuradas as citocinas IFN- γ , IL-17, IL-6, TGF- β e IL-10 e as quimiocinas CCL5 e CCL20. A proliferação microglial e astrocitária na medula foram avaliadas pela marcação de células Iba+ e GFAP+, respectivamente, por Imunofluorescência e a marcação de células apoptóticas na medula, por TUNEL. Animais EAE foram tratados com 1mg/kg de FTY720 ou de seu análogo, por gavagem, do 10º ao 20º dpi. No 21º dpi, os animais foram eutanasiados para a realização das análises histopatológicas, dosagem das citocinas e quimiocinas por ELISA, nos cérebros, medulas e linfonodos, e a avaliação da fosforilação da proteína Akt na medula espinhal por Western Blotting. **Resultados:** Os animais WT-EAE apresentaram o pico da EAE por volta do 19º dpi, enquanto os animais KO-EAE obtiveram um atraso no desenvolvimento da EAE com o pico da EAE reduzido no 20º dpi, em relação ao grupo WT-EAE. A redução de infiltrados inflamatórios e focos de desmielinização foram relacionados a uma menor produção de CCL5, CCL20, IFN- γ , IL-17 no SNC de camundongos KO-EAE nos 14º e 21º dpi, em relação ao grupo WT-EAE. O grupo

KO-EAE apresentou menor proliferação microglial e astrocitária no 14ºdpi em relação ao grupo WT-EAE. Nos linfonodos inguinais, tanto a produção de citocinas pró-inflamatórias como a de quimiocinas foram menores no grupo KO-EAE em relação ao grupo WT-EAE, nos dois pontos avaliados. Foi verificado um número maior de células apoptóticas no SNC de animais WT-EAE em ambos os pontos. O tratamento com FTY720 ou seu análogo foi capaz de reduzir o agravamento de sinais clínicos da EAE, infiltração de células inflamatórias, desmielinização, citocinas pró-inflamatórias e ainda, a fosforilação de Akt, o que sugere uma menor ativação da via PI3K/Akt/mTOR. **Conclusão:** Esses resultados indicam que PI3K é envolvida na sobrevivência, proliferação e migração leucocítica na EAE. Além disso, os compostos FTY720 e seu análogo lipofílico foram capazes de reduzir a neuroinflamação provocada por esta doença no SNC.

Palavras-chaves: EM, EAE, PI3K- γ , FTY720, análogo.

ABSTRACT

Introduction: Multiple sclerosis (MS) is an autoimmune inflammatory disease that affects the central nervous system (CNS). The Encephalomyelitis Autoimmune Experimental (EAE) is an animal model for the study of MS. The enzyme phosphatidylinositol-3-kinase- γ (PI3K γ) plays an important role in the motility and survival of leukocytes in various inflammation models. **Objective:** To evaluate the role of the enzyme PI3K γ in the development of the immune response of EAE and also, if the inhibition of this pathway would be neuroprotective in the disease. **Methods:** Wild-type (WT) or PI3K γ (KO) deficient C57BL/6 female mice were immunized with the Oligodendrocyte Myelin Glycoprotein Peptide (MOG₃₅₋₅₅) in Freund's complete adjuvant, supplemented with Mycobacterium tuberculosis H37RA and still, pertussis toxin. First, the EAE was evaluated until the 21st day, and in the 14th and 21st dpi groups of animals were euthanized. The brains, spinal cords and inguinal lymph nodes were removed and submitted to histopathological analysis by H & E staining to cellular infiltration and Luxol Fast-Blue staining to CNS demyelination process. Through ELISA, the IFN- γ , IL-17, IL-6, TGF- β and IL-10 cytokines, CCL5 and CCL20 chemokines levels were measured. Microglial and astrocyte proliferation by labeling for Iba+ and GFAP+, respectively, by immunofluorescence and labeling of apoptotic cells in the spinal cords, by TUNEL, were evaluated. EAE were treated with 1mg / kg FTY720 or its analogue, by gavage, from 10th to 20th dpi. At 21^o dpi, the animals were euthanized for histopathological analyzes, cytokines levels by ELISA, in the brains, spinal cords and lymph nodes, and the evaluation of protein phosphorylation by Western Blotting. **Results:** WT-EAE animals had the peak of EAE around the 19th dpi, whereas those of KO-EAE present a delay in the development of EAE with the peak of EAE reduced on 20^o dpi, in relation to the WT-EAE group. Reduction of infiltrates and foci of demyelination was associated with a lower production of CCL5, CCL20, IFN- γ , IL-17 in the CNS of KO-EAE mice at 14th and 21st dpi, in relation to the WT-EAE group. The KO-EAE group had lower microglial and astrocytic proliferation at 14^odpi in relation to the WT-EAE group. In the inguinal lymph nodes, both proinflammatory cytokine production and chemokines were lower in the KO-EAE group than in the WT-EAE group at the two evaluated

points. A larger number of apoptotic cells was observed in the CNS of WT-EAE animals at both points. Treatment with FTY720 or its analogue was able to reduce the worsening of clinical signs of EAE, infiltration of inflammatory cells, demyelination, proinflammatory cytokines and also, phosphorylation of Akt, which became a less activation of the pathway PI3K/Akt/mTOR. **Conclusion:** The results indicate that PI3K is importante to survival, proliferation and migration of the leukocytes in EAE. In addition, compounds FTY720 and its lipophilic analog have been able to reduce the neuroinflammation caused by this disease in the CNS.

Keywords: MS, EAE, PI3K- γ , FTY720, analog.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- ACTH – “adrenocorticotropic hormone” - Hormônio adrenocorticotrópico
- APC - “Antigen-presenting Cell” – Célula Apresentadora de Antígeno Associado ao Linfócito TCD4
- BHE- Barreira Hemato-encefálica
- CD- “Cluster of differentiation” – Grupamento de diferenciação
- CFA – “Complete Freund's Adjuvant”- Adjuvante Completo de Freund
- CTLA-4- “Cytotoxic T-lymphocyte-Associated Protein 4”- Antígeno Citotóxico
- EBV – “Epstein-Barr vírus” – vírus Epstein-Barr
- EDSS – “Expanded Disability Status Scale” - Escala Expandida do Estado de Incapacidade
- EMA – “European Medical Agency” - Agência Médica Europeia
- GFAP- “Glial fibrillary acidic protein”
- HBV - “Hepatitis B Virus” - vírus da hepatite B
- HHV6 - “Human Herpes Viruses” - vírus da Herpes Humana 6
- HLA - “Human Leukocyte Antigen” – Antígeno Leucocitário Humano
- IBA- “Ionized calcium binding adaptor molecule 1”
- IBD – “Inflammatory Bowel Diseases” - Doenças inflamatórias intestinais
- IL- Interleucinas
- ILCs- “Innate lymphoid cells”- Células Linfoides Inatas.
- IFN γ - Interferon gama
- MBP - “Myelin Basic Protein” - Proteína Básica da Mielina
- MHC - “Major Histocompatibility Complex”- Complexo de Histocompatibilidade
- MMP – “Matrix Metalloproteinase” - Metaloproteinases
- MOG – “Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein” – Glicoproteína Mielínica de Oligodendrócitos
- mTOR- “mammalian Target Of Rapamycin”

NO – “Nitric Oxide”- Óxido Nítrico

NK- “Natural Killer”

PI3K- “Phosphoinositide 3-kinase” – Fosfatidilinositol-3-quinase

PLP- “Proteolipidic Protein” – Proteína Proteolípídica Principal

ROS – “Reactive Oxygen Species” – Espécies Reativas de Oxigênio

TGF- β – “Transforming growth factor beta”- Fator Transformador de

TH- “T helper”- T auxiliar

TNF - “Tumor necrosis factor alpha” – Fator de Necrose Tumoral alfa

WT- “Wild type” – tipo selvagem

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição mundial da prevalência de EM [Federação Internacional de Esclerose Múltipla].....	31
Figura 2 - Imunopatogênese da Esclerose Múltipla.....	36
Figura 3 - Padrões clínicos da Esclerose Múltipla. A inclinação do gráfico para direita indica piora do escore clínico	39
Figura 4 - Representação da Escala Expandida do Estado de Incapacidade (EDSS).	40
Figura 5 - Estruturas químicas dos tratamentos/medicamentos para EM.	40
Figura 6 - Estruturas químicas do ISP-1 (miriocina) e o composto FTY720.....	47
Figura 7 - A complexidade imunológica do ambiente de células imunes e citocinas na EM	50
Figura 8 - Esquema da via de sinalização de Akt/mTOR através da ativação de PI3K e efetores <i>downstream</i>	63
Figura 9 - Via clássica de ativação de NF- κ B	64
Figura 10 - Síntese dos aminoálcoois lipofílicos.....	72
Figura 11 - Deficiência de PI3K γ atrasa e reduz os sinais clínicos da EAE.	80
Figura 12 - Deficiência de PI3K γ atrasa e reduz a presença de infiltrados celulares da EAE. Histopatologia do cérebro de camundongos WT ou PI3K γ ^{-/-} imunizados (B- D- F- H) ou não (A- E- C- G) com 100 μ g de peptídeo MOG35-55 nos dias 14 e 21 após a imunização..	83
Figura 13 - Deficiência de PI3K γ atrasa e reduz a presença de infiltrados celulares da EAE. Escore inflamatório do cérebro de camundongos WT ou PI3K γ ^{-/-} imunizados com 100 μ g de peptídeo MOG35-55 nos dias 14 e 21 após a imunização.	84

Figura 14 - Deficiência de PI3K γ reduz o processo de desmielinização da EAE. Histopatologia do cérebro de camundongos WT ou PI3K γ ^{-/-} imunizados (B- D- F- H) ou não (A- E- C- G) com 100 μ g de peptídeo MOG35-55 nos dias 14 e 21 após a imunização.....86

Figura 15 - Deficiência de PI3K γ reduz o processo de desmielinização da EAE. Escore de desmielinização da medula espinhal de camundongos WT ou PI3K γ ^{-/-} imunizados com 100 μ g de peptídeo MOG35-55 nos dias 14 e 21 após a imunização.....87

Figura 16 - Deficiência de PI3K γ reduz a presença de infiltrados celulares da EAE. Histopatologia do cérebro de camundongos WT ou PI3K γ ^{-/-} imunizados (B- D- F- H) ou não (A- E- C- G) com 100 μ g de peptídeo MOG35-55 nos dias 14 e 21 após a imunização.....89

Figura 17 - Deficiência de PI3K γ reduz a presença de infiltrados celulares da EAE. Escore inflamatório da medula espinhal de camundongos WT ou PI3K γ ^{-/-} imunizados com 100 μ g de peptídeo MOG35-55 nos dias 14 e 21 após a imunização.....90

Figura 18 - Deficiência de PI3K γ reduz o processo de desmielinização da EAE. Histopatologia de medula espinhal de camundongos WT ou PI3K γ ^{-/-} imunizados ou não com 100 μ g de peptídeo MOG35-55 nos dias 14 e 21 após a imunização ... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 19 - Deficiência de PI3K γ reduz o processo de desmielinização da EAE. Escore de desmielinização da medula espinhal de camundongos WT ou PI3K γ ^{-/-} imunizados com 100 μ g de peptídeo MOG35-55 nos dias 14 e 21 após a imunização.....93

Figura 20 - Deficiência de PI3K γ reduz a produção de quimiocinas da EAE Avaliação da produção de quimiocinas CCL5 (A) e CCL20 (B) no sobrenadante de homogenato de cérebro de camundongos WT ou PI3K γ ^{-/-} imunizados ou não com 100 μ g de peptídeo MOG35-55, nos dias 14 e 21 após a imunização.....96

Figura 21- Deficiência de PI3K γ reduz a produção de quimiocinas da EAE Avaliação da produção de quimiocinas CCL5 (A) e CCL20 (B) no sobrenadante de

homogenato de medula espinhal de camundongos WT ou PI3K γ ^{-/-} imunizados ou não com 100

µg de peptídeo MOG35-55, nos dias 14 e 21 após a imunização.....98

Figura 22 - Deficiência de PI3K γ reduz a proliferação microglial na EAE. Imunofluorescência da medula espinhal de camundongos WT ou PI3K γ ^{-/-} imunizados (B- D- F- H) ou não (A- E- C- G) com 100 µg de peptídeo MOG35-55 nos dias 14 e 21 após a imunização. 100

Figura 23 - Deficiência de PI3K γ reduz a proliferação microglial na EAE. Imunofluorescência da medula espinhal de camundongos WT ou PI3K γ ^{-/-} imunizados com 100 µg de peptídeo MOG35-55 nos dias 14 e 21 após a imunização... 101

Figura 24 - Deficiência de PI3K γ atrasa a proliferação astrocitária na EAE. Imunofluorescência da medula espinhal de camundongos WT ou PI3K γ ^{-/-} imunizados (B- D- F- H) ou não (A- E- C- G) com 100 µg de peptídeo MOG35-55 nos dias 14 e 21 após a imunização..... 117

Figura 25 - Deficiência de PI3K γ atrasa a proliferação astrocitária na EAE. Imunofluorescência da medula espinhal de camundongos WT ou PI3K γ ^{-/-} imunizados com 100 µg de peptídeo MOG35-55 nos dias 14 e 21 após a imunização. 105

Figura 26 - Deficiência de PI3K γ reduz a produção de citocinas pró-inflamatórias na EAE. Avaliação da produção de citocinas pró-inflamatórias IFN- γ (A), IL-6 (B), TGF- β (C) e IL-17 (D) no sobrenadante de homogenato de cérebro de camundongos WT ou PI3K γ ^{-/-} imunizados com 100 µg de peptídeo MOG 35-55, nos dias 14 e 21 após a imunização. 106

Figura 27 - Deficiência de PI3K γ não reduz a produção da citocina anti-inflamatória IL-10 na EAE. Avaliação da produção da citocina anti-inflamatórias IL-10 no sobrenadante de homogenato de cérebro de camundongos WT ou PI3K γ ^{-/-} imunizados com 100 µg de peptídeo MOG 35-55, nos dias 14 e 21 após a imunização..... 107

Figura 28 - Deficiência de PI3K γ reduz a produção de citocinas pró-inflamatórias na EAE. Avaliação da produção de citocinas pró-inflamatórias IFN- γ (A), IL-6 (B), TGF- β

(C) e IL-17 (D) no sobrenadante de homogenato de medula espinhal de camundongos WT ou PI3K γ ^{-/-} imunizados com 100 μ g de peptídeo MOG 35-55, nos dias 14 e 21 após a imunização..... 110

Figura 29 - Deficiência de PI3K γ não reduz a produção da citocina anti-inflamatória IL-10 na EAE. Avaliação da produção da citocina anti-inflamatórias IL-10 no sobrenadante de homogenato de medula espinhal de camundongos WT ou PI3K γ ^{-/-} imunizados com 100 μ g de peptídeo MOG 35-55, nos dias 14 e 21 após a imunização..... 111

Figura 30 - Deficiência de PI3K γ reduz a produção de quimiocinas da EAE. Avaliação da produção de quimiocinas CCL5 (A) e CCL20 (B) no sobrenadante de homogenato de linfonodos inguinais de camundongos WT ou PI3K γ ^{-/-} imunizados ou não com 100 μ g de peptídeo MOG35-55, nos dias 14 e 21 após a imunização... .. 114

Figura 31 - Deficiência de PI3K γ reduz a produção de citocinas pró-inflamatórias na EAE. Avaliação da produção de citocinas pró-inflamatórias IFN- γ (A), IL-6 (B), TGF- β (C) e IL-17 (D) no sobrenadante de homogenato de linfonodos inguinais de camundongos WT ou PI3K γ ^{-/-} imunizados com 100 μ g de peptídeo MOG 35-55, nos dias 14 e 21 após a imunização 116

Figura 32 - Deficiência de PI3K γ aumenta a produção da citocina anti-inflamatória IL-10 na EAE. Avaliação da produção da citocina anti-inflamatórias IL-10 no sobrenadante de homogenato de linfonodos inguinais de camundongos WT ou PI3K γ ^{-/-} imunizados com 100 μ g de peptídeo MOG 35-55, nos dias 14 e 21 após a imunização. 117

Figura 33- Deficiência de PI3K γ reduz a morte celular programada no SNC na EAE. Histopatologia de medula espinhal de camundongos WT ou PI3K γ ^{-/-} imunizados com 100 μ g de peptídeo MOG35-55 nos dias 14 e 21 após a imunização..... 120

Figura 34- FTY720 e seu análogo lipofílico inibem o desenvolvimento da EAE. Camundongos fêmeas C57BL/6 WT foram monitorados diariamente para os sinais clínicos da EAE após imunização com 100 μ g de peptídeo MOG35-55 e tratados ou não com o composto FTY720 ou seu análogo lipofílico..... 121

Figura 35- FTY720 e seu análogo lipofílico o reduzem a presença de infiltrados inflamatórios no SNC. A) Histopatologia de cérebro de camundongos WT imunizados com 100 µg de peptídeo MOG35-55 e tratados ou não com o composto FTY720 ou seu análogo lipofílico do 10º ao 21º dpi. B) Escore inflamatório do cérebro 124

Figura 36- FTY720 e seu análogo lipofílico reduzem a desmielinização. A) Histopatologia de cérebro de camundongos WT imunizados com 100 µg de peptídeo MOG35-55 e tratados ou não com o composto FTY720 ou seu análogo lipofílico do 10º ao 21º dpi. B) Escore de desmielinização do cérebro..... 126

Figura 37- FTY720 e seu análogo lipofílico reduzem a presença de infiltrados inflamatórios no SNC. A) Histopatologia de medula espinhal de camundongos WT imunizados com 100 µg de peptídeo MOG35-55 e tratados ou não com o composto FTY720 ou seu análogo lipofílico do 10º ao 21º dpi. B) Escore inflamatório da medula espinhal..... 128

Figura 38- FTY720 e seu análogo lipofílico reduzem a desmielinização. A) Histopatologia de medula espinhal de camundongos WT imunizados com 100 µg de peptídeo MOG35-55 e tratados ou não com o composto FTY720 ou seu análogo lipofílico do 10º ao 21º dpi. B) Escore de desmielinização da medula espinhal 130

Figura 39 - FTY720 e seu análogo lipofílico inibem a produção de quimiocinas da EAE Avaliação da produção de quimiocinas CCL5 (A) e CCL20 (B) no sobrenadante de homogenato de cérebro de camundongos WT imunizados ou não com 100 µg de peptídeo MOG35-55 e tratados ou não com o composto FTY720 ou seu análogo lipofílico do 10º ao 21º dpi 132

Figura 40- FTY720 e seu análogo lipofílico inibem a produção de citocinas pró-inflamatórias e elevam a produção de IL-10 da EAE Avaliação da produção de citocinas IFN-gama (A), IL-17 (B) e IL-10 (C) no sobrenadante de homogenato de cérebro de camundongos WT imunizados ou não com 100 µg de peptídeo MOG35-55 e tratados ou não com o composto FTY720 ou seu análogo lipofílico do 10º ao 21º dpi..... 134

Figura 41- FTY720 e seu análogo lipofílico inibem a produção de quimiocinas da EAE Avaliação da produção de quimiocinas CCL5 (A) e CCL20 (B) no sobrenadante de homogenato de medula espinhal de camundongos WT imunizados ou não com

100 µg de peptídeo MOG35-55 e tratados ou não com o composto FTY720 ou seu análogo lipofílico do 10º ao 21º dpi 136

Figura 42- FTY720 e seu análogo lipofílico inibem a produção de citocinas pró-inflamatórias e elevam a produção de IL-10 da EAE Avaliação da produção de citocinas IFN-gama (A), IL-17 (B) e IL-10 (C) no sobrenadante de homogenato de medula espinhal de camundongos WT imunizados ou não com 100 µg de peptídeo MOG35-55 e tratados ou não com o composto FTY720 ou seu análogo lipofílico do 10º ao 21º dpi..... 138

Figura 43- FTY720 e seu análogo lipofílico inibem a produção de quimiocinas da EAE Avaliação da produção de quimiocinas CCL5 (A) e CCL20 (B) no sobrenadante de homogenato de linfonodos inguinais de camundongos WT imunizados ou não com 100 µg de peptídeo MOG35-55 e tratados ou não com o composto FTY720 ou seu análogo lipofílico do 10º ao 21º dpi..... 117

Figura 44- FTY720 e seu análogo lipofílico inibem a produção de citocinas pró-inflamatórias e elevam a produção de IL-10 da EAE. Avaliação da produção de citocinas IFN-gama (A), IL-17 (B) e IL-10 (C) no sobrenadante de homogenato de linfonodos inguinais de camundongos WT imunizados ou não com 100 µg de peptídeo MOG35-55 e tratados ou não com o composto FTY720 ou seu análogo lipofílico do 10º ao 21º dpi. 142

Figura 45 - FTY720 e seu análogo lipofílico reduzem a expressão de p-Akt na EAE. Imunorreatividade de p-Akt na medula espinhal de camundongos WT imunizados ou não com 100 µg de peptídeo MOG35-55 e tratados ou não com o composto FTY720 ou seu análogo lipofílico do 10º ao 21º dpi. A) Análise densitométrica quantitativa de fosfo-Akt normalizada para controle de carga de Akt total. B) Imagens representativas dos Western blots..... 144

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Fenótipos clínicos dos modelos animais de EAE	51
Tabela 2 Escala de incapacidade neurológica.....	78

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	28
1.1	A Esclerose Múltipla	28
1.1.1	Histórico	28
1.1.2	Conceito e Epidemiologia	29
1.1.3	Sintomatologia	36
1.1.4	Formas clínicas	38
1.1.5	Diagnóstico	40
1.1.6	Tratamento	42
1.2	A Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE)	49
1.2.1	Conceito e histórico	50
1.2.2	Aspectos imunológicos da EAE e EM	52
1.3	Cascata de sinalização da proteína Akt (PKB)	60
1.3.1	Caracterização histórica da Akt (PKB)	60
1.3.2	Funções fisiológicas da Akt (PKB)	61
1.3.3	Sinalização da via upsteam da Akt (PKB)	62
1.3.4	Sinalização da via downsteam da Akt (PKB)	64
2	OBJETIVOS	72
2.1	Objetivo geral	72
2.2	Objetivos específicos	72
3	MATERIAL E MÉTODOS	74

3.1 Animais.....	74
3.2 Tratamentos.....	71
3.3 Delineamento experimental.....	72
3.4 Avaliação clínica	77
3.5 Obtenção de órgãos e células.....	78
3.6 Análise histopatológica	78
3.7 Quantificação de citocinas e quimiocinas por ELISA.....	79
3.8 Avaliação da morte celular programada em células no SNC	80
3.9 Fenotipagem de células Iba-1+ e GFAP+ por Imunofluorescência.....	77
3.10 Avaliação da fosforilação das proteínas Akt e mTOR por Western Blotting...81	
3.11Análise estatística.....	79
4 RESULTADOS	80
4.1 Avaliação do curso clínico da EAE.....	83
4.2 Avaliação do infiltrado inflamatório e desmielinização no cérebro	85
4.3 Avaliação do infiltrado inflamatório e desmielinização na medula espinhal	88
4.4 Avaliação dos níveis das quimiocinas CCL5 e CCL20 em homogenato de cérebro.....	108
4.5 Avaliação dos níveis das quimiocinas CCL5 e CCL20 em homogenato de medula espinhal.....	97
4.6 Avaliação da proliferação microglial e astrocitária na medula espinhal	99
4.7 Avaliação dos níveis das citocinas IFN- γ , IL-6, IL-17 e TGF- β em homogenato de cérebro.....	105
4.8 Avaliação dos níveis da citocina IL-10 em homogenato de cérebro	107

4.9 Avaliação dos níveis das citocinas IFN- γ , IL-6, IL-17 e TGF- β em homogenato de medula espinhal	114
4.10 Avaliação dos níveis da citocina IL-10 em homogenato de medula espinhal	115
4.11 Avaliação dos níveis das quimiocinas CCL5 e CCL20 em homogenato de linfonodos inguinais.....	113
4.12 A Avaliação dos níveis das citocinas IFN- γ , IL-6, IL-17 e TGF- β em homogenato de linfonodos inguinais.....	120
4.13 Avaliação dos níveis da citocina IL-10 em homogenato de linfonodos inguinais.....	117
4.14 Avaliação da morte celular programada em células no SNC	119
4.15 Avaliação do curso clínico da EAE após os tratamentos com o composto FTY720 ou seu análogo lipofílico	121
4.16 Avaliação do infiltrado inflamatório e desmielinização no cérebro após os tratamentos com FTY720 ou seu análogo lipofílico	123
4.17 Avaliação do infiltrado inflamatório e desmielinização na medula espinhal após os tratamentos com FTY720 ou seu análogo lipofílico	127
4.18 Avaliação dos níveis das quimiocinas CCL5 e CCL20 em homogenato de cérebro após os tratamentos com o composto FTY720 ou seu análogo lipofílico	110
4.19 Avaliação dos níveis das citocinas IFN- γ , IL-17 e IL-10 em homogenato de cérebro após os tratamentos com o composto FTY720 ou seu análogo lipofílico	133
4.20 Avaliação dos níveis das quimiocinas CCL5 e CCL20 em homogenato de medula espinhal após os tratamentos com o composto FTY720 ou seu análogo lipofílico	111
4.21 Avaliação dos níveis das citocinas IFN- γ , IL-17 e IL-10 em homogenato de medula espinhal após os tratamentos com o composto FTY720 ou seu análogo lipofílico	112

4.22 Avaliação dos níveis das quimiocinas CCL5 e CCL20 em homogenato de linfonodos inguinais após os tratamentos com o composto FTY720 ou seu análogo lipofílico	114
4.23 Avaliação dos níveis das citocinas IFN- γ , IL-17 e IL-10 em homogenato de linfonodos inguinais após os tratamentos com o composto FTY720 ou seu análogo lipofílico	115
4.24 Avaliação do efeito dos tratamentos com o composto FTY720 e seu análogo lipofílico na via de sinalização PI3K/Akt/mTOR na medula espinhal na EAE	118
5 DISCUSSÃO	145
6 CONCLUSÃO.....	163
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	166

1 INTRODUÇÃO

1.1 A Esclerose Múltipla

1.1.1 Histórico

O histórico oficial da Esclerose Múltipla (EM) iniciou-se no século XIX, quando Robert Carswell e Jean Cruveilier relataram uma nova doença. Carswell, em 1837, observou estranhas lesões na medula espinhal de um paciente *post mortem*. Em 1838, Cruveilier publicou quatro casos que associavam quadros clínicos aos histopatológicos de pacientes com esta doença, já chamando atenção para um perfil intermitente da mesma (revisado por COMPSTON et al., 2005).

Em 1868, contribuições mais detalhadas a respeito das manifestações clínicas e anatômicas da doença derivaram-se do neurologista Jean Charcot. Seus trabalhos foram pioneiros em estabelecer ligações entre a sintomatologia e as alterações patológicas observadas nas amostras *post mortem* dos pacientes. Charcot definiu a condição clínica observada como “esclerose em placas” e a partir daí, a EM tornou-se distinta perante a medicina (revisado por COMPSTON et al., 2005).

Em 1884, Pierre Marie garantiu mais um novo passo para a EM ao sugerir, pela primeira vez, que a mesma poderia ser causada por um agente infeccioso. Tal observação foi reforçada, em 1935, pelo cientista Thomas Rivers mediante o estabelecimento de um modelo animal da doença denominado Encefalomielite Alérgica Experimental. Elvin Kab, em 1949, observou aumento de imunoglobulinas no líquido de pacientes com EM, demonstrando um componente imunológico nesta patologia (revisado por MOREIRA et al., 2002).

Ao longo do século XX até os dias atuais, as pesquisas ainda visam compreender os mecanismos imunológicos e histopatológicos envolvidos no desencadeamento da EM, uma vez que a etiologia da mesma é complexa e, além disso, é a busca pelo desenvolvimento de novas possíveis terapias que sejam eficazes e com baixos custos e efeitos colaterais para os pacientes.

1.1.2 Conceito e Epidemiologia

O sistema imunológico é capaz de lidar com uma diversidade de patógenos e, ao mesmo tempo, distinguir antígenos presentes nestes agentes daqueles que são próprios, os autoantígenos, tornando-se tolerante a estes (Walker e Abbas, 2002). Mecanismos de tolerância central e periférica, que ocorrem inicialmente no timo e nos estágios finais em tecidos periféricos, garantem que a resposta das células imunes seja eficaz contra patógenos e não permitem a ativação exacerbada do sistema imunológico, o que poderia levar a danos no hospedeiro em longo prazo (Xing e Hogquist, 2012; Mellamby et al. 2009). Nesse contexto, a perda ou o não funcionamento adequado dos mecanismos de tolerância imunológica podem desencadear doenças autoimunes (HANDEL, et al. 2018).

A Esclerose Múltipla (EM) é uma doença inflamatória crônica, de origem autoimune, que afeta o Sistema Nervoso Central (SNC). É caracterizada por repetidos episódios de destruição da bainha de mielina que reveste os axônios dos neurônios, o que, conseqüentemente, determina vários tipos de perdas neurológicas que se refletem em diferentes graus de incapacidades físicas e cognitivas (PATRIKIOS et al., 2006; LOURENÇO et al., 2012; BAKSHI et al., 2016).

A EM é mais comumente diagnosticada em adultos jovens, sendo o início dos sinais clínicos da doença observado entre os 20 e 40 anos de idade. As contribuições científicas a respeito da distribuição da EM no mundo foram mais conclusivas a partir da segunda metade do século XX.

Em seus trabalhos, Kurtze (1975^{a,b}, 2000) considera que a prevalência da doença em cada país seria determinada como alta, caso fossem notificados mais de 30 casos a cada 100.000 habitantes, como o encontrado em partes do norte e oeste da Europa e na América do Norte; média, quando apresentassem de 5 a 30 casos por 100.000, como o encontrado no sul da Europa e sul dos EUA, e baixa, quando menos de 5 casos por 100 000, como o encontrado na Ásia e América do Sul. Apesar de existirem poucos trabalhos que mostram dados de prevalência da EM nas Américas Central e Sul, estudos têm sugerido que essa taxa esteja em torno de 10–20 casos por 100.000 habitantes (CALLEGARO, et al. 2001; MELCON, et al. 2008; CRISTIANO, et al. 2009; ABREU, et al; 2012; MARRIE, et al; 2015).

Em 2008, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que 2,1 milhões de pessoas no mundo apresentavam EM, sendo a média global de prevalência da doença de 30 para cada 100.000 habitantes. Já em 2013, a Federação Internacional de Esclerose Múltipla (FIEM) estimou que existam 2,3 milhões de pessoas com EM no mundo, tendo a média de prevalência da doença aumentado para 33 a cada 100.000 habitantes (**Figura 1**). A EM é presente em todas as regiões do mundo, porém a prevalência entre cada uma dessas regiões varia enormemente.

Com base na estimativa mais recente da FIEM, a prevalência da EM seria mais alta na América do Norte e Europa com 140 e 108 pessoas a cada 100.000 habitantes, respectivamente, e menor na África Sub- Saariana e Leste asiático com 2,1 e 2,2 pessoas a cada 100.000 habitantes, respectivamente. A prevalência também varia consideravelmente quando analisada dentro de uma mesma região, como se verifica na Europa. Na Suécia, a prevalência chega a 189 a cada 100.000 habitantes, enquanto que na Albânia, a prevalência é de 22 a cada 100.000 habitantes.

Os estudos epidemiológicos para a EM demonstram que ela é mais comum em indivíduos brancos do que em indivíduos não brancos e é duas vezes mais comum no sexo feminino do que no sexo masculino. Entretanto, a OMS (2008) ressalta a necessidade de levar em consideração as limitações regionais, como por exemplo, no continente Africano onde a restrição ao atendimento médico neurológico, e a dificuldade ao acesso para diagnóstico devem ser consideradas variáveis de importante influência nos dados epidemiológicos.

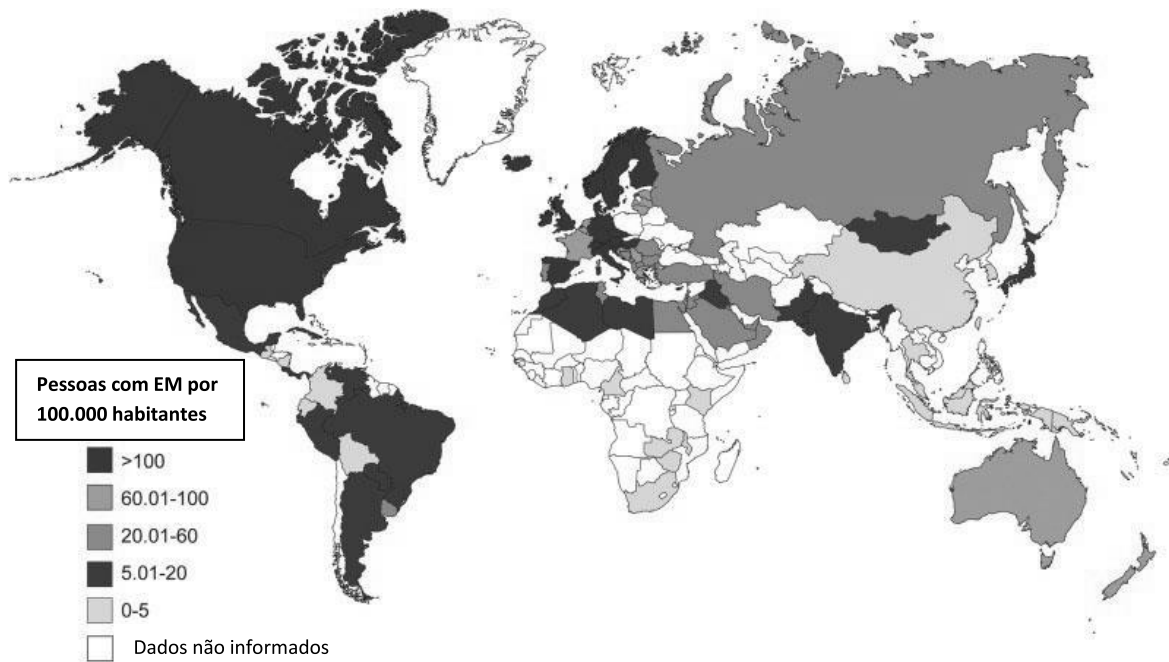


Figura 1- Distribuição mundial da prevalência de EM [Federação Internacional de Esclerose Múltipla (FIMS, 2013)].

Com relação à epidemiologia da EM, a maior parte dos dados atuais tem como base trabalhos europeus e norte-americanos. Já os estudos brasileiros avaliam a epidemiologia da doença, assim como sua diferenciação em relação a outras patologias clinicamente semelhantes, como, por exemplo, a Neuromielite óptica também conhecida como Doença de Devic. Os estudos nacionais demonstram um perfil de pacientes com EM predominantemente caucasianos, mulheres e apresentando a forma clínica remitente-recorrente (ARRUDA et al., 2001; ALVES-LEON et al., 2008; LANA-PEIXOTO et al., 2008; GRZEIUK, 2011; SOARES et al., 2013).

Acredita-se que existam associações entre fatores ambientais e genéticos para a patogênese da EM. No primeiro caso, a diferença geográfica (latitude) é considerada um dos fatores de susceptibilidade (BAMM et al., 2017). De acordo com os dados da FIEM (2013), países mais distantes da linha equatorial do planeta apresentam maiores taxas de prevalência da doença, por exemplo, os países norte-europeus e norte-americanos.

Alguns estudos têm mostrado que a susceptibilidade à EM pode estar relacionada a outros gatilhos ambientais como, por exemplo, temperatura, níveis de

vitamina D, de melatonina, dieta alimentar e fumo (revisado por LINCOLN e COOK, 2009; MRAD et al., 2017).

Atualmente, têm-se destacado a grande relevância da vitamina D para a EM. Mrad e colaboradores (2017) verificaram em seu trabalho que pacientes com EM deficientes em vitamina D apresentaram números mais elevados de células inflamatórias no soro, enquanto que a suplementação desta vitamina por três meses foi capaz de reduzir tais populações celulares garantindo gravidade e progressão menores da doença.

Um dos principais fatores relacionados à disponibilidade da vitamina D na população é a exposição à radiação Ultravioleta solar, a qual é essencial para a produção dessa vitamina. A menor exposição a essa radiação foi relacionada a uma menor produção da vitamina D e conseqüentemente maior prevalência da EM. Dessa forma, países localizados em regiões de baixa exposição à luz solar, por exemplo, aqueles mais próximos aos polos do planeta, tendem a apresentar maiores taxas de prevalência da doença provavelmente por possuírem populações com níveis de produção de vitamina D mais baixos (THOUVERNOT et al., 2014).

De posse disso, podemos mensurar que os níveis de vitamina D possam exibir padrões de variação sazonais, uma vez que se encontram na população, geralmente, mais baixos ao final do inverno e início da primavera e assim, correlacionando-se ao desenvolvimento, gravidade clínica e progressão da EM, e ainda de outras doenças autoimunes de caráter inflamatório como, o Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES), a Psoríase e a Artrite Reumatoide (AR) durante tais períodos (WATAD et al., 2017).

Também tem sido alvo de estudos, o papel das infecções no início da patogênese de doenças autoimunes, como a EM. Fujinami e Oldstone (1985) já haviam verificado uma semelhança estrutural entre peptídeos do vírus da hepatite B (HBV, *do inglês* Hepatite B Virus) com a proteína básica da mielina (MBP, *do inglês* Myelin Basic Protein) e concluíram que a infecção por HBV, associada a outros fatores, poderia desencadear a EM, por ativação de linfócitos T que respondem a peptídeos do HBV e também à MBP. Nesse caso, as respostas imunológicas contra o vírus resultam em reações contra os próprios tecidos, sendo este evento conhecido como “mimetismo molecular” (GRIGORIADIS, 2006, BRETTSCHEIDER et al., 2009; LARONI et al; 2016).

Pormohammad e colaboradores (2017) ao conduzirem uma meta-análise da relação entre a infecção pelo vírus da Herpes Humana 6 (HHV6, *do inglês* Human Herpes Viruses) e a EM, verificaram através de análises moleculares e sorológicas de pacientes infectados pelo HHV6 que, assim como em outras infecções por herpes vírus, o HHV6 esteve significativamente relacionado à EM.

Além dos vírus, outros patógenos, como as bactérias e os fungos, também são constantemente associados com a patogênese da EM. O *Mycobacterium avium paratuberculosis* (MAP) é um agente infeccioso associado com a EM, em pacientes na Sardenha (FRAU et al., 2013). *Bordetella pertussis* é uma bactéria capaz de persistir na região nasofaríngea de alguns indivíduos vacinados e, em modelos animais da EM, sua toxina atua como potente adjuvante quando administrada com antígenos neurais, induzindo neuropatologias em tais modelos (RUBIN et al., 2016).

Saroukolaei e colaboradores (2016) ao analisarem a atividade da enzima Proteínase A, a qual atua como importante fator de virulência em *Candida albicans*, entre pacientes com EM e tal infecção fúngica e controles, observaram que a atividade da enzima mostrou-se mais elevada nos pacientes com EM, sugerindo um maior potencial fúngico de invasão tecidual e associação com a gravidade da EM.

Recentemente, o hormônio melatonina, produzido e liberado pela glândula pineal, e que atua na organização temporal dos ciclos biológicos, encontrando-se em níveis mais baixos durante a primavera, é um achado que se correlaciona com as maiores taxas de exacerbação da EM neste período. Este hormônio parece estar envolvido na etiopatogenia das doenças inflamatórias intestinais (IBD, *do inglês* Inflammatory Bowel Diseases) através da influência na expressão de moléculas de adesão necessárias para a migração celular aos sítios inflamatórios (WATAD et al., 2017).

O efeito sazonalidade parece estar associado às doenças autoimunes não apenas, no que tange às influências nos níveis de vitamina D e melatonina, mas também aos padrões sazonais de determinadas doenças infecciosas, os quais estão correlacionados com o início e exacerbação de algumas doenças autoimunes. Durante o inverno, por exemplo, o aumento da incidência dos vírus infecciosos Epstein-Barr (EBV, *do inglês* Epstein-Barr virus) está associado com surtos de EM e LES. As infecções por rotavírus, mais comuns durante o inverno, antecedem o início dos sintomas da diabetes mellitus tipo 1 (T1DM, *do inglês* type 1 diabetes mellitus), enquanto que a infecção por *Escherichia coli* (*E. coli*) antecede a cirrose biliar primária

e ainda, o pico de sintomas da T1DM pode ser subsequente às infecções por Coxsachievirus que ocorrem ao final do verão (WATAD et al., 2017).

A susceptibilidade individual para desenvolver EM é bastante influenciada pelo perfil étnico e histórico familiar, o que sugere que o componente genético tem papel determinante no risco para a doença (revisado por HOLLENBACH e OHSEMBERG; 2015). Do ponto de vista genético, alguns genes de susceptibilidade já foram relacionados com a doença. O principal fator genético já identificado e relacionado à doença é o Complexo Principal de Histocompatibilidade de classe II (MHC II, *do inglês* Major histocompatibility Complex II), que em humanos é conhecido como Antígeno Leucocitário Humano (HLA, *do inglês* Human Leukocyte Antigen) e inclui os genes do grupo HLA-DR e HLA-DQ (revisado por SOSPEDRA E MARTIN, 2005). Os alelos HLA-DRB1*, em especial o HLADRB1*15, desempenham papel importante na etiologia da EM, pois já foram associados à doença em Portugal (SILVA et al., 2007), Lituânia (BALNYTE et al; 2015), Canadá (DYMENT et al; 2005) e Brasil (SANTOS et al; 2002; GRZESIUK, 2011; PARADELA et al; 2014).

O HLADRB1*15 tem sido associado aos membros das famílias do Fator Transformante de Crescimento beta (TGF- β , *do inglês* Transforming growth factor beta), Antígeno Citotóxico Associado ao Linfócito T- 4 (CTLA-4, *do inglês* cytotoxic T-lymphocyte-Associated Protein 4), Fator de Necrose Tumoral (TNF, *do inglês* Tumor necrosis factor alpha), entre outros, os quais são importantes protagonistas em processos inflamatórios, como as doenças autoimunes. Entretanto, ainda existem poucas informações com relação ao risco genético conferido pelos alelos HLA de classe I (WEINER et. al., 2009).

O HLA também pode determinar mudanças nas características clínicas e imunológicas da EM, e ainda influenciar a resposta do indivíduo às principais terapias disponíveis para o tratamento da EM, uma vez que muitos pacientes não respondem ou apresentam uma resposta fraca à terapia imunomoduladora (OKSENBERG e BARANZINI, 2010). Correlações positivas entre presença do alelo HLA-DRB1*15 e resposta à terapia com Acetato de Glamatirâmer foram relatadas por Fusco e colaboradores em 2001, porém, a associação entre os alelos de classe II e a resposta à terapia com IFN- β ainda não pôde ser confirmada (FUSCO et al., 2001; PEREIRA et al; 2012). Alguns alelos HLA foram sugeridos como fator de proteção contra a EM em certos grupos étnicos, tais como o HLA-DRB1*09 cuja baixa prevalência entre

portadores da doença, sugerem que este alelo figura como um fator de proteção (DYMENT et al; 2005; CRISTIANO et al., 2012).

Todos estes fatores etiológicos contribuem para o aparecimento no SNC de um infiltrado inflamatório bem delimitado, áreas de destruição da mielina, ativação das células residentes no SNC, como micróglia, proliferação de astrócitos, além de variáveis graus de degeneração axonal associada a stress oxidativo e injúria mitocondrial, característico da EM (LASSMANN, 2014).

A EM é uma doença autoimune inflamatória de caráter crônico. Muitos trabalhos têm sido realizados com o objetivo de se compreender os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da patogênese da doença. O processo de desmielinização observado no SNC característico da doença é consequente da ativação de células T CD4⁺ com reatividade à mielina em órgãos linfoides periféricos, como os linfonodos. Essas células atravessam a barreira hematoencefálica (BHE) em direção ao SNC, auxiliadas por um aumento na permeabilidade vascular estimulado pelo aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias no SNC, expressão de moléculas de adesão e receptores de quimiocinas nas células endoteliais da BHE. Os autoantígenos da mielina, sobretudo a Proteína Básica da Mielina (MBP) e a Glicoproteína Mielínica de Oligodendrócitos (MOG, *do inglês* Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein) do SNC são apresentados por astrócitos, macrófagos e outras células gliais a estas células T CD4⁺ no SNC, reativando estas células e levando à produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ , IL-6, IL-17, TNF- α e outros mediadores inflamatórios tais como, espécies reativas de oxigênio (ROS, *do inglês* Reactive Oxygen Species), óxido nítrico (NO, *do inglês* Nitric Oxide), prostaglandina E2 (PGE2) e ainda estimulando a liberação de Metaloproteinases (MMP, *do inglês* Matrix Metalloproteinase), as quais atuam no aumento do influxo celular para o SNC, culminando em lesão ou destruição da bainha de mielina (RANSOHOFF, et al. 2003; KUWABARA, et al. 2017; DOLATI, et al. 2017). A **figura 2** resume todo este processo (Dolati, 2017).

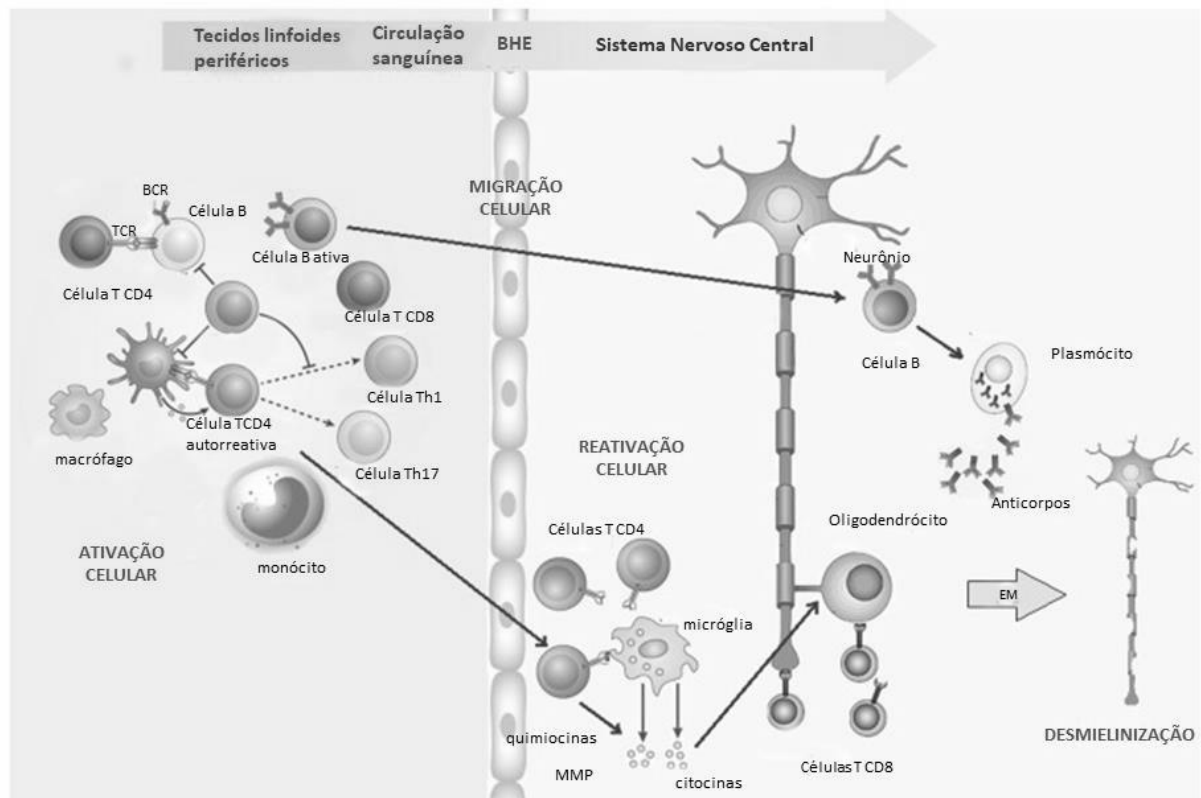


Figura 2 - Imunopatogênese da Esclerose Múltipla [adaptada de (Dolati, 2017)].

1.1.3 Sintomatologia

Do ponto de vista clínico, a EM manifesta-se com períodos de exacerbações (surto) e remissões (melhoras), embora o curso clínico possa variar de indivíduo para indivíduo. Nos últimos anos, a apresentação clínica da EM foi modificada, devido às novas terapias, que modificaram o curso clínico da doença (PEREIRA et al.; 2012). Contudo, diversos sintomas podem contribuir para a redução da qualidade de vida dos pacientes, tais como distúrbios do sono, fadiga, depressão, os quais se apresentam como reflexos da desmielinização do SNC ou do bloqueio da transmissão do impulso nervoso no nível dos axônios (KRATZ et al.; 2017). Entre as principais formas de manifestação da doença estão, problemas visuais (49%), como cegueira parcial ou total, dor ocular unilateral, diplopia (percepção de duas imagens de um único objeto) ou neurite óptica, dormência em membro ou membros e hemiplegia (paralisia de metade sagital, esquerda ou direita, do corpo) (43%), distúrbios

sensoriais (23%) e disfunção geniturinária (10%). Sinais de lesão cerebral são menos frequentes (4%) e incluem ataxia (perda do controle muscular durante movimentos voluntários), disartria (distúrbio da articulação da fala), convulsões, movimentos involuntários, ansiedade e histeria. A fadiga, ou exaustão constante, acomete 75 a 90% dos portadores de EM, e estima-se ser o sintoma mais grave em 40 % dos pacientes (MOREIRA et al., 2008).

Sintomas comportamentais como alterações de humor, transtorno bipolar, euforia e estado de apatia são descritos em coexistência com a esclerose múltipla desde os primeiros relatos da doença. Dentre os sintomas emocionais, a depressão é o achado mais frequente. A depressão pode ser o reflexo clínico da desmielinização ativa de regiões subcorticais do sistema nervoso, ou apenas uma associação de fatores, pois alguns estudiosos acreditam que os sintomas depressivos resultam do medo e da apreensão diante do diagnóstico e das restrições que normalmente acompanham o desenvolvimento da doença (MEANEY et al., 1995; MENDES et al., 2003; YBARRA et al., 2007; SACRAMENTO et al; 2011).

Kornek e colaboradores (1999) já enfatizavam a importância funcional da destruição axonal nas lesões de pacientes com a doença. Tais lesões levam a um processo conhecido como degeneração secundária ou *Walleriana* (DW) dos tratos neuronais, que ocorre quando o axônio é submetido à injúria, seja ela traumática ou isquêmica, com degeneração do tipo centrífugo e atrofia cerebral. Ainda neste trabalho, foi observado que os danos axonais nas lesões desmielinizantes ativas da EM resultam em uma redução que varia em torno de 50 a 70% na densidade neuronal em placas crônicas de desmielinização.

Sato e colaboradores (2015) observaram dois quadros neuropatológicos como potenciais indutores da patogenia da EM: nódulos microgliais e lesões recém-formadas, ambas com ausência de infiltrados celulares e desmielinização. Nos nódulos microgliais, os axônios danificados foram associados a um pequeno número de macrófagos/micróglia agregados, enquanto que oligodendrócitos em apoptose foram observados nas lesões recém-formadas. Já foi demonstrado que a DW é capaz de induzir ambos os processos no SNC. Nos modelos animais de injúria neuronal, a indução da DW no SNC é realizada a fim de resultar no recrutamento de células T encefalitogênicas presentes na periferia do organismo, as quais levam ao processo de destruição da mielina, de axônios e de oligodendrócitos no SNC (ABE et al., 1999).

Esta cadeia de eventos é consistente com a patologia precoce da EM descrita por "nódulos microgliais" e "lesões recém formadas".

Embora a extensão do dano neuronal seja variável e dependente da intensidade do processo inflamatório durante a fase aguda da doença, sabe-se que 15 anos após o início da doença, cerca de 50% dos pacientes necessitam de auxílio para caminhar, e após 25 anos, a maioria está incapacitada para andar. Estas características parecem se relacionar, portanto, com o número e a gravidade dos surtos nos primeiros anos da doença, sendo assim, o diagnóstico e o tratamento precoce são imprescindíveis (BALSIMELLI et al., 2007).

1.1.4 Formas clínicas

A classificação das formas evolutivas da EM é feita de acordo com a recomendação do Departamento Científico de Neuroimunologia da Academia Brasileira de Neurologia (2005), a qual adota a classificação de Lublin e colaboradores (1996), que contempla quatro formas de evolução da doença: Remitente-Recorrente (RR), Secundária-Progressiva (SP), Primária-Progressiva (PP) e Progressiva-Recorrente (PR).

Cerca de 85% dos pacientes apresentam o tipo Remitente-Recorrente (RR), com surtos de duração variável, seguidos de um período de remissão e com recuperação total ou parcial do indivíduo afetado. A maioria dos pacientes do tipo RR evolui para a forma Secundária-Progressiva (SP), que após a remissão dos surtos, apresentam leve progressão da doença. Em torno de 10% dos pacientes apresentam a EM em sua forma Primária-Progressiva (PP) que já se inicia de forma progressiva, com platôs ocasionais e com pequenas melhoras temporárias. Na quarta forma, a Progressiva-Recorrente (PR) desde o início observa-se o agravamento da incapacidade com surtos claramente identificáveis com ou sem recuperação do paciente (LUBLIN e REINGOLD, 1996; LUBLIN, 2007; GOVERMAN, 2009).

Em 2007, Lublin apresentou estes padrões clínicos da doença em um gráfico, o qual foi obtido pela medida de escore clínico dos pacientes, segundo a Escala Expandida do Estado de Incapacidade (EDSS, *do inglês*, Expanded Disability Status Scale), demonstrando as consequências na progressão da EM após os surtos e

caracterizando as suas formas clínicas (**Figura 3**). Ainda de acordo com este trabalho, o elevado número de recaídas no primeiro ano está associado a um prognóstico ruim da doença.

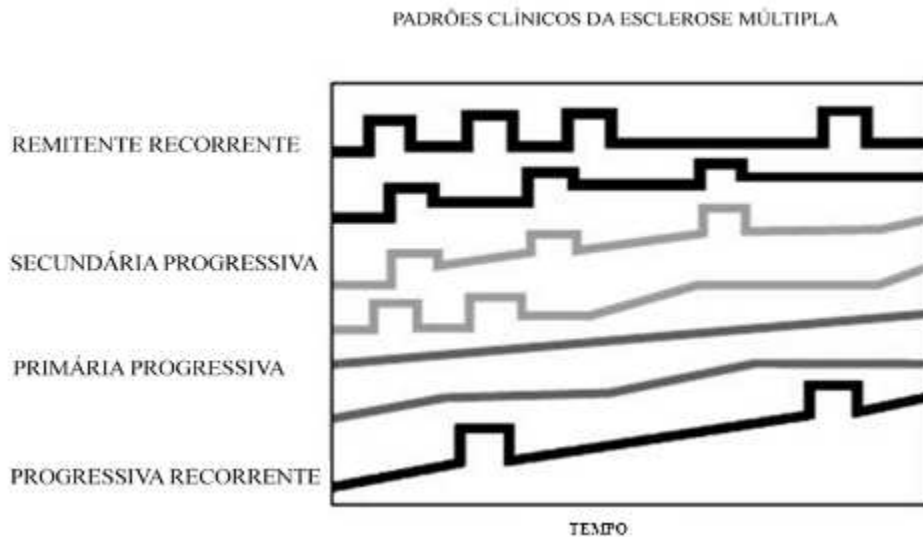


Figura 3- Padrões clínicos da Esclerose Múltipla. A inclinação do gráfico para direita indica piora do escore clínico [Adaptada de (LUBLIN, 2007)].

A EDSS é um método de quantificar, através de exames neurológicos, as incapacidades ocorridas durante a evolução da EM ao longo do tempo. Foi desenvolvida pelo neurologista John Kurtzke em 1983 como um aperfeiçoamento da Escala do Estado de Incapacidade (DSS, do inglês, Disability Status Scale) desenvolvida pelo mesmo em 1955. A EDSS varia de 0 a 10, em incrementos de 0,5 unidade, que representam níveis mais altos de incapacidade (**Figura 4**).

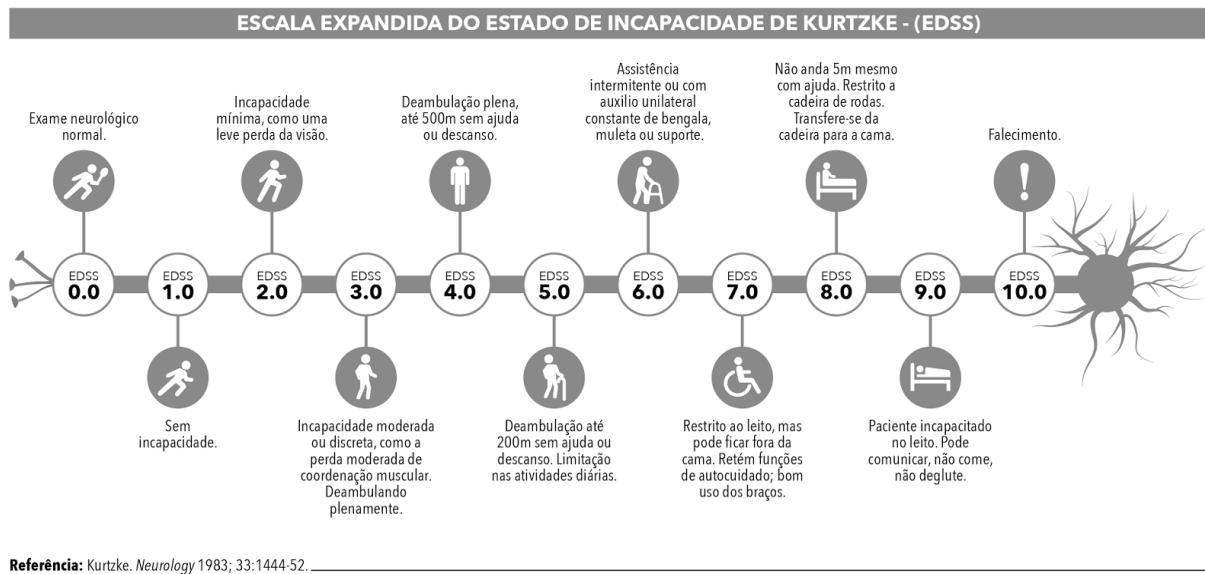


Figura 4 - Representação da Escala Expandida do Estado de Incapacidade (EDSS) (Kurtzke, 1983).

1.1.5 Diagnóstico

Visto que lesões desmielinizantes no SNC não são exclusivas da EM, podendo ser observadas em outros quadros patológicos que afetam o SNC e ainda a existência de uma variedade de quadros clínicos da doença o diagnóstico torna-se complexo. Devido a isso, em 2010, o Departamento Científico de Neuroimunologia da Academia Brasileira de Neurologia propõe a adoção dos critérios firmados pelo painel internacional de diagnóstico da EM, de McDonald e colaboradores em 2001 e revisados em 2005 e 2010 (POHLMAN et. al., 2011).

Tais critérios são baseados fundamentalmente no quadro clínico e nas imagens de Ressonância Magnética (RM) do cérebro e medula espinhal, podendo-se obter o diagnóstico da EM já na primeira manifestação da doença, desde que haja lesões desmielinizantes em estágios diferentes de evolução. Recentemente, a busca de autoanticorpos contra a mielina também tem sido uma forma de diagnóstico para a EM. Lima e colaboradores (2008) identificaram a presença de anticorpos anti-mielínicos através da técnica de imunofluorescência indireta em amostras de medula espinhal de pacientes com EM.

Embora ainda não existam anticorpos circulantes específicos da EM aceitos para a análise laboratorial, a detecção de bandas oligoclonais de IgG constitui o biomarcador mais sensível do ponto de vista bioquímico para o diagnóstico da doença (IMRELL et al., 2009; BRANDÃO et al; 2005; BRANDLE et al; 2016; HALBGEBAUER et al; 2016). Análises do líquido céfalo-raquídeo (LCR) de portadores de EM que incluem citologia, função da BHE e síntese intratecal de IgG é considerada protocolo padrão durante o diagnóstico/ prognóstico da EM, segundo o Comitê Europeu de Luta Contra a EM. (ANDERSON et al., 1994; DECKER et al; 2016). A síntese Intratecal de IgG, que tem sido associada à traços discretos de banda oligoclonal de imunoglobulina tipo G, não é detectável no soro de indivíduos saudáveis. A presença de duas bandas no LCR de um indivíduo já é recurso suficiente para indicar síntese de IgG no SNC, sendo portanto, um dos critérios para o diagnóstico da EM, juntamente com as evidências clínicas e imagiológicas (LINK e HUANG, 2006; LOURENÇO et al; 2012; BAKSHI, et al; 2015).

Gerwien e colaboradores (2016) ao analisar a influência das gelatinase A/ MMP-2 e gelatinase B/ MMP-9 no desenvolvimento dos sintomas de um modelo animal da EM, desenvolveram um método de imagem molecular para visualização da atividade de MMP no cérebro. Para isso, foram utilizados inibidores de MMP marcados com fluorescência e radioatividade (MMPis) e um ligante de MMP radioativo para imagem de tomografia para análise da atividade de MMP em pacientes com EM. Em contraste com a RM tradicional com contraste de T1 e gadolínio, o método possibilitou o rastreamento da atividade de MMP como característica única de lesões precoces e infiltração de leucócitos em curso no SNC através da BHE. Sendo assim, torna-se possível o monitoramento do desenvolvimento da EM e o fornecimento de um meio sensível e não invasivo de seguir a formação e resolução de lesões em modelos animais da EM e na sua forma humana.

A busca por moléculas com aplicabilidade diagnóstica, prognóstica e de monitoramento, chamados biomarcadores, tem instigado a ciência atual, pois permitem o desenvolvimento de terapias específicas direcionadas à patogênese do processo a nível molecular (BIELENKOVA e MARTIN, 2004). A identificação de biomarcadores específicos para a EM pode tornar o seu diagnóstico mais simples e direto. (FOSSEY et al., 2007; BRANDLE et al; 2016).

1.1.6 Tratamento

Os tratamentos atuais contra a EM são capazes de diminuir as taxas de recaídas em pacientes com a forma RR, apesar da ação de alguns destes não ser efetiva após anos de utilização. Já as formas progressivas da doença apresentam limitações tanto no número quanto na eficácia de medicamentos para o tratamento. Em virtude disso, novos medicamentos são ainda necessários para efetivamente tratar os pacientes com EM (MAHAD et al., 2015).

Os medicamentos hoje utilizados possuem a capacidade de atingir as células imunes autorreativas e os seus produtos, evitando os danos aos tecidos do paciente através da modulação da inflamação, porém, como um dos efeitos colaterais potenciais, destaca-se a imunossupressão, o que pode ainda levar ao aumento na incidência de infecções e tumores (KATSARA et al., 2008; FARJAN et al., 2015). Tais compostos são conhecidos como agentes modificadores da doença, e são aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA), sendo classificados como imunomoduladores ou imunossupressores, administrados de acordo com a fase e a progressão da doença (FOX, 2004).

Os pacientes que se apresentam em recaída da doença, geralmente, são tratados com corticosteroides, via intravenosa, ou injeções do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH, *do inglês*, adrenocorticotropic hormone), o qual é produzido e secretado pela adenohipófise e estimula a região cortical das suprarrenais a secretar glicorticoides. Apesar dos mesmos serem eficazes na redução do tempo de recaída dos pacientes, não exibem efeitos neuroprotetores em longo prazo (VOGEL et al., 2013, DIEBOLD et al., 2016).

As opções de agentes modificadores da doença incluem os tipos de interferon, o acetato de glatirâmer, anticorpos monoclonais e moduladores de receptores de esfingosina-1-fosfato (**Figura 5**). Estas terapias reduziram significativamente o número de ataques e progressão da doença, apesar de que os tipos de interferon são eficazes nas fases de recaídas precoces da EM, mas não nas fases avançadas da doença. Em última análise, a indução da tolerância contra autoantígenos e o restabelecimento da homeostase da imunidade pode eficazmente "curar" a doença; tais estratégias têm sido o foco de pesquisas recentes (INGLESE et al., 2015).

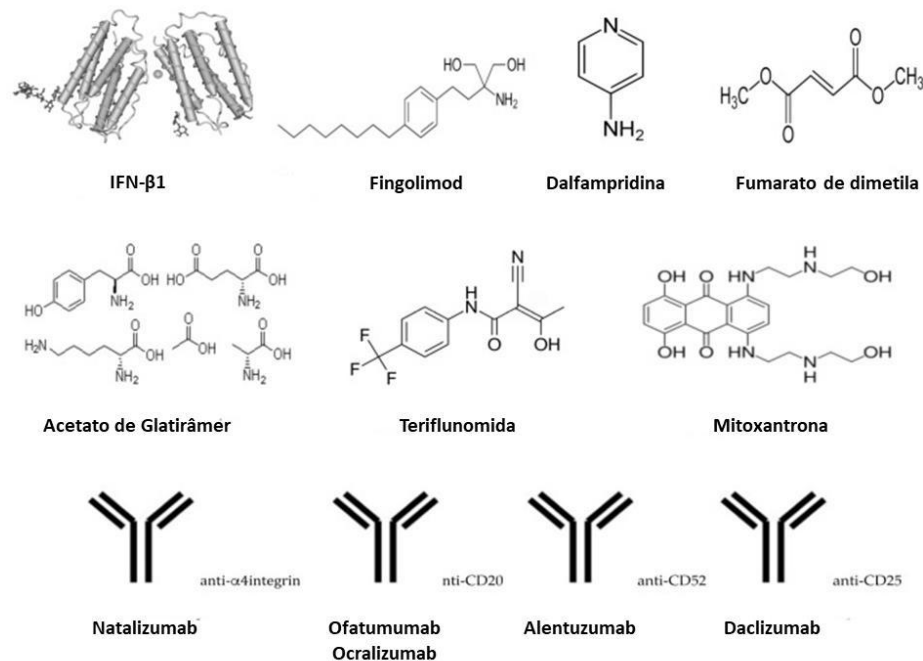


Figura 5 - Estruturas químicas dos tratamentos/medicamentos para EM (adaptado de Dargahi et al., 2017).

A descoberta do primeiro IFN-β, em 1993, permitiu o surgimento da terapêutica modificadora da doença, permitindo focar o tratamento na prevenção de novos surtos e na diminuição da progressão de incapacidade (RÍO, et al. 2011). Atualmente, as terapêuticas de primeira linha, aprovadas pela Agência Médica Europeia (EMA, *do inglês*, European Medical Agency) para o tratamento de EM do tipo RR, incluem as três apresentações farmacológicas de IFN-β (IFN-β-1b, Betaferon/Extavia; IFN-β-1a, Avonex; IFN-β-1a, Rebif) e o acetato de glatirâmer (Copaxone).

O IFN-β é produzido principalmente pelos fibroblastos, mas outras células como NK (*do inglês*, *Natural Killers*), células B, células T e macrófagos também possuem a capacidade de sua secreção. O IFN-β tem atividade antiviral e antitumoral bem como sendo eficaz na redução da taxa de recaída em pacientes com EM (SHIRANI et al., 2012). O mecanismo pelo qual o IFN-β atua equilibra a expressão de citocinas pró e anti-inflamatórias no SNC e na diminuição do número de células inflamatórias que atravessam a BHE. Como consequência de seu uso, observa-se a diminuição da inflamação neuronal, aumento dos fatores de crescimento e sobrevivência neuronal. Além disso, o IFN-β reduz a população de células Th17 e

citocina IL-17, a qual é conhecida por estar envolvida na imunopatologia da EM (MITSDOERFFER et al., 2009).

Apesar do impacto do IFN- β na progressão da doença em pacientes com EM, existem limitações em seu uso, como efeitos colaterais que variam desde dores corporais locais, reações cutâneas (inchaço, vermelhidão), febre, mialgia, sintomas semelhantes a gripe até efeitos colaterais mais graves, como pensamentos suicidas, alucinações, convulsões, problemas cardíacos e hepáticos. Como resultado, muitos pacientes interrompem o tratamento e, em geral, o benefício do uso de IFNs é relativamente pequeno (KATSARA et al. 2008).

O acetato de Glatirâmer (AG) é um peptídeo sintético (ácido L-glutâmico, lisina, alanina e tirosina) que mimetiza a MBP e, assim, compete com peptídeos de MBP antigênicos curtos ao serem reconhecidos pelo MHC de classe II. AG desvia o perfil de células Th1 para o perfil Th2, o qual suprime respostas inflamatórias e ativa células T regulatórias na periferia (HASS et al., 2009). As injeções de AG em pacientes podem ocasionar efeitos colaterais brandos (febre, calafrios) e mais graves (cardiovascular, digestivo, problemas musculares e respiratórios).

O fumarato de dimetila (BG-12) é um éster metílico do ácido fumárico que modula as respostas imunes. Foi aprovado pela FDA em 2013 e atua reduzindo a migração de células inflamatórias através da BHE e na regulação de proteínas antioxidativas que protegem as células contra o dano oxidativo e inflamação. Os efeitos colaterais do BG-12 incluem diarreia, dor abdominal, náuseas, alteração em enzimas hepáticas e diminuição da contagem de linfócitos (MOHARREGH-KHIABANI et al., 2009; ALBRECHT et al., 2012).

A teriflunomida é um metabolito ativo da leflunomida (uma modificação imunossupressora de um composto usada para o tratamento da artrite reumatoide) que inibe a enzima dihidroorotato-desidrogenase (PALMER et al, 2010), inibindo assim, a proliferação de células B e T. Além disso, a teriflunomida exerce propriedades anti-inflamatórias por inibição de células T produtoras de IFN- γ , importante ativador de respostas imunes, enquanto as células T produtoras de citocinas anti- inflamatórias, como IL-4 e IL-10 não são afetadas (KORN et al, 2004). Os efeitos colaterais incluem: redução da contagem de glóbulos brancos, alopecia, efeitos hepáticos, náuseas, diarreia, entorpecimento na mão e nos pés, reações alérgicas, problemas de respiração e aumento da pressão arterial. Teriflunomida foi

aprovado pela FDA em 2012, e pela EMA em 2013 para uso em pacientes com EM na forma RR.

A mitoxantrona é usada principalmente para tratar certos tipos de câncer, em particular, o Linfoma não-Hodgkin, a Leucemia Mieloide Aguda, câncer de mama e próstata. Mitoxantrona é um inibidor da enzima topoisomerase do tipo II, que interrompe a síntese e o reparo do DNA em células cancerosas, no entanto, as células normais também são afetadas. É um potente supressor imunológico, suprimindo células T, células B e macrófagos, reduzindo as citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ , TNF- α e IL-2) (LENK et al., 1987; HUANG et al., 2012). No entanto, vários efeitos secundários estão associados ao seu uso, que variam de náuseas, vômitos, perda de cabelo, cardiotoxicidade, leucemia, infertilidade, infecções, leucopenia e trombocitopenia (ECKSTEIN et al., 2016). Como resultado, seu uso tem sido significativamente reduzido ao longo do tempo. Além disso, devido ao risco de cardiotoxicidade e leucemia, existe um limite na dose acumulativa a ser administrada aos pacientes (MARTINELLI et al., 2009).

Em 1989, Fujita e colaboradores, isolaram o ISP-1 (miriocina), um metabólito do caldo do fungo *Isaria sinclairii* (HIROSE et al, 1996). Estes autores descreveram a atividade imunossupressora deste composto, que era cinco vezes mais potente e menos tóxico que a ciclosporina A, já utilizada em transplantes (FUJITA et al, 1995-A). Eles trabalharam a relação estrutura-atividade deste composto e concluíram que era necessária a inclusão de um grupo aminoálcool 2- alquil-2- aminoetanol (ADACHI et al, 1995). Também destacaram a necessidade de uma cadeia longa para a manutenção da atividade lipofílica e com isso desenvolveram a síntese do composto FTY720- Fingolimode {Cloridrato de 2- amino-2-[2-(4- octifenil)etil]1,3-propanodiol} (FUJITA, 1995-B), composto este que se encontra disponível no mercado com o nome comercial de Gylenia, fabricado pelo Laboratório Novartis (**Figura 6**).

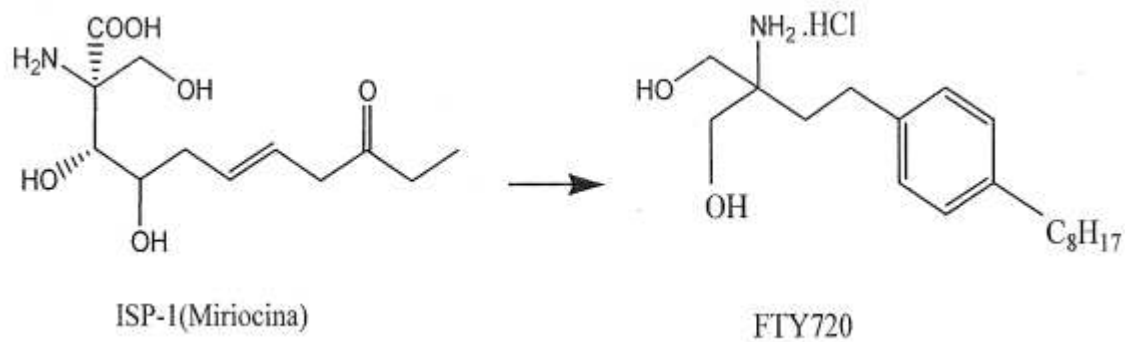


Figura 6 - Estruturas químicas do ISP-1 (miriocina) e o composto FTY720 (Fonte: DEL OLMO et al., 2006).

Fingolimod recebeu aprovação da FDA em 2010, sendo considerado a primeira terapia oral (0,5 mg uma vez ao dia) disponível para pacientes com formas recidivantes de EM. Fingolimod é um modulador do receptor fosfato de esfingosina- 1 (S1P), atuando como um superagonista do mesmo causando a sua internalização em leucócitos, levando à infiltração reduzida de linfócitos potencialmente autorreativos no SNC, os quais permanecem localizados nos linfonodos (BRINKMANN et al., 2002; MATLOUBIAN et al., 2004). Além disso, um benefício secundário do uso de Fingolimod é sua atuação em receptores S1P em células da glia no SNC, levando à ativação de cascatas de sinalização relacionadas a S1P dentro do SNC, reduzindo os processos de desmielinização, perda axonal e astrogliose (BRINKMANN et al., 2002; CHOI et al., 2011).

Com base em ensaios clínicos envolvendo pacientes com EM em sua forma RR, Fingolimod foi mais eficaz em comparação ao tratamento com IFN β -1a ou placebo, reduzindo a frequência de surtos (exacerbações clínicas), progressão da incapacidade, medidas de resultado de imagens de RM, incluindo perda de volume cerebral. Mais de 180 mil pacientes foram tratados com Fingolimod em ensaios clínicos e os efeitos adversos de seu uso incluem bradicardia (dentro das 6 h após a iniciação do tratamento), visão turva, diarreia, dores nas costas, dor de cabeça, tosse e vômitos. Com dados razoáveis mostrando sua segurança em longo prazo e melhora da doença, Fingolimod é uma excelente escolha para pacientes com EM em fase ativa e quem prefere a opção de tratamento oral (COHEN et al., 2010; CALABRESI et al., 2014).

Embora, o tratamento com Fingolimod tenha obtido resultados significativos na redução dos sinais clínicos da EM em pacientes com a forma RR, o custo deste tratamento torna-se um grande agravante para os pacientes. A dose indicada do FTY720 é de uma cápsula de 0,5 mg diariamente, porém, atualmente, 28 cápsulas deste medicamento é comercializada com uma variação de 7.000 a 10.000,00.

No Brasil, o Ministério da Saúde aprovou em 02 de abril de 2018, o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Esclerose Múltipla com o objetivo de regulamentar os critérios de inclusão de pacientes com EM aos tratamentos disponibilizados pelo Sistema Único de Saúde (SUS). De acordo com este Protocolo, a estratégia terapêutica para a EM está dividida em quatro linhas. A primeira linha constituída pelos medicamentos IFN- β , acetato de glatirâmer ou teriflunomida. A segunda linha por IFN- β , acetato de glatirâmer, teriflunomida, fumarato de dimetila ou finglimode. A terceira linha é composta pelo fingolimode, caso já não tenha sido utilizado em linhas anteriores e por fim, a quarta linha, composta pelo anticorpo monoclonal natalizumabe.

Atualmente, os anticorpos monoclonais têm se somado às terapias utilizadas para o tratamento da EM, uma vez que os mesmos apresentam ações mais específicas em células imunes, o que de certa forma, reduz os efeitos colaterais para o paciente. O Natalizumab é um anticorpo monoclonal humanizado contra a molécula de adesão celular α 4-integrina. As integrinas são receptores transmembranares que permitem a adesão célula-matriz extracelular, ativando sinalização celular que regula o crescimento, divisão, sobrevivência, diferenciação e migração celular. As integrinas são expressas em células T, células B, monócitos, macrófagos, células NK, células dendríticas (CDs), neutrófilos e eosinófilos. Interferir ou bloquear a α 4-integrina afeta a migração de células imunes através BHE, assim, bloqueando a interação entre a integrina α 4 e a molécula de adesão vascular endotelial-1 (VCAM-1), inibindo a migração transendotelial para o SNC (Sheremata et al., 2005). Natalizumab é administrado intravenosamente uma vez por mês (RICE et al., 2005) e reduz as células T ativadas no SNC, resultando em respostas anti-inflamatórias e, portanto, efeitos neuroprotetores (YONG et al., 2007).

Como efeitos adversos de seu uso, em 2004, após a sua aprovação pela FDA, foram relatados alguns casos de infecção cerebral rara relacionada à leucoencefalopatia multifocal progressiva, a qual pode ocasionar incapacidade e morte, levando à retirada do medicamento do mercado. Em 2006, após sua

reintrodução, um número maior de casos de infecções cerebrais ocorreu no ano de 2012. Apesar desses relatórios, a FDA não retirou o Natalizumab do mercado, pois os benefícios clínicos superam os riscos envolvidos. Outros efeitos colaterais incluem hepatotoxicidade, reações alérgicas e maiores riscos de infecção. Devido a riscos relacionados ao Natalizumab, existem resistências quanto à sua utilização como opção de tratamento preferencial (DARGAHI et al., 2017).

O Ofatumumab (OMB157) é o primeiro anticorpo monoclonal de IgG1 kappa do tipo 1 (IgG1 κ) totalmente humano e atualmente está licenciado para o tratamento de pacientes com leucemia linfocítica crônica (Intravenosamente, Arzerra®). Também mostrou ser benéfico para pacientes com artrite reumatóide, linfoma folicular não-Hodgkin, linfoma difuso de células B e EM. Sua ação é exercida como bloqueador da molécula CD20, a qual é marcadora de superfície em células B, incluindo as autorreativas. Células B atuam como reguladoras da resposta imune, ativando células TCD4⁺, através da secreção de citocinas e anticorpos (SORENSEN et al., 2014). Outros anticorpos monoclonais também atuam como anti-CD20, como o Rituximab (HAUSER et al., 2008) e Ocrelizumab (KAPPOS et al., 2011). OMB157 tem sido bem tolerado por 90% dos pacientes com EM, embora os mesmos ainda estejam na fase de teste.

Em março de 2017, a FDA aprovou o uso de um novo anticorpo monoclonal para o tratamento da EM, em sua forma primária-progressiva, sendo assim, a primeira droga aprovada para esta forma da doença. Testes clínicos conduzidos para determinar a segurança de Ocrelizumab em pacientes jovem com EM, houve maior risco de surgimento de tumores e efeitos na gravidez (estudo permanecerá até 2024) (FDA, 2017).

Alemtuzumab é um anticorpo monoclonal humanizado anti-CD52, uma molécula de superfície celular expressa em células B e T, células NK maduras, plasmócitos, neutrófilos e, o mais importante, células tronco-hematopoiéticas não expressam CD52, sendo, portanto, não afetadas por esta terapia. Alemtuzumab pode causar efeitos colaterais graves, incluindo trombocitopenia imune, problemas renais, dificuldade em respirar, inchaço, dor no peito, frequência cardíaca irregular, certos tipos de câncer (leucemias e tireoide), citopenia e infecções graves. Foi aprovado pela FDA em 2014 para ser usado em pacientes com EM, em sua forma RR, mas devido aos eventos adversos frequentes e significativos de alemtuzumab, geralmente é

usado em pacientes que usaram 2 ou mais terapias sem êxito (COLES et al., 2012; COHEN et al., 2012).

Daclizumab é um anticorpo monoclonal humanizado anti-CD25, contra o receptor de IL-2 expresso na superfície das células T. O mecanismo pelo qual o Daclizumab funciona é através do bloqueio do receptor de IL-2 em células T, impedindo a ativação das mesmas. Foi originalmente aprovado pelo FDA em 1997 na prevenção de transplantes agudos de rim (juntamente com corticosteróides e ciclosporina), porém o uso foi interrompido devido à baixa demanda no mercado. Recentemente, tem sido utilizado para o tratamento da EM e os efeitos colaterais associados ao Daclizumab são relativamente menores em comparação aos outros (LYCKE et al., 2015).

Por fim, a Dalfampridina, a qual não pretende atrasar os sintomas ou alterar o curso da doença, mas sim, melhorar os sintomas motores, como a caminhada. Dalfampridina é um bloqueador de canais de potássio, resultando em correntes de potássio melhoradas e condutância nervosa. Dalfampridina foi aprovada pela FDA em 2010 e os efeitos colaterais comuns incluem náuseas, nervosismo e tonturas, que são relativamente menores em comparação com outras drogas de EM (DARGAHI, et al., 2017).

Portanto, uma série de opções de tratamento já está disponível para pacientes com EM, em particular aqueles com a forma ativa da doença, no entanto devido a um conjunto de efeitos colaterais, eficácia limitada em longo prazo e incapacidade de reverter a doença, novas opções de tratamento são ainda necessárias. Novos candidatos terapêuticos promissores estão se tornando disponíveis, embora as eficácias em ensaios clínicos humanos continuem a serem determinadas. Recentemente, estudos utilizando células-tronco em lesões do SNC (McALLISTER et al., 1997), vacinas de DNA para tolerização de pacientes contra peptídeos mielínicos (KANG et al., 2012), uso de nanopartículas carreadoras de moléculas anti-inflamatórias destinadas aos sítios inflamatórios (XIANG et al., 2010), entre outros, podem abrir caminhos para desenvolvimento de imunoterapias alternativas e mais eficazes para a EM. Com a multiplicidade de informações sobre a imunopatofisiologia da EM e a disponibilidade de novos tratamentos, o tratamento da doença apresenta assim, um futuro promissor (YANNAKAKIS, et al., 2017).

1.2 A Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE)

1.2.1 Conceito e histórico

O estudo da EM, em humanos, é restrito devido à inacessibilidade ao SNC do paciente, sendo assim, apenas constituintes do sangue periférico, fluido cerebrospinal (FCE) e tecido *post-mortem* têm sido utilizados nos estudos. Clinicamente, a ressonância magnética (RM) é a técnica não invasiva de escolha que fornece informações mais específicas sobre o processo da doença em pacientes com EM. No entanto, para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos em doenças humanas, modelos animais são necessários por proporcionarem possibilidades de novos estudos, como por exemplo, a manipulação genética através de linhagens transgênicas e *knockout*, e também a transferência de células manipuladas entre animais. Portanto, o uso de ferramentas moleculares, de imagem, imunológicas, histopatológicas e terapêuticas em modelos animais da EM auxilia no conhecimento imunogenético da doença (KRISHNAMOORTHY, et al 2009; PEÓN et al., 2017).

A Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE), o primeiro modelo para EM, foi descrito pela primeira vez por Thomas Rivers em 1933 (RIVERS, et al. 1933). Nesse trabalho, macacos *Rhesus* passaram pela indução da EAE recebendo injeções de extrato de cérebros de coelhos e desenvolveram sinais clínicos associados ao SNC, apresentando reações inflamatórias acompanhadas de desmielinização perivascular no mesencéfalo, medula e cerebelo.

Atualmente, existem vários modelos de EAE, que diferem de acordo com as linhagens de animais, os quais são principalmente roedores e os tipos de antígenos utilizados para a indução. Estes modelos mimetizam as formas clínicas desenvolvidas também na EM (**Tabela 1**).

Tabela 1 Fenótipos clínicos dos modelos animais de EAE (adaptado de Weiner et.al., 2009).

LINHAGEM	INDUÇÃO	TIPO DE DOENÇA
C57BL/6	MOG	Remitente-recorrente
SJL/J	PLP	Remitente-recorrente
NOD	MOG	Crônica Progressiva
MOG TCR Tg X MOG BCR Tg	MOG	Doença de Devic (Krishnamoorthy et al., 2006)
MOG TCR Tg (SJL/J)	MOG	Remitente-recorrente (Pollinger et al., 2009)
C57BL/6	Monócitos	Progressiva
SJL/J	Virus de Theiler	Recorrente/Progressiva
Ratos Lewis	MBP	Recorrente Aguda ADEM

Cada modelo de indução da EAE pode diferir na sensibilidade, curso clínico e patologia, que são determinados pela linhagem utilizada, espécie, idade, sexo, antígeno, dose e via de administração (KRISHNAMOORTH, et al. 2009). Clinicamente, a EAE clássica induzida ativamente por imunização ou por transferência adotiva de células mielino-reativas é caracterizada por um quadro de paralisia ascendente que se inicia com a perda do tônus da cauda e, em seguida da cauda em direção à cabeça do animal, o que gera fraqueza e paralisia dos membros, a qual está associada a um processo inflamatório na medula espinhal. Adicionalmente, os fenótipos de EAE não clássicos ou atípicos têm sido descritos em alguns modelos animais caracterizados por ataxia e incapacidade de andar em linha reta (WENSKY et. al., 2005).

O método mais comum utilizado para induzir a EAE é a imunização ativa. Os animais são imunizados subcutaneamente com proteínas mielínicas encefalitogênicas ou peptídeos, na presença do adjuvante completo de Freund (CFA, *do inglês* Complete Freund's Adjuvant), composto de óleo mineral e *Mycobacterium tuberculosis* cepa H37RA morta por calor para impulsionar a resposta imune inata e facilitar a liberação gradual e constante do antígeno nos gânglios linfáticos. Além disso, a toxina *pertussis* é aplicada pela via intraperitoneal para promover o acesso das células T específicas à mielina ao SNC (RACKE et. al., 2005; MO et al., 2008).

Nos animais da linhagem C57BL/6, o agravamento dos sinais clínicos da doença, caracterizado pela pontuação no score clínico da doença, inicia-se por volta do 14º dia pós-imunização (dpi), desenvolvendo o pico da doença, por volta do 18º dpi

e a remissão total, por volta do 28º dpi, ao passo que os camundongos SJL/j apresentam cinética inicial com evolução progressiva no segundo mês pós-imunização. Vale ressaltar, portanto, que a EAE, assim como a EM, depende de fatores genéticos, como os genes relacionados ao MHC.

Alguns trabalhos procuram investigar os fenômenos de iniciação e de transmigração celular durante a EAE. Os mais importantes até agora estudados são dependentes de moléculas de adesão como as selectinas (E-, P-, L- selectinas) e as interações de integrinas (VLA-4, *do inglês* Very Late Antigen-4 e LFA-1, *do inglês* Lymphocyte function-associated antigen 1). A toxina da bactéria *Bordetella pertussis* aplicada durante a imunização auxilia na promoção da infiltração celular para o SNC através de um mecanismo que envolve a ativação de células endoteliais que compõem a BHE através do TLR4 (*do inglês* Toll-like Receptor-4), o que induz alta expressão de P-selectinas, facilitando a transmigração de células para o SNC (revisado por RACKE et. al., 2005; MOHAJERI et al., 2015).

1.2.2 Aspectos imunológicos da EAE e EM

A EM e a EAE são exemplos de doenças autoimunes resultantes da quebra da tolerância imunológica. O estado de homeostase do organismo é mantido através da capacidade em se distinguir antígenos próprios (*self*) dos não próprios (*non-self*), sendo esse processo denominado Tolerância Imunológica ou Autotolerância, a qual é mantida em células T ou B imunocompetentes por mecanismos centrais e periféricos. A quebra da tolerância imunológica seja por fatores genéticos ou por fatores ambientais, já mencionados, resulta na perda da capacidade da distinção entre antígenos próprios e não próprios pelas células imunes, podendo ocasionar respostas exacerbadas contra antígenos próprios caracterizando a *Autoimunidade* (ERCOLINI, et al. 2009).

Atualmente sabe-se que a patogenia envolvida nas doenças é complexa, e que vários tipos celulares contribuem para o processo patológico, mesmo que de forma indireta.

As células imunes que residem no SNC são ativadas na presença de danos aos tecidos do SNC. Já é conhecido que, nessas condições, células microgliais aumentam os níveis de expressão de MHC classe I e II, moléculas co-estimulatórias de células T (CD4 e CD8), células B, monócitos, macrófagos e células dendríticas (HEMMER, *et al.* 2006) Tais células infiltrantes secretam citocinas pró-inflamatórias, óxido nítrico e MMP (TABARKIEWICZ, *et al.* 2015; VAN HAMBURG, *et al.* 2011) levando à destruição da bainha de mielina (**Figura 7**).

Acredita-se que a inflamação crônica é a marca registrada de doenças neurodegenerativas como a EM, doença de Alzheimer e doença de Parkinson (HEMMER, *et al.* 2006; SOSPEDRA e MARTIN, 2005). Células T autorreativas à mielina atravessam a BHE e sua migração para o SNC consequentemente inicia uma cascata inflamatória seguida de desmielinização do SNC e danos axonais. As lesões de EM aparecem na substância branca dentro do neurônio visual, gânglios basais, tronco cerebral e medula espinhal (MÜNDEL e WILLIAMS; 2013).

As células descritas abaixo, as quais são envolvidas no processo inflamatório são integrantes tanto da imunidade inata, quanto da adquirida.

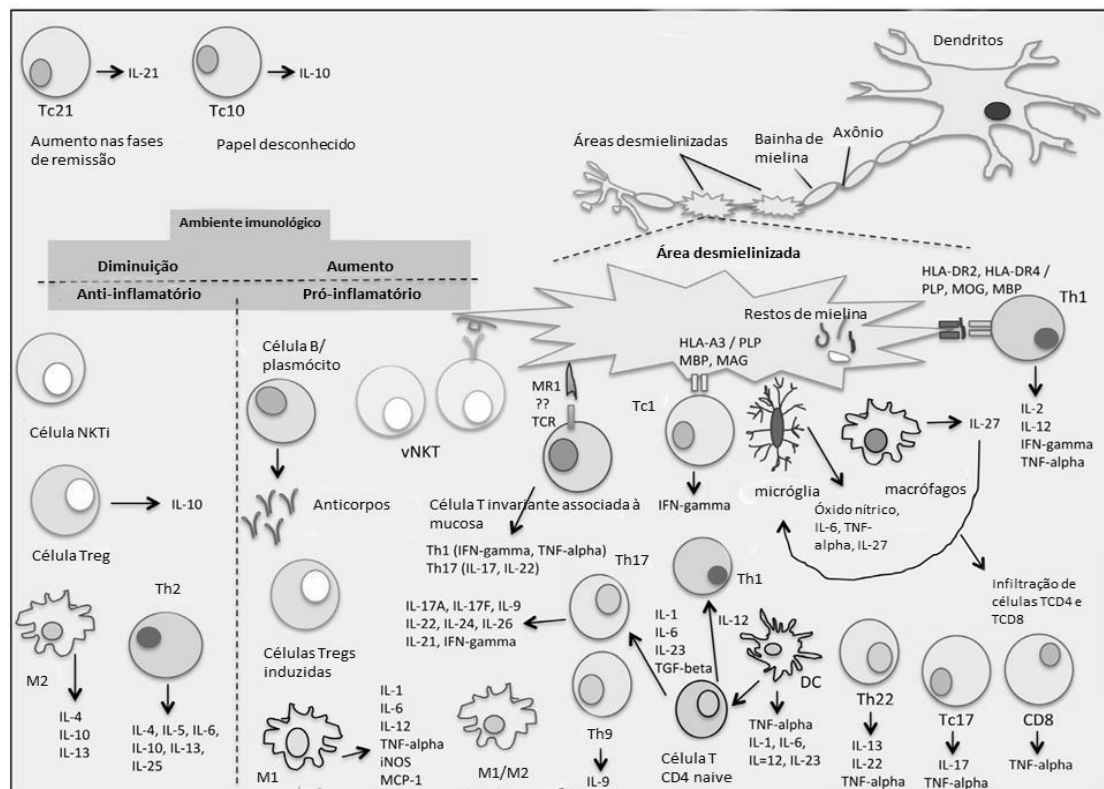


Figura 7 – A complexidade imunológica do ambiente de células imunes e citocinas na EM (adaptado de Dargahi *et al.*, 2017).

Macrófagos e Micróglia

Os macrófagos são células que comumente estão sendo divididos em dois distintos fenótipos, M1 ou M2 com base no fenótipo de secreção de citocinas pró ou anti-inflamatórias. Estes fenótipos representam extremos de um extenso painel de fenótipos. O fenótipo M1 conhecido como classicamente ativado, em camundongos, apresenta como marcadores de superfície principais F4/80⁺, CD11b⁺, CD11c⁺, iNOS⁺ e em humanos CD40⁺, CD86⁺, CD64⁺, CD32⁺. É induzido na presença de IFN- γ e/ou ligantes de receptor do tipo Toll like (TLR) tais como os lipopolissacarídeos (LPS). O perfil M1 caracteriza-se ainda por ser pró-inflamatório devido a secreção de citocinas como IL-1, IL-6, IL-12, TNF- α , iNOS e quimiocina CCL2 (MOSSER e EDWARDS, 2008). O fenótipo de macrófagos M2, conhecido como alternativamente ativado, em camundongos apresenta como principais marcadores de superfície F4/80⁺, CD11c⁻, CD301⁺, Arg1⁺, CD206⁺ e em humanos CD163⁺, CD206⁺, sendo induzido na presença de IL-4, IL-10, IL-13 e Arginase 1 que bloqueiam a atividade iNOS (MOSSER e EDWARDS, 2008).

O perfil M2 já se caracteriza como anti-inflamatório devido à secreção do antagonista do receptor de IL-1, de IL-4, IL-10, TGF- β . Macrófagos desempenham um papel crucial na patogênese da EM, uma vez que em lesões desmielinizantes ativas, os macrófagos são altamente presentes em comparação com aquelas inativas ou remielinizadas (BRUCK et al., 1996). Assim como os macrófagos, as células da micróglia são divididas em micróglia polarizada em perfis M1 e M2. As células de micróglia M1 são pró-inflamatórias e expressam CD40, CD74, CD86 e CCR7, enquanto que, as células de micróglia M2 são anti-inflamatórias e expressam o receptor de manose (CD206) e CCL22. Curiosamente, em um modelo EAE foi mostrado que a supressão de CCL22 diminuiu a infiltração de macrófagos M1 no SNC. Sendo assim, terapias concebidas para suprimir CCL22 têm o potencial de diminuir a desmielinização e a progressão da doença. Além disso, em ratos, as células de micróglia M1 sofreram polarização para células de micróglia M2 durante o processo de remielinização, portanto, a polarização para o perfil M2 é necessária para a remielinização eficiente (MIRON et al., 2013).

Astrócitos

Os astrócitos, outro tipo de célula da glia, compõem uma grande fração de células no cérebro dos mamíferos (HERCULANO-HOUZEL et al., 2014). As principais funções dos astrócitos incluem a regulação da homeostase iônica, contribuição para o metabolismo do SNC e a formação da BHE (SOFRONIEW e VINTERS, 2010). Além disso, já foi demonstrado que astrócitos de roedores regulam positivamente sua expressão de MHC-II, após tratamento com IFN- γ *in vitro* (ZEINSTRA, et al., 2003) e têm a capacidade de processar e apresentar antígenos mielínicos como os peptídeos PLP, MBP e MOG, induzindo células T efetoras a diferenciação e proliferação *in vitro* (CARPENTIER et al., 2005). Embora o papel dos astrócitos no desenvolvimento da autoimunidade no SNC ainda não seja bem compreendido, acredita-se que essas células possam agir dependendo da fase da doença. Em teoria, os astrócitos poderiam contribuir para a infiltração de células T e para o recrutamento mais efetivo de APCs, pois estimularem o aumento da expressão de moléculas de adesão e quimiocinas (BARRES, 2008). Em uma segunda etapa, os astrócitos poderiam então obter um fenótipo de APCs secretando citocinas efetoras, como o IFN- γ , que são importantes para a regulação positiva do processo neuroinflamatório (SOFRONIEW e VINTERS, 2010). Brosnan e Raine (2013) mostraram que a ativação dos astrócitos perivascularres pode levar à inibição de suas funções ligadas à formação da BHE, quebrando a ligação entre a vasculatura sanguínea e as necessidades neuronais.

Células T helper

Células TCD4⁺ ou células T *helper* (Th), reconhecem peptídeos curtos de 9-17 aminoácidos apresentados na superfície das células apresentadoras de antígeno (APC). Células Th podem exibir perfis distintos, os quais se relacionam aos perfis de secreção de citocinas no momento da apresentação antigênica (APOSTOLOPOULOS et al., 2016). As células Th1 são pró-inflamatórias e produzem altos níveis de IL-2, IL-12, TNF- α e IFN- γ ; as células Th2 são anti-inflamatórias e secretam IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-25; as células Th17 são pró-inflamatórias e secretam altos níveis de IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, IL-24, IL-26 e baixos níveis de IL-9 e IFN- γ ; células Th22, que são uma combinação do fenótipo Th1, Th2, Th17, secretam IL-13, IL-22 e TNF- α

e a nova adição ao subconjunto Th, Th9 foi identificada pela sua potente secreção de IL-9. Th1, Th9 e células Th17 são contribuintes importantes para a EM, aumentando a inflamação no SNC.

As células Th1 e suas citocinas pró-inflamatórias estão presentes em níveis elevados dentro de lesões desmielinizantes no SNC de humanos e em modelos animais de EAE induzidos por MOG, PLP ou MBP. As células Th1 reconhecem os epítomos dos peptídeos MOG, PLP e MBP apresentados no contexto da classe MHC II, HLA-DRB1*1501 (HLA-DR2, HLA-DR15) e alelos HLA-DRB1*04 (HLA-DR4). Algumas terapias farmacológicas visam modular o complexo do receptor MHC de classe II-peptídeo-T (TCR) na tentativa de desviar respostas Th1 para respostas Th2 terapêuticas. Foi mostrado recentemente que a injeção de fumarato de dimetil em pacientes com EM reduziu as células Th1, Th17 e CD8 e aumentou células Th2, resultando em níveis elevados de IL-4 e níveis diminuídos de IFN- γ e IL-17 (WU et al., 2017).

O papel das células Th9 na EM não é tão claro, embora em camundongos, as células Th9 secretoras de IL-9 tenham tido participação na patogenia da EAE, enquanto camundongos *knock-out* para IL-9 mostraram-se mais resistentes ao desenvolvimento de EAE (DENG et al., 2017).

As células Th17 desempenham um papel crucial na patogênese da EM em camundongos e humanos induzindo o processo inflamatório observado na doença. Já é notório que a citocina IL-17A é presente em níveis elevados em lesões do SNC, líquido cefalorraquidiano e no soro de pacientes com EM (VOLPE et al., 2015). As células Th17 expressam níveis elevados de CCR6 que se liga ao ligante CCL20 em células endoteliais vasculares, permitindo a sua entrada através da BHE, onde secretam citocinas pró-inflamatórias incluindo IL-17A. Além disso, a IL-17 interfere no processo de remielinação. O anticorpo monoclonal neutralizante humanizado anti-IL-17A (AIN457 ou Secukinumab) injetado em pacientes com EM mostrou redução de lesões no SNC em comparação com indivíduos tratados com placebo (VOLPE et al., 2015). Além disso, células Th22 estão altamente presentes no sangue periférico e no líquido cefalorraquidiano de pacientes em fase ativa da doença. Além disso, as células Th22 reconhecem especificamente o MBP e são resistentes à terapia com IFN- β (ROLLA et al., 2014).

A IL-27, membro da família de citocinas IL-6 e IL-12, é secretada por macrófagos, células dendríticas e micróglia, com papéis pleiotrópicos na

imunomodulação sendo pró ou anti-inflamatória. IL-27 pode estimular ou inibir a diferenciação de células T. As células Th1 são induzidas por IL-27 enquanto que Th2, Th17 e Treg são inibidas pela IL-27. Além disso, as células T regulatórias do tipo 1 (Tr1) são um subconjunto especializado de células T, cuja secreção de IL-10 é induzida na presença de IL-27 (IWASAKI et al., 2015). IL-27 e o seu receptor IL-27R estão altamente expressos em lesões cerebrais *pós-mortem* de EM em comparação com cérebros de indivíduos controles. Macrófagos e micróglia foram já identificados como fontes de IL-27 e desencadeadores da infiltração de TCD4 e TCD8 no SNC (SENECAL et al., 2016). Além disso, os efeitos da IL-27 em células de micróglia mostraram que o óxido nítrico, TNF- α e IL-6 foram secretados, promovendo a polarização para o perfil Th1, sugerindo que a IL-27 potencializa a neuroinflamação induzida por micróglia. Assim, a supressão de IL-27 pode ser uma estratégia para modular respostas inflamatórias em pacientes com EM (KAWANOKUCHI et al., 2013).

Células TCD8

As células TCD8 clássicas ou células T citotóxicas (células Tc1) reconhecem epítopos antigênicos apresentados na superfície de APC através da molécula de MHC classe I. Em EM, há uma associação genética com HLA-A3 (SAWCER et al., 2012); HLA-A2 demonstrou reduzir o risco da EM em indivíduos que também expressam o MHC classe II, HLA-DRB1*1501. A especificidade antigênica das células TCD8 (Tc1) isoladas de pacientes com EM contra antígenos derivados de MOG, MBP e PLP apresentou atividade citolítica contra células neuronais *in vitro* (DRESSEL et al., 1997), embora o seu papel patogênico na EM ainda não seja claro. Mais recentemente, outros subconjuntos de células TCD8 foram identificados e agrupados em diferentes subconjuntos baseados em seu perfil de secreção de citocinas. Como tais, as células Tc1 clássicas secretam IFN- γ , Tc2 secretam IL-4, Tc10 secretam IL-10, Tc17 secretam IL-17, Tc21 secretam IL-21, Tc22 secretam IL-22 e outro subconjunto é caracterizado secretando TNF- α . Em EM, independentemente do estágio e atividade da doença, células T CD8 são observadas em números elevados, muito superiores às células T CD4 numa proporção de 10 células TCD8 : 1 células TCD4.

A molécula de MHC de classe I é altamente expressa em lesões de EM em astrocitos, oligodendrócitos, neurônios, além das APC clássicas, DCs e macrófagos. Células TCD8 também são encontradas em grande abundância nos tecidos de SNC e líquido cefalorraquidiano de pacientes com EM. Foi verificado que células TCD8 presentes em lesões de EM agudas e crônicas secretam altos níveis de IL-17 (classificadas como células TCD8/Tc17) (TZARTOS et al., 2008). As células Tc17 secretam IL-17 e TNF- α e baixos níveis de IFN- γ , sendo negativas para granzima B, perforina e atividade citolítica ao contrário das células CD8 Tc1 clássicas (SALEHI et al., 2016). Fica claro, portanto, que as células T CD8 contribuem para a patogênese da EM.

Sendo assim, torna-se importante o entendimento de como tais células escapam da tolerância das células T e induzem a autoimunidade do SNC em para posteriormente projetar e desenvolver novas terapêuticas contra a EM.

Células B

Embora exista uma presença de células T em lesões de EM, as células B também contribuem para a patogênese da doença através da secreção de autoanticorpos e citocinas, além de funcionarem como APC e participarem da ativação de células T. Em pacientes com EM a presença de bandas oligoclonais (BOC) no líquido cefalorraquidiano e parênquima cerebral é constantemente encontrado em mais de 95% dos pacientes. BOC é um produto de células B expandidas clonalmente e síntese da imunoglobulina IgG, a qual é um dos isotipos dos anticorpos conhecidos e comum em autoanticorpos contra a mielina. Os autoanticorpos anti-MOG são característicos da EM, bem como de alguns pacientes com neuromielite, uma desordem de espectro óptico. Logo, a ativação anormal das células B no SNC dos pacientes com MS, sugere que as células B desempenham um papel na fisiopatologia da doença. Estudos adicionais são necessários para verificar se a depleção de células B autorreativas é capaz de restaurar a função imune e, portanto, ser usado como um alvo terapêutico contra EM (revisado por DARGAHI et al., 2017).

Células Dendríticas

Células dendríticas (CDs) são APC profissionais que processam e apresentam epítopos de peptídeos antigênicos em sua superfície em complexo com MHC classe I ou classe II, resultando na estimulação de células TCD4 ou CD8, respectivamente. Embora a EM seja geralmente associada a uma predominância de células T autorreativas, evidências indicam que as CDs desempenham um papel importante na fisiopatologia da EM, principalmente devido a sua propriedade de secreção de citocinas e ativação de células T. Após a ativação de CDs na periferia, células T específicas para os epítopos de mielina são ativadas liberando citocinas pró-inflamatórias que auxiliam a entrada das mesmas através da BHE no SNC. Ao chegarem ao SNC, APCs residentes, como as células microgliais reativam tais células T, levando a desmielinização de neurônios e déficits motores.

Em pacientes com EM, as CDs estão abundantemente presentes dentro de lesões inflamatórias, líquido cefalorraquidiano e na circulação, produzindo altos níveis de TNF- α , IFN- γ e IL-6. Além disso, a expressão de moléculas co-estimulatórias como CD40 e CD80 em CDs, as quais são necessárias para a ativação de células T, são aumentadas em pacientes com EM, sugerindo um estado pró-inflamatório ativado de CDs, daí o seu papel contributivo na patogênese da EM (HUANG et al., 1999)

Células T regulatórias

As células T regulatórias (Tregs, originalmente conhecidas como células T supressoras) são um subconjunto de células T CD4⁺ que atuam na modulação da imunidade, manutenção do estado de tolerância contra autoantígenos e prevenção da autoimunidade. Tregs são caracterizados principalmente como CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ e são células anti-inflamatórias (secretam IL-10). Uma das primeiras evidências do papel das células Treg na EM ocorreu em trabalhos envolvendo modelos de EAE em camundongos, onde a transferência adotiva de Treg de camundongos de controle em camundongos induzidos para EAE com MOG ou PLP preveniu o início e a progressão da EAE nestes animais (KOHM et al., 2012; ZHANG et al., 2004).

Além disso, a indução de células Treg por estradiol ou por monócitos sob o tratamento com acetato de glatiramer reduziram os sinais clínicos de EAE induzida por MOG (MATEJUK et al., 2004; WEBER et al., 2007). Foi verificado ainda que a

injeção do anticorpo monoclonal anti-CD28 em ratos Lewis resultou na expansão de células Treg na EAE e redução da gravidade da doença, uma vez que esta molécula coestimulatória é necessária para atuação de células T efetoras (BEYERSDORF et al., 2005).

Curiosamente, a injeção de anticorpo monoclonal anti-CD25, que bloqueia os efeitos das células Treg em camundongos C57BL/6, aumentou a suscetibilidade à indução EAE (MCGEACHY et al., 2005). Em pacientes com EM, no entanto, a frequência de células Treg CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ não é diferente daquelas em indivíduos saudáveis, embora a função dessas células seja prejudicada (maturação e migração). Além disso, os níveis de expressão do mRNA para a síntese da proteína de Foxp3 estão baixos em células Treg de pacientes com EM, especialmente na forma remitente-recorrente da doença, o que pode causar transtornos no funcionamento dessa célula (ZOZULYA et al., 2008).

Estudos sobre células Treg na EM podem ajudar na compreensão da razão da quebra da tolerância, levando à doença. No entanto, não está claro se a função prejudicada das células Treg é uma causa direta da EM ou se essa deficiência é um resultado geral para todos os distúrbios autoimunes.

1.3 Cascata de sinalização da proteína Akt (PKB)

1.3.1 Caracterização histórica da Akt (PKB)

As proteínas quinases fazem parte de uma rede complexa de proteínas que constituem as células, atuando como “sensores” na percepção do meio extracelular e assim, possibilitando respostas a este, e ainda atuando na propagação da transdução de sinais intracelulares. A Akt é uma proteína quinase que está envolvida na via de sinalização PI3K/AKT/mTOR, entre outras.

As pesquisas envolvendo a Akt iniciaram-se quando da descoberta de um vírus mutante relacionado à leucemia em camundongos (STAAL, et 1977). Tal vírus, encontrado em abundância em linfomas espontâneos, apresentava a capacidade de estimular a formação de focos malignos em linhagens celulares, sendo denominado de Akt8. Staal e colaboradores (1977) ainda mostraram que Akt8 expressava oncogenes para o desenvolvimento de tumores de timo.

Coffer, Woodgett e colaboradores (1991) identificaram os genes correspondentes a Akt e descreveram o clone Akt1 ou isoforma PKB α (ORCY, et al. 2008). A semelhança entre a sequência de Akt e as proteínas da família quinase A e C (PKA e PKC) foi identificada por Jones e colaboradores, sendo denominada Rac, enquanto Coffer e Woodgett a nomearam de PKB (proteína quinase B), e outros autores a denominaram de Akt. As três denominações são encontradas na literatura, mas o termo Akt/PKB adquiriu um consenso maior entre os pesquisadores (ORCY, et al. 2008).

A segunda isoforma de Akt foi descrita ainda em 1991 por Jones e colaboradores. Atualmente, são conhecidas três isoformas diferentes em mamíferos, denominadas como Akt1/PKB α , Akt2/PKB β , Akt3/PKB γ (ORCY, et al. 2008). Essas isoformas apresentam 85% de similaridade em suas sequências e arranjos estruturais semelhantes, divididos em: domínio N-terminal PH, o qual é essencial para a ligação das proteínas a lipídeos como o fosfatidilinositol-trifosfato (PIP3), um fosfolipídio de membrana plasmática (FAYARD et al., 2005); um domínio central quinase; e outro regulatório C-terminal que apresenta uma região hidrofóbica (ORCY, et al. 2008). Todas as três isoformas de Akt/PKB possuem resíduos conservados de serina e treonina que, juntos com o domínio PH, são cruciais para a ativação de PKB.

1.3.2 Funções fisiológicas da Akt (PKB)

O papel fisiológico das isoformas de Akt tem sido demonstrado por meio de manipulação genética em camundongos, os quais propiciam o estudo das funções da Akt/PKB *in vivo*. Vários camundongos transgênicos expressando altos níveis de Akt, sob condições controles, têm sido produzidos em laboratório, permitindo, assim, constatar que um dos maiores papéis da Akt está relacionado com o crescimento celular: o aumento da expressão de Akt/PKB causa hipertrofia e aumento da contratilidade cardíaca, progressão de alguns tipos de tumores, como o linfoma de células T, hiperplasia, hipertrofia, aumento da produção de insulina pelas células β -pancreáticas e desenvolvimento de glândulas mamárias durante a gravidez (ORCY, et al. 2008).

Estudos desenvolvidos em animais *knockout* para os genes das isoformas de Akt/PKB mostraram que a ausência da isoforma Akt1/PKB α relacionou-se com

mortalidade neonatal, bem como retardo no desenvolvimento embrionário devido a defeitos no desenvolvimento placentário. Além disso, já foi identificado que esta isoforma é a mais predominante entre os tecidos (KANDEL e HAY, 1999). Já a ausência da isoforma Akt2/PKB β relacionou-se à resistência a insulina, de forma similar ao observado no quadro de diabetes mellitus tipo 2, além disso, retardo no crescimento corporal e perda de tecido adiposo de forma idade-dependente também foram observados (ORCY, et al. 2008). Analisando-se a expressão da terceira isoforma Akt3/PKB γ , os camundongos *knockout* apresentaram uma redução de 20 a 25% da massa cerebral, o que se deve a uma diminuição do tamanho e número de células deste tecido (FAYARD et al, 2005).

1.3.3 Sinalização da via *upstream* da Akt (PKB)

1.3.3.1 Ativação de fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K)

A função da cascata de sinalização da Akt ficou evidente após o estudo das enzimas PI3K. Esta enzima pode ser ativada por receptores de tirosina quinase (CARPENTER et., 1990), os quais sofrem autofosforilação após a ligação a fatores de crescimento como, por exemplo, a insulina e também, por receptores acoplados à proteína-G após a ligação do ácido lisofosfatídico e quimiocinas (ZANGH et al., 2011).

As enzimas PI3K são membros de uma família bem conservada e única de quinases intracelulares que fosforilam o grupo 3'-hidroxila de fosfatidilinositol e fosfoinosítídeos. Estas enzimas encontradas em mamíferos são classificadas em classes I, II e III, sendo que a classe I é subdivida em subclasses A e B. As diferentes classes possuem funções distintas na sinalização celular e levam à ativação de várias vias de sinalização que regulam o metabolismo, sobrevivência, crescimento e diferenciação celular, bem como o tráfego de vesículas intracelulares (ORCY et al., 2008; BACKER 2016).

São conhecidos oito membros da família PI3K, os quais foram classificados em três grupos com base na sua sequência primária, preferência de substrato *in vitro*, estrutura do domínio e modo de regulação. A classe I das PI3Ks é composta por dois subgrupos, IA e IB (MAIRA et al., 2008). As enzimas PI3K de classe IA consistem de

três unidades catalíticas, p110 α , p110 β e p110 δ , as quais formam heterodímeros com um dos cinco domínios regulatórios p85 α , p85 β , p85 γ , p50 α e p55 α , enquanto a subclasse IB consiste de um membro, um heterodímero de p110 γ e um domínio regulatório denominado p101, que é ativado pelas subunidades $\beta\gamma$ da proteína-G após a estimulação dos receptores acoplados à proteína G (GARCIA-ECHEVERRIA et al., 2008; OKKENHAUG et al., 2016).

Embora todas as isoformas das PI3Ks da classe I sejam expressas de forma ubíqua, a PI3K γ (que possui como unidade catalítica a p110 γ) é somente detectada no sistema imune, cardiovascular e no SNC. Devido a sua localização neuronal, sugere-se que tal quinase apresenta um papel específico no SNC. No entanto, as funções centrais de PI3K γ ainda são pouco estudadas (HAWKINS et al., 2006).

A enzimas PI3K de classe II apresentam três subunidades catalíticas C2 α , C2 β e C2 γ , as quais ainda apresentam papel desconhecido. A classe III de PI3K consiste de uma subunidade catalítica (Vps34) e uma regulatória (Vps15/p150), que estão relacionadas ao tráfego de vesículas no meio intracelular (GARCIA-ECHEVERRIA et al., 2008; BACKER 2016).

As isoformas catalíticas de classe I (p110 α , β , γ e δ codificadas por PIK3CA, PIK3CB, PIK3CG e PIK3CD) possuem a capacidade de catalisar a fosforilação de fosfatidilinositol- 4,5 (PIP2, *do inglês*, phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate) para gerar fosfatidilinositol-3,4,5 (PIP3, *do inglês*, phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate). Esta fosforilação gera o recrutamento de proteínas citoplasmáticas para locais específicos da membrana plasmática ou da endomembrana, uma vez que se origina um domínio nestes fosfolípidos, o qual permite a associação do domínio PH de tais proteínas. Em células normais, PIP3 é induzido de forma transitória pela estimulação de fatores de crescimento e é rapidamente metabolizado por fosfatases lipídicas, incluindo o supressor de tumores PTEN (*do inglês*, phosphatase and tensin homolog) que termina a sinalização PI3K através da remoção do 3'-fosfato de PIP3 (LAWRENCE et al., 2014).

Estudos mostram que muitos tipos de câncer apresentam perda de função de PTEN, o que eleva a abundância basal de PIP3. Em uma meta-análise de estudos de sequenciamento do genoma do câncer, o gene PTEN foi o terceiro mais altamente mutado em câncer humano (LAWRENCE et al., 2014).

A ativação da Akt *in vivo* é precedida por um aumento na fosforilação de resíduos de serina 473 (S473) e treonina 308 (T308). Quando esses dois aminoácidos apresentam-se mutados, a ativação da quinase é bloqueada (KANDEL et al. 1999).

Para que ocorra a fosforilação do resíduo treonina 308 é necessário que Akt, por intermédio de seu domínio PH, ligue-se a PIP3 de membrana. A fosforilação de PIP3 causa a ativação da enzima quinase PDK1 (*do inglês*, 3-phosphoinositide-dependent protein kinase- 1). A translocação de Akt para a membrana plasmática permite, dessa forma, maior interação com PDK1 e conseqüentemente, fosforilação de T308.

Com relação à fosforilação de S473, não há consenso na literatura sobre a quinase responsável pelo processo. Recentemente, a molécula mTOR (*do inglês*, mammalian target of rapamycin) tem sido o candidato alvo desta fosforilação, uma vez que esta molécula possui papel serina-treonina quinase formando dois complexos celulares conhecidos como mTORC1 e mTORC2, com composição de subunidades distintas e seletividade de substrato (SAXTON E SABATINI, 2017). A fosforilação de S473 é um passo chave na ativação de Akt, permitindo sua reestruturação para um estado mais estável e sua transição para o citoplasma ou núcleo celular (ORCY et al., 2008).

1.3.4 Sinalização da via *downstream* da Akt (PKB)

Estudos têm se preocupado em elucidar o papel de Akt. Procura-se identificar substratos fisiológicos que participam do processo da fosforilação da cascata e que regulam a função de proteínas celulares envolvidas no metabolismo, sobrevivência/apoptose, diferenciação e proliferação celular (ORCY et al., 2008).

1.3.4.1 Regulação da sobrevivência e proliferação celular estimulada por Akt (PKB)

A cascata de sinalização Akt é uma das mais importantes vias de regulação da sobrevivência celular e sua ativação permite que células com sinal de sobrevivência possam se opor a estímulos apoptóticos. A Akt possui efeitos diretos na via de apoptose celular, uma vez que possui a capacidade de se ligar a um membro

da família Bcl-2, chamado BAD (*do inglês*, Bcl-2-associated death promoter). A proteína BAD desfosforilada liga-se a Bcl-2 e Bcl-x, levando ao efeito pró-apoptótico destas, enquanto, a fosforilação de BAD pela Akt deixa Bcl-2 livre para inibir a apoptose, sendo assim, a fosforilação de BAD via Akt é, portanto, anti-apoptótica (ORCY et al., 2008).

1.3.4.2 Regulação do crescimento e metabolismo celular estimulado por Akt (PKB)

A cascata de sinalização Akt também está envolvida com o crescimento e aumento de volume celular, algo comum em células tumorais. A via mTOR aumenta diretamente a síntese proteica, metabolismo e ciclo celular, sendo apontada como responsável pela multiplicação celular. Em condições de restrição de nutrientes ou em presença de supressores tumorais, como os conhecidos hamartin (TSC-1) e tuberin (TSC-2), ocorre a atenuação de mTOR. A via Akt possui a capacidade de ativar mTOR através da fosforilação e inativação de TSC-2 (ORCY et al., 2008).

Com relação à importância da Akt no metabolismo celular, pode-se perceber sua atuação na fosforilação e inibição de GSK3 (*glicogênio sintetase cinase*), a qual possui papel de inibir a síntese de glicogênio. Logo, ao inibir a ação de GSK3, Akt favorece o estoque de glicose e síntese de glicogênio. Já foi observada a ocorrência deste processo em situações de níveis aumentados de insulina no sangue (ORCY et al., 2008).

O processo descrito acima se apresenta esquematizado na figura adaptada de Nitulescu e colaboradores (2015) (**Figura 8**).

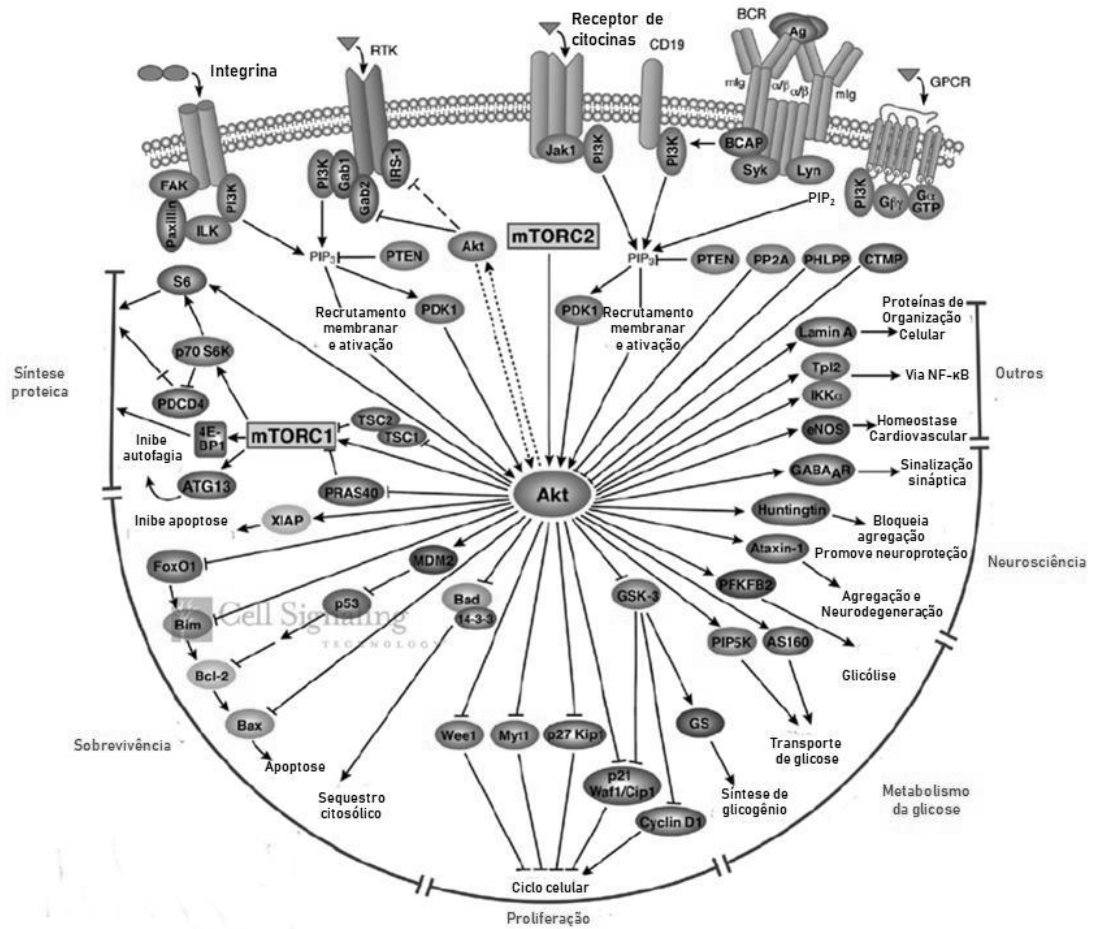


Figura 8 - Esquema da via de sinalização de Akt/mTOR através da ativação de PI3K e efetores downstream. (adaptado de Nitulescu et al., 2015).

1.3.4.3 A via NF- κ B estimulada por Akt (PKB)

O fator de transcrição NF- κ B (*do inglês*, transcription nuclear fator- κ B) é um importante regulador de respostas imunes, podendo sua desregulação provocar respostas autoimunes e alguns tipos de cânceres. O NF- κ B normalmente apresenta-se ligado ao seu inibidor, chamado I κ B, o qual é fosforilado por uma proteína quinase, a I κ B quinase (IKK) estimulada via Akt. Esta fosforilação resulta na dissociação de I κ B de NF- κ B. Uma vez livre, NF- κ B transloca-se para o núcleo ativando a expressão de pelo menos 150 genes; alguns dos quais são anti-apoptóticos e outros relacionados à produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-6 e IFN- γ (ORCY et al., 2008). (**Figura 9**).

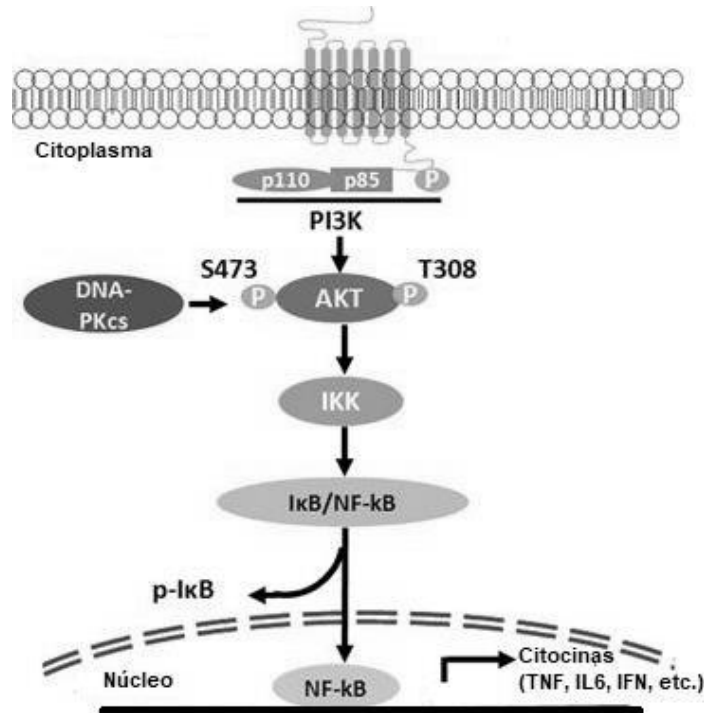


Figura 9 - Via clássica de ativação de NF-κB (adaptado de Xi et al., 2016).

1.3.4.4 A via Akt (PKB) na EM e EAE

Apesar de ainda existirem poucos trabalhos que se preocupam em analisar a influência da via Akt/PKB no desenvolvimento da EM e/ou seu modelo animal mais amplamente usado, a EAE, já é conhecido que a classe IA de PI3K (PI3KC) atua na promoção de respostas Th17 durante o desenvolvimento da EAE (HAYLOCK-JACOBS, et al. 2011). Ao contrário das outras duas isoformas da classe I de PI3K que são essenciais para o desenvolvimento celular geral do organismo (PI3KCA e PI3KCB) (BI, et al., 2002), PI3KCD e PI3KCG não são essenciais para o desenvolvimento e exibem um padrão restrito de expressão, principalmente confinada às células do sistema imunológico, onde contribuem para o controle da ativação e migração de leucócitos.

A isoforma PI3KCG (PI3K γ), por exemplo, regula a migração de diferentes populações de células, como neutrófilos, macrófagos, CDs e células T (DEL PRETE, et al., 2004; REIF, et al. 2004) Thomas e colaboradores (2008) mostraram a influência de PI3K γ na regulação da migração de células TCD4 efectoras antígeno-específicas para sítios inflamatórios *in vivo*. Somado a isso, a migração de células Th17 em

resposta a agonistas dos receptores CCR2 e CCR6 foram considerados dependentes de PI3K (WEBB, et al., 2008).

Já é notório, que na ausência da expressão de PI3K γ , os sinais clínicos da EAE tornam-se adiados e atenuados. Em animais deficientes em PI3K γ , células T CD4⁺ mielino-específicas apareceram tardiamente em órgãos linfoides secundários e no SNC, em relação aos grupos controles. A ocorrência da transferência de células TCD4⁺ provenientes de animais selvagens para PI3K γ ^{-/-}, antes da imunização com MOG₃₅₋₅₅, restaurou a severidade da EAE aos níveis dos animais selvagens, apoiando a relevância da expressão de PI3K γ em células Th para a patogênese de EAE. Ainda, a redução do número de células T autorreativas no SNC em animais PI3K γ ^{-/-} durante o desenvolvimento da EAE e número significativo de células apoptóticas no SNC desses animais, aliados a outros fatores, poderiam apontar o motivo do atraso e redução dos sinais clínicos da doença (RODRIGUES, et al., 2010; BEROD, et al., 2011; COMERFORD, et al., 2012).

Embora estes achados tenham demonstrado participação de PI3K γ no desenvolvimento de inflamação de caráter autoimune no SNC, a investigação do efeito da eliminação de PI3K γ nos mecanismos imunológicos e fisiopatológicos no curso de doenças crônicas como a EAE fazem-se cada vez mais necessários, uma vez que PI3K γ está envolvida em outras doenças inflamatórias como asma (DOUKAS, et al., 2009), artrite reumatoide (HAYER, et al., 2009), alergia (THOMAS, et al., 2009), lúpus eritematoso sistêmico (BARBER, et al., 2005) e pancreatite (LUPIA, et al., 2004).

Os estudos atuais que visam investigar o papel da PI3K γ no desenvolvimento de doenças inflamatórias têm se preocupado ainda em verificar a influência de compostos moduladores ou inibidores da via de sinalização PI3K-Akt/PKB no curso e progressão destas patologias. Dois conhecidos compostos considerados importantes no bloqueio da ativação da via são a Wortmanina e o LY294002.

A Wortmanina, um metabólito fúngico descoberto em 1987, foi o primeiro a inibir uma resposta celular após estimulação de receptores *in vivo*. A sua utilização possibilita a convergência entre dois sistemas de sinalização celular: o de receptores acoplados a proteína G e os de tirosina-quinase (UI, et al., 1995).

Em concentração nanomolar, Wortmanina é considerada um potente inibidor de fosfatidilinositol 3-quinase, e tem sido utilizada amplamente para demonstrar o papel de PI3K em diversos processos de transdução de sinal (WYMAN et al., 1996).

O LY294002, também conhecido como 2-(4-morfolinil)-8-fenil-4H-1-benzopirano-4-ona, demonstrou ser um inibidor seletivo da enzima PI3K *in vivo*. Vlahos e colaboradores (1994) já haviam demonstrado seu efeito na inibição de PI3K em neutrófilos humanos e células musculares lisas de segmento aórtico de coelhos. Brunn e colaboradores (1996) em um de seus ensaios mostraram que o composto LY294002 apresentou-se como alvo do domínio catalítico de mTOR em concentração necessária para a inibição da via PI3K em mamíferos.

O composto FTY720, também conhecido como fingolimod, é um composto sintético produzido por modificação de um metabólito fúngico de *Isaria sinclairii*, a miriocina (PAUGH et al., 2003). Esta droga seletivamente reduz o número de linfócitos na circulação periférica e prolonga significativamente a sobrevivência dos órgãos transplantados sem prejuízo da resposta imune contra vírus e da memória imunológica (ZHANG et al. 2013). Devido a estas propriedades, FTY720 foi aprovado pela FDA dos Estados Unidos como primeiro tratamento oral da EM. Além de seu poderoso efeito imunossupressor, um grande número de estudos tem mostrado que FTY720 é capaz de atravessar a BHE (YEH e WEINSTOCK-GUTTMAN 2011) desencadeando efeitos neuroprotetores no SNC em vários modelos de lesões neurológicas.

Zhang e colaboradores (2014) utilizando linhagens celulares de glioblastoma humano para avaliar os efeitos de FTY720, identificaram que este composto significativamente inibiu a migração e a invasão de células de glioblastoma. Os efeitos anti-migração e invasão do FTY720 foram associados à sua atividade em reduzir a expressão MMP-2 e MMP-9, enquanto observou-se regulação positiva de inibidores de MMP (TIMP-1) e TIMP-2. Por fim, os autores demonstraram que os efeitos observados na migração e invasão de células de glioblastoma após a utilização de FTY720 estavam relacionados à inibição da via de sinalização PI3K/ Akt.

Em outro trabalho, Zhan e colaboradores (2015) investigaram o papel do FTY720 em um modelo animal de injúria traumática cerebral (ITC). Foi demonstrado que a administração de FTY720 após a ITC melhorou a função neurocomportamental, reduziu o edema cerebral, através da modulação de indicadores apoptóticos como Bcl-2, Bcl-xL, Bax e citocromo c. Neste modelo, FTY720 aumentou a expressão de Akt e alguns marcadores de autofagia como LC3 e Beclina 1. Além disso, o efeito de inibição da apoptose via FTY720 foi parcialmente revogado pelo inibidor da via PI3K/AKT, LY294002. Dessa forma, pode-se perceber que FTY720 exerceu efeitos

neuroprotetores após a ITC através da ativação da via PI3K/Akt, inibindo a apoptose neuronal, mas em linhagens de glioblastoma, o mesmo foi capaz de inibir o eixo PI3K/Akt, culminando com menor migração e invasão das células tumorais.

A utilização do FTY720 no tratamento da EM e EAE, como já foi dito, ocorre devido à modulação do receptor fosfato de esfingosina- 1 (S1P) em órgãos linfoides secundários, levando à infiltração reduzida de linfócitos autorreativos no SNC, os quais permanecem localizados nos linfonodos. Porém, são poucos os trabalhos que procuram investigar a atuação deste composto na via de sinalização PI3K/Akt no modelo de EAE induzido pela injeção de MOG₃₅₋₅₅.

Hou e colaboradores (2015) mostraram em seu trabalho que o tratamento com FTY720 foi capaz de reverter o aumento de células Th1, os altos níveis de expressão de RNAm para o fator de transcrição Tbet, relacionado à diferenciação de células Th1, e ainda a produção de IFN- γ por esplenócitos *in vitro*, em modelo de EAE induzido com MOG₃₅₋₅₅. Além disso, o tratamento com FTY720 foi capaz de inibir o eixo Akt-mTOR, também em esplenócitos *in vitro*. Porém, a análise da atuação deste composto na via de sinalização PI3K/Akt no SNC faz-se necessário, pois dessa forma, seria possível a compreensão de um novo mecanismo de atuação deste tratamento e ainda, poderia servir como base para futuras terapias que visem atuações nesta via.

A lipofilicidade é uma característica importante para a atividade de uma substância por promover maior difusão através das membranas biológicas aumentando assim a concentração intracelular do composto (POLKOWSKI et al., 2004). Com isso, novos aminoalcoois lipofílicos têm sido descritos como uma classe promissora de compostos com diferentes propriedades farmacológicas (TIMMONS e LI, 2006), antiparasitárias (GIORDANI et al., 2008), antimicrobianas (TAVEIRA et al., 2007) e imunomoduladoras (Del OLMO et al., 2006). Estes trabalhos despertaram o interesse em avaliar a atividade anti-inflamatória de aminoalcoois lipofílicos de cadeia alifática longa, assim como a relação estrutura-atividade baseada em modificações estruturais. O análogo utilizado neste estudo trata-se de um destes aminoalcoois lipofílicos e possui uma porção alifática análoga ao composto FTY720.

Por fim, este trabalho busca ampliar a compreensão dos mecanismos envolvidos na ação terapêutica do FTY720 e ainda verificar a eficácia de seu análogo, o que poderia inclusive, apontar os mesmos como possíveis agentes terapêuticos em outras

patologias influenciadas pela via de sinalização PI3K/Akt e ainda indicar a regulação desta via para o controle de tais patologias.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o papel da isoforma gama da enzima fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K γ), no desenvolvimento da resposta imune no modelo de encefalomielite autoimune experimental e ainda, se a inibição desta via contribui de forma neuroprotetora na doença.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a evolução do quadro de sintomas da EAE, através do escore clínico em animais WT e PI3K^{-/-};
- Avaliar o infiltrado celular e o processo de desmielinização no cérebro e medula espinhal, através da histopatologia, nos dias 14 e 21 após a indução da EAE em animais WT e PI3K^{-/-};
- Avaliar os níveis de citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ , IL-6, IL-17, TGF- β), quimiocinas (CCL5 e CCL20) e a citocina anti-inflamatória IL-10 em homogenatos de cérebro, medula espinhal e linfonodos inguinais, através da técnica de ELISA, nos dias 14 e 21 após a indução da EAE em animais WT e PI3K^{-/-};
- Avaliar a morte celular programada em células no SNC, através da técnica de TUNEL, nos dias 14 e 21 após a indução da EAE em animais WT e PI3K^{-/-};
- Avaliar a proliferação microglial e astrocitária no SNC, através da técnica de Imunofluorescência, nos dias 14 e 21 após a indução da EAE WT e PI3K^{-/-};

- Avaliar parâmetros clínicos e neuroinflamatórios da EAE perante o tratamento com FTY720 ou seu análogo mais lipofílico a partir do início do desenvolvimento dos sinais clínicos da doença.
- Avaliar a fosforilação de Akt na medula espinhal após o tratamento com FTY720 ou seu análogo mais lipofílico a partir do início do desenvolvimento dos sinais clínicos da doença.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Camundongos fêmeas WT e PI3K γ ^{-/-} da linhagem C57BL/6, com 6 a 8 semanas de idade, foram gentilmente cedidos pelo Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Os animais PI3K γ ^{-/-} foram fornecidos pelo professor Mauro Martins Teixeira. A deleção genética de PI3K γ foi confirmada pela técnica de PCR usando os *primers* específicos (WT *primers*: sense, 5-TCAGGCTCGGAGATTAGGTA-3, antisense, GCCCAATCGGTGGTAGAACT-3; PI3K γ *primers*: sense, 5-GGACACGGCTTTGATTACAATC-3, antisense, 5-GGGGTGGGATTAGATAAATG-3), como descrito em SASAKI et al., 2000. Os camundongos PI3K γ ^{-/-} são homozigotos, saudáveis e férteis. Todos os animais foram mantidos em gaiolas com microisoladores no Centro de Tecnologia Celular e Imunologia Aplicada (IMUNOCET) da Universidade Federal de Juiz de Fora. Todos os procedimentos estão de acordo com os princípios do Código Brasileiro para o Uso de Animais de Laboratório. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética para o uso de animais de laboratório da UFJF (Protocolo número 019/2018).

3.2 Tratamentos

Os tratamentos utilizados neste estudo foram o composto FTY720 (Sigma) e um análogo lipofílico. O análogo trata-se de um aminoálcool lipofílico, que foi sintetizado no Departamento de Química, no Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Juiz de Fora, como descrito por Reis e colaboradores (2013). A síntese deste composto iniciou-se com a mesilação dos álcoois **1a** e **1b** em piridina a 0° C, formando os intermediários **2a** e **2b** (**Figura 10**). Os compostos mesilados **2a** e **2b** foram tratados com azida de sódio em DMF (dimetilformamida) a 120°C, levando as monoazidas **3a** e **3b**, que foram hidrogenadas resultando nos aminoalcoois **4a** e **4b**. Os compostos foram purificados e caracterizados pela espectroscopia de Infravermelho e de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio (RMN de ¹H) e de carbono (RMN de ¹³C).

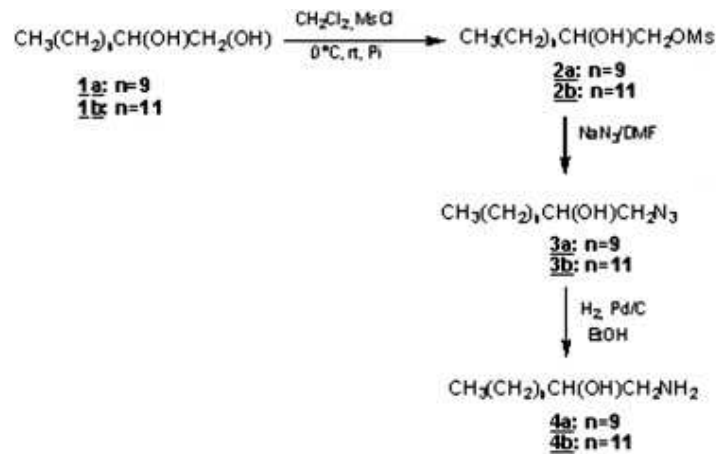


Figura 10 – Síntese dos aminoálcoois lipofílicos (adaptado de Reis et al., 2013).

Reis e colaboradores (2013) mostraram uma redução em torno de 92% da produção de TNF- α (*do inglês*, Tumor Necrosis Factor –Alpha) por macrófagos da linhagem RAW264.7 estimulados por LPS e incubados com o aminoálcool lipofílico **4b**, *in vitro*. Além disso, em um modelo de edema de pata induzido por carragenina em animais da linhagem BALB/c, este composto foi capaz de reduzir o edema e a produção das citocinas TNF- α e IL-1 β nos coxins plantares dos animais de forma similar à dexametasona, tratamento já caracterizado para este modelo. Ainda neste trabalho, o composto **4b** foi capaz de reduzir de forma significativa o edema de pata em um modelo de Hipersensibilidade Tardia induzida por Ovalbumina em animais da linhagem BALB/c. Dessa forma, este aminoálcool lipofílico, análogo ao composto FTY720, que apresentou importantes características anti-inflamatórias tanto *in vitro* como *in vivo*, foi escolhido para este estudo na investigação de um potencial anti-inflamatório no modelo de EAE.

3.3 Delineamento Experimental

Cada animal foi imunizado por via subcutânea (s.c.) em cada lado da região dorsal próxima à base da cauda com 100 μg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅ (Sigma Chemical Co, Saint Louis, USA) emulsionado em Adjuvante Completo de Freund (Sigma) na proporção de 1:1 suplementado com 400 μg de *Mycobacterium tuberculosis* (H37RA; Difco Detroit, USA). No dia da imunização e após 48 horas, cada animal recebeu i.p.

300 ng de toxina *pertussis* (Sigma). Inicialmente, para a análise do efeito do bloqueio genético da enzima PI3K- γ no desenvolvimento da EAE, foi realizada uma cinética da doença envolvendo dois pontos, o 14^o dpi, o qual está relacionado ao início do agravamento dos sinais clínicos e o 21^o dpi, que corresponde ao pico de tal agravamento. Portanto, os animais WT e PI3K- $\gamma^{-/-}$ (KO) foram divididos em quatro grupos experimentais avaliados em dois pontos distintos 14 e 21 dias pós-indução da EAE:

- 1) Controle- WT: Os animais não foram induzidos para a EAE. Nos dias 14 e 21, os camundongos foram eutanasiados e os órgãos foram coletados. n= 20.
- 2) Controle- KO: Os animais não foram induzidos para a EAE. Nos dias 14 e 21, os camundongos foram eutanasiados e os órgãos foram coletados. n= 20.
- 3) WT-EAE: Os animais foram induzidos para a EAE com a utilização do peptídeo MOG₃₅₋₅₅ (s.c.). No dia e 48 horas depois, os animais recebem a toxina Pertussis (i.p.). Nos dias 14 e 21, os animais foram eutanasiados e os órgãos foram coletados. n= 20.
- 4) KO-EAE: Os animais foram induzidos para a EAE com a utilização do peptídeo MOG₃₅₋₅₅ (s.c.). No dia e 48 horas depois, os animais receberam a toxina Pertussis (i.p.). Nos dias 14 e 21, os animais foram eutanasiados e os órgãos foram coletados. n= 20.

Posteriormente, foi avaliado o efeito dos tratamentos com os compostos FTY720 ou seu análogo mais lipofílico na fosforilação de Akt na medula espinhal e também, o efeito dos compostos em parâmetros clínicos e neuroinflamatórios da EAE. Os tratamentos iniciaram-se no 10^o dpi, ponto em que normalmente, começam a serem verificados os sinais clínicos da EAE, e estenderam-se até o 21^o dpi. Para este experimento, animais WT foram divididos em 4 grupos experimentais:

- 1) Controle: Os animais não foram induzidos para a EAE. Do 10^o ao 21 dpi, os animais foram tratados com solução salina, 5mL/Kg/dia, por gavagem. No dia 21, os camundongos foram eutanasiados e os órgãos foram coletados. n= 16.
- 2) EAE: Os animais foram induzidos para a EAE com a utilização do peptídeo MOG₃₅₋₅₅ (s.c.). No dia e 48 horas depois, os animais receberam a toxina

Pertussis (i.p.). Não houve nenhum tratamento neste grupo. No dia 21, os animais foram eutanasiados e os órgãos foram coletados. n= 16.

- 3) EAE- FTY720: Os animais foram induzidos para a EAE com a utilização do peptídeo MOG₃₅₋₅₅ (s.c.). No dia e 48 horas depois, os animais receberam a toxina Pertussis (i.p.). Do 10^o ao 21 dpi, os animais foram tratados com o composto FTY720 diluído em água, 1,0mg/Kg/dia, por gavagem. Nos dias 14 e 21, os animais foram eutanasiados e os órgãos foram coletados. n= 16.
- 4) EAE- Análogo: Os animais foram induzidos para a EAE com a utilização do peptídeo MOG₃₅₋₅₅ (s.c.). No dia e 48 horas depois, os animais receberam a toxina Pertussis (i.p.). Do 10^o ao 21 dpi, os animais foram tratados com o composto análogo diluído em água com 5% de DMSO, 1,0mg/Kg/dia, por gavagem. Nos dias 14 e 21, os animais foram eutanasiados e os órgãos foram coletados. n= 16.

De acordo com a literatura e trabalhos anteriores do nosso grupo, o número mínimo de animais por grupo considerado ideal, com relação às dosagens de citocinas e quimiocinas é de 6 animais e para as análises histológicas são necessários pelo menos 4 animais, por ponto avaliado (DIAS et al., 2018; EVANGELISTA et al., 2016). Para a realização do Western Blotting, 6 animais foram utilizados, por grupo.

3.4 Avaliação clínica

Os animais foram avaliados com relação à incapacidade neurológica gerada pela EAE, através da escala apresentada na tabela 2, conforme adaptada por De Paula e colaboradores (2008).

Tabela 2 Escala de incapacidade neurológica de avaliação da EAE (Adaptada de De Paula et al., 2008)

Parte do corpo	Sinais clínicos	Escore
Cauda	Sem sinais clínicos	0
	Perda do tônus muscular da cauda	1
	Paralisia	2
Membro posterior	Sem sinais clínicos	0
	Fraqueza de uma pata	1
	Fraqueza de ambas as patas	2
	Paralisia de uma pata	3
	Paralisia de ambas as patas	4
Membro anterior	Sem sinais clínicos	0
	Fraqueza da pata	1
	Paralisia da pata	2
Bexiga	Continência	0
	Incontinência	1

3.5 Obtenção de órgãos e células

Nos dias 14 e 21 após a indução da EAE, camundongos foram eutanasiados por dose letal de Xilazina (10 mg/Kg) e Ketamina (150 mg/Kg). Os cérebros, as medulas espinhais e os linfonodos inguinais foram coletados para dosagem de citocinas, quimiocinas e análises histopatológicas, no caso de órgãos de SNC.

3.6 Análise histopatológica

Nos 14^o e 21^o dias após a indução da EAE, animais foram eutanasiados e os cérebros e medulas espinhais foram fixados por perfusão em paraformaldeído 4%. Cortes transversais do cérebro e da medula espinhal nos níveis cervical, torácico e lombar foram processados para inclusão em parafina. Cortes de 5 μ m e 10 μ m foram corados em H&E para avaliar a presença de infiltrados inflamatórios e

corados com Luxol *fast blue*- Cresyl Violeta para avaliar a desmielinização, respectivamente. Uma média de 8 a 12 cortes de cada animal foram examinados em microscópio Olympus BX51 através de uma câmera e documentados em software para aquisição digital das imagens.

A avaliação histológica semiquantitativa do processo inflamatório no cérebro e medula espinhal foi pontuada conforme descrito por Xiao e colaboradores (2015): 0, ausência de infiltrados inflamatórios; 1, celular infiltrar apenas na área perivascular e perimeninges; 2, infiltrado celular discreto no parênquima; 3, infiltrado moderado no parênquima e 4, infiltrado celular intenso no parênquima. Para a avaliação histológica semiquantitativa do processo de desmielinização do cérebro e medula espinhal, o escore de escore descrito por Abdul-Majid e colaboradores (2003) foi utilizado: 1, vestígios de desmielinização perivascular ou subapical; 2, desmielinização perivascular ou subapical sozinha; 4, desmielinização perivascular ou subapical confluyente; 6, desmielinização confluyente maciça e 8, desmielinização extensa.

3.7 Quantificação de citocinas e quimiocinas por ELISA

Para a avaliação dos níveis de citocinas e quimiocinas, os cérebros, as medulas espinhais e os linfonodos inguinais foram congelados a -80° C foram descongeladas e maceradas em tampão de extração de citocinas (100mg/mL) composto de: 0,4 M de NaCl (Isofar Indústria e Comércio), 0,05% de tween 20 (Isofar Indústria e Comércio), 0,5% de soro-albumina bovina- BSA (Sigma), 0,1 M de fluoreto de fenil-metil-sulfonil- PMSF (Sigma), 0,1 M de cloreto de benzetônio- BC (Sigma), 10 mM de ácido etileno diamino tetracético- EDTA (Sigma) e 20 pM de aprotinina- AP (Sigma). Em seguida, os homogeneizados foram centrifugados a 3.000 rpm por 30 minutos a 4° C e os sobrenadantes foram coletados e congelados a -80° C. As concentrações de IL-17, IFN- γ , IL-6, IL-10, TGF- β , CCL5 e CCL20 nos sobrenadantes foram determinadas pelo método ELISA utilizando anticorpos e concentrações comercialmente disponíveis de acordo com os procedimentos recomendados pelo fabricante para IFN- γ , IL-6, IL-10, TGF- β , CCL20 e CCL5 (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, EUA) e para IL-17 (eBioscience, San Diego, USA).

3.8 Avaliação da morte celular programada em células no SNC

As secções de tecidos de medula espinhal embutidas em parafina (5 µm) foram examinadas pela técnica de TUNEL, na qual a enzima transferase desoxinucleotidil terminal (TdT) liga-se a fragmentos de DNA gerados em respostas a sinais apoptóticos e catalisa a adição de desoxinucleotídeos biotinilados, e são detectados usando conjugados de streptavidina-peroxidase. A técnica de TUNEL foi realizada de acordo com as instruções do fabricante (Kit de Fragmentação de DNA TdT-FragEL™, Calbiochem, Los Angeles, CA). Uma média de 8 a 12 cortes de cada animal foram examinados em microscópio Olympus BX51 através de uma câmera e documentados em software para aquisição digital das imagens. A análise quantitativa densitométrica foi realizada através da contagem de células em apoptose em toda a extensão de cada um dos cortes examinados. . Após a quantificação de cada corte, foi obtido um valor médio, representativo de cada animal.

3.9 Fenotipagem de células Iba-1⁺ e GFAP⁺ por Imunofluorescência

Para os procedimentos de detecção de células Iba-1⁺, que representam micróglia e GFAP⁺, que representam astrócitos, cortes de medulas espinhais foram desparafinados e hidratados em uma série de etanol (100, 95, 90, 80 e 70%, sequencialmente). Em seguida, incubou-se as seções com tampão citrato a 90 ° C para recuperação antigênica. Depois, os cortes foram lavados com PBS. Posteriormente, os cortes foram bloqueados por 60 minutos em solução de bloqueio (soro fetal bovino a 5% e 0,2% Tween 20 em PBS). Em seguida, foram incubados a 4 ° C durante a noite com anticorpos primários anti-Iba-1 (*do inglês*, ionized calcium binding adapter molecule 1 ; 1: 500 - Wako) ou anti-GFAP (*do inglês*, glial fibrillary acid protein; 1: 500; Sinalização celular) e depois incubados a 4 durante a noite com os respectivos anticorpos secundários. Para o Iba-1, foi utilizado o Alexa Fluor 594 e para o GFAP, o Alexa Fluor 488 (1: 1000, Invitrogen, EUA). Ao final do procedimento, os cortes foram montados em lâmina/lamínula utilizando o meio de montagem Fluoromount (Sigma-Aldrich, EUA) e analisados em microscópio de fluorescência Olympus BX51 através de uma câmera e documentados em software para aquisição digital de imagens. Posteriormente, as imagens foram analisadas utilizando o programa ImageJ (NIH, EUA). Para quantificar a intensidade de fluorescência nos

cortes, uma máscara foi aplicada nos mesmos para assegurar que as medidas de densidade fossem representativas das áreas analisadas. Utilizando o ImageJ, as fotomicrografias foram convertidas para escala cinza e, uma máscara foi gerada. A intensidade do sinal (pixels/ μm^2) das células foi calculada. Oito a doze cortes de cada animal foram utilizados para a realização das análises. Após a quantificação de cada corte, foi obtido um valor médio, representativo de cada animal.

3.10 Avaliação da fosforilação da proteína Akt por Western Blotting

Para a avaliação dos níveis de expressão da proteína pAkt, as medulas espinhais foram homogeneizadas em tampão de lise (Triton X-100 a 1%; Tris / HCl a 100 mM, pH 8,0; glicerol a 10%; EDTA a 5 mM; NaCl a 200 mM ; 1 mM de DTT; 1 mM de PMSF; 25 mM de NaF; 2,5 / mL de leupeptina; 5 / mL de aprotinina; 1 mM de ortovanadato de sódio) e armazenados a -80°C até o momento da análise. A concentração proteica foi determinada usando o ensaio de Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). 60 μg de amostras de proteína foram separadas em géis de poliacrilamida a 10% SDS e depois transferidas para membranas de nitrocelulose. Após bloqueio em leite desnatado a 5% em solução salina tamponada com Tris contendo Tween-20 a 0,1% (TBST), durante 1h à temperatura ambiente, as membranas foram incubadas *overnight* a 4°C com anticorpos primários contra anti-pAktSer473 (1: 1000; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EUA) e anti- β -actina (1: 5000; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Após três lavagens com TBST, as membranas foram incubadas com os anticorpos secundários conjugados com peroxidase apropriados (1: 3.000). Finalmente, as membranas foram incubadas com quimioluminescência aprimorada ECL-Plus (GE Healthcare, Piscataway, NJ, EUA). As densidades ópticas das bandas detectadas foram quantificadas usando o software ImageJ. Os resultados foram normalizados para a quantidade de β -actina em cada amostra.

3.11 Análise estatística

Os resultados foram representados por média \pm erro padrão. As variáveis numéricas foram avaliadas nos diferentes grupos pelo teste de One-Way ANOVA, ou Two-Way ANOVA com pós-teste de Bonferroni para comparações múltiplas, para determinação das diferenças significantes entre os grupos de animais, com níveis de significância $p < 0,05$. O programa estatístico usado foi o GraphPad Prism 5.0.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação do curso clínico da EAE

Para avaliar o efeito da deleção genética da enzima PI3K γ no desenvolvimento clínico na EAE, foi realizada a análise da evolução do quadro clínico da doença. Esta análise foi determinada através dos pontos atribuídos aos sinais clínicos apresentados na tabela 2.

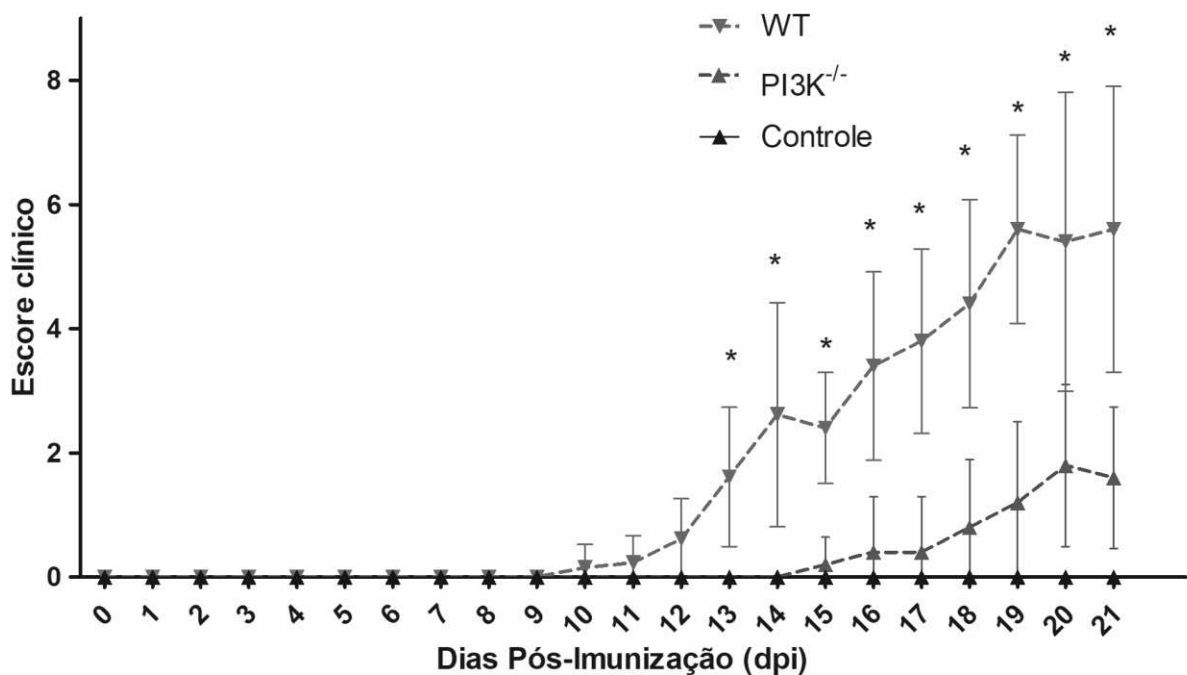


Figura 11 – Deficiência de PI3K γ atrasa e reduz os sinais clínicos da EAE. Os animais foram monitorados diariamente para os sinais clínicos da EAE após imunização com 100 μ g de peptídeo MOG₃₅₋₅₅. Cada ponto representa a média aritmética \pm SEM. *, $p < 0,05$ quando comparados os animais PI3K^{-/-} aos animais selvagens (WT) (n=10 animais/grupo).

De acordo com a Fig. 11, pode-se notar que os camundongos imunizados apresentaram sinais de EAE como fraqueza/paralisia da cauda e dos membros, que se tornaram aparentes em torno de 9-11 dias após a imunização. O grupo WT atingiu o pico no dia 19, com uma pontuação clínica elevada. Pode-se observar que os sinais clínicos da doença no grupo PI3K^{-/-} tornaram-se aparentes apenas a partir do dia 14 após a imunização atingindo um pico, significativamente menor, no dia 20 após a imunização, com tendência à redução após esse período. A partir do dia 13, o grupo PI3K^{-/-} mostrou diferenças acentuadas na pontuação clínica ($p < 0,05$) em comparação com o grupo WT (Fig. 11).

4.2 Avaliação do infiltrado inflamatório e desmielinização no cérebro

A avaliação do infiltrado inflamatório no SNC foi realizada no cérebro dos animais WT e PI3K γ ^{-/-} (KO), imunizados ou não com o MOG₃₅₋₅₅, nos 14^o e 21^o dias pós-imunização.

A figura 12 mostra os cortes de cérebros corados com Hematoxilina-Eosina (HE), a qual foi utilizada para avaliação do infiltrado inflamatório.

Os animais dos grupos controles, não imunizados, não apresentaram anormalidades no padrão parenquimatoso cerebral, sem presença de infiltrados inflamatórios (Fig. 12- A, C, E e G).

No 14^o dia pós- imunização, os animais WT- EAE apresentaram intenso infiltrado celular inflamatório no parênquima cerebral, bem visível nas áreas perivasculares, enquanto o grupo KO-EAE apresentou-se com a manutenção habitual do parênquima cerebral discreta presença de focos de infiltrados inflamatórios (Fig. 12- B e F).

No 21^o dia pós-imunização, os animais do grupo WT-EAE apresentaram-se com infiltrados celulares inflamatórios moderados de aspectos bem delimitados na região parenquimática do cérebro, enquanto o grupo KO-EAE, observou-se a presença de discretos infiltrados inflamatórios nas regiões perivasculares cerebrais (Fig. 12- D e H).

A figura 13 apresenta o escore inflamatório observado no cérebro dos animais imunizados com o MOG₃₅₋₅₅, nos 14^o e 21^o dias pós-imunização, de acordo com XIAO et al., 2015), onde pode-se observar que os animais PI3K γ ^{-/-} (KO) induzidos para a EAE obtiveram atraso e menor processo inflamatório no cérebro.

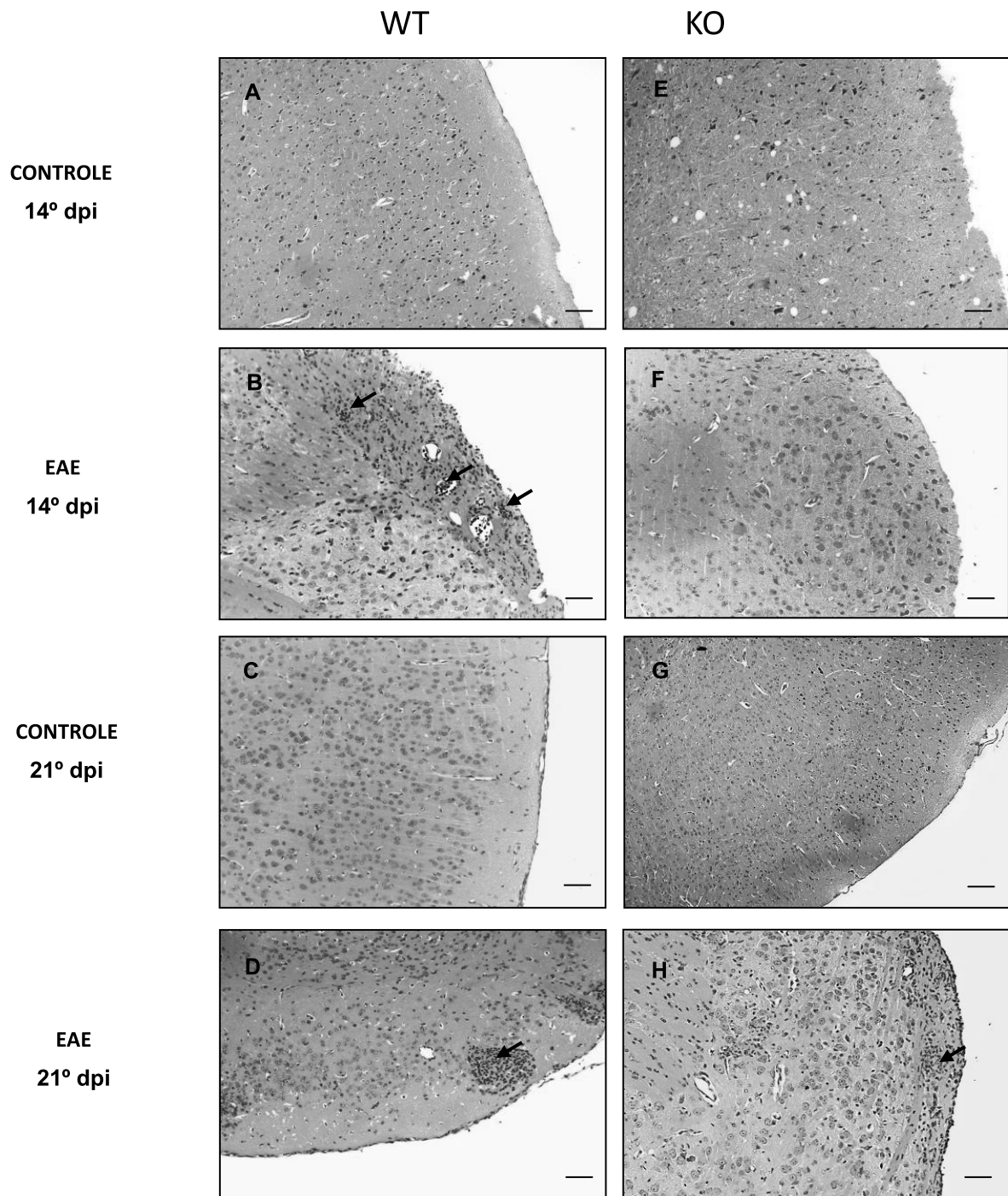


Figura 12 - Deficiência de PI3K γ atrasa e reduz a presença de infiltrados celulares da EAE. Histopatologia do cérebro de camundongos WT ou PI3K γ ^{-/-} imunizados (B- D- F- H) ou não (A- E- C- G) com 100 μ g de peptídeo MOG₃₅₋₅₅ nos dias 14 e 21 após a imunização. 8 a 12 cortes representativos dos grupos examinados foram corados com hematoxilina e eosina (H&E) para análise do infiltrado de células. Aumento Original: objetiva de 20X. Setas indicam os infiltrados celulares. Barra 50 μ m.

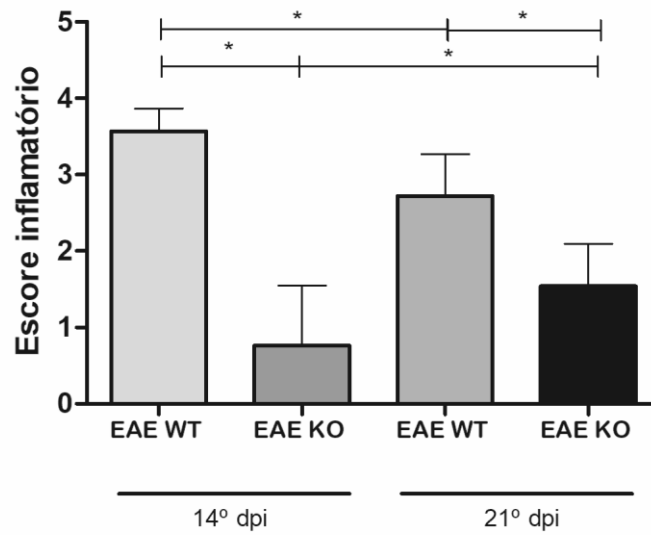


Figura 13 - Deficiência de PI3K γ atrasa e reduz a presença de infiltrados celulares da EAE. Escore inflamatório do cérebro de camundongos WT ou PI3K γ ^{-/-} imunizados com 100 μ g de peptídeo MOG₃₅₋₅₅ nos dias 14 e 21 após a imunização. 8 a 12 cortes representativos dos grupos examinados foram corados com hematoxilina e eosina (H&E) para análise do infiltrado de células. Cada ponto representa a média \pm SEM. * $<0,05$.

A avaliação do processo de desmielinização do cérebro foi realizada nos 14º e 21º dias pós-imunização. A figura 14 mostra os cortes de cérebros corados com Luxol Fast-Blue (LFB) para avaliação do desmielinização.

Os animais dos grupos controles, não imunizados, não apresentaram anormalidades no padrão parenquimatoso cerebral, sem presença de focos de desmielinização, de forma compatível com o achado na coloração de LFB (Fig. 14 A, C, E e G).

No 14º dia pós-imunização, os animais WT-EAE apresentaram áreas de desmielinização isoladas, bem visíveis nas áreas perivasculares, enquanto o grupo KO-EAE apresentou-se com a manutenção habitual do parênquima cerebral sem presença de focos visíveis de desmielinização (Fig. 14 B e F).

No 21º dia pós-imunização, os animais do grupo WT-EAE apresentaram-se com áreas intensas de desmielinização confluyente na região parenquimática do cérebro, enquanto o grupo KO-EAE, observou-se a presença de pequenos focos de desmielinização no parênquima cerebral (Figura 14 D e H).

A figura 15 apresenta o processo de desmielinização observado no cérebro dos animais imunizados com o MOG₃₅₋₅₅, nos 14º e 21º dias pós-imunização, de acordo com ABDUL-MAJID et al., 2003), onde pode-se observar que os animais PI3K $\gamma^{-/-}$ (KO) induzidos para a EAE obtiveram menor destruição mielínica no cérebro.

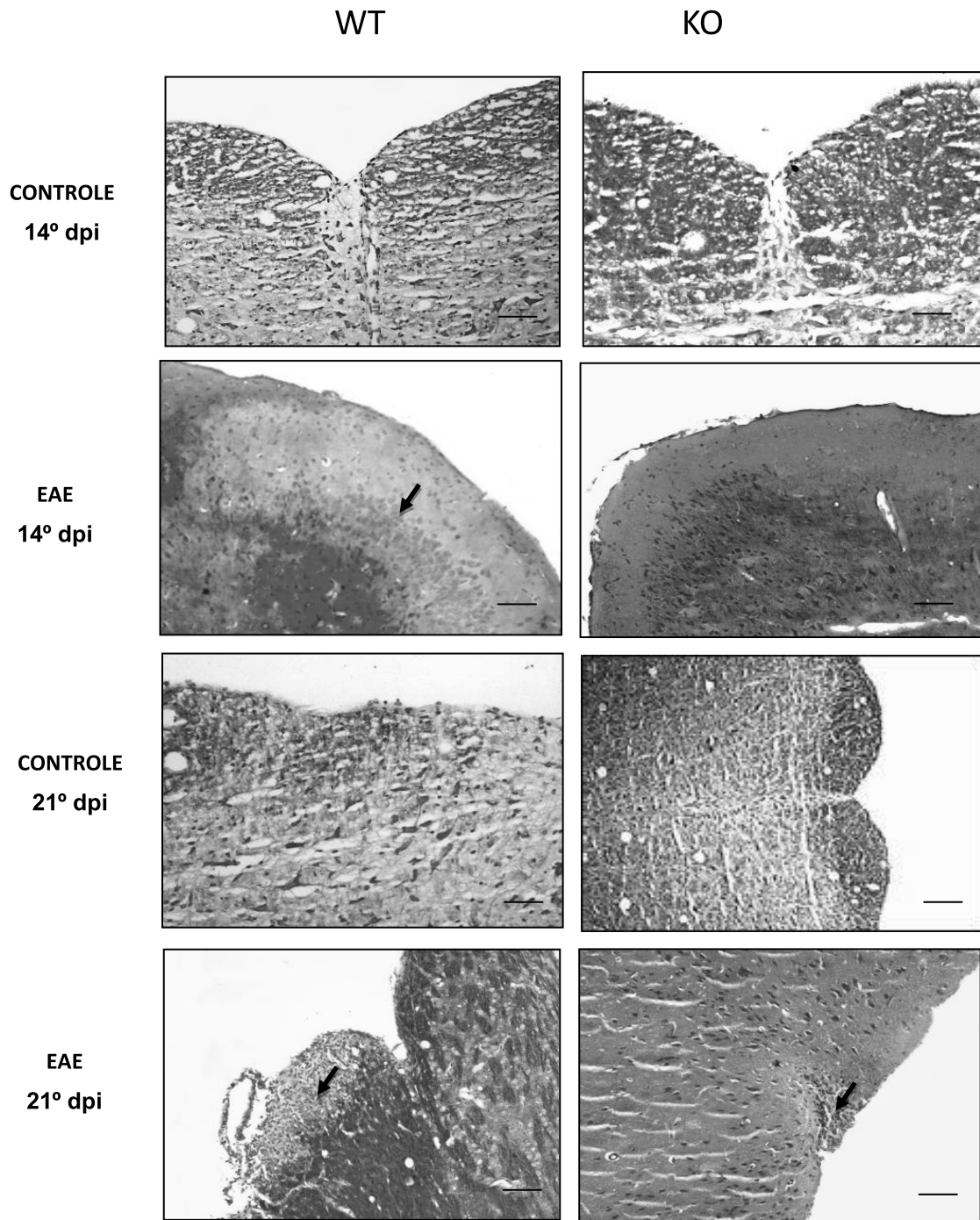


Figura 14 - Deficiência de PI3K γ reduz o processo de desmielinização da EAE. Histopatologia do cérebro de camundongos WT ou PI3K γ ^{-/-} imunizados (B- D- F- H) ou não (A- E- C- G) com 100 μ g de peptídeo MOG₃₅₋₅₅ nos dias 14 e 21 após a imunização. 8 a 12 cortes representativos dos grupos examinados foram corados com Luxol Fast- Blue (LFB), para análise do processo de desmielinização. Aumento Original: objetiva de 20X. Setas indicam focos de desmielinização. Barra 50 μ m.

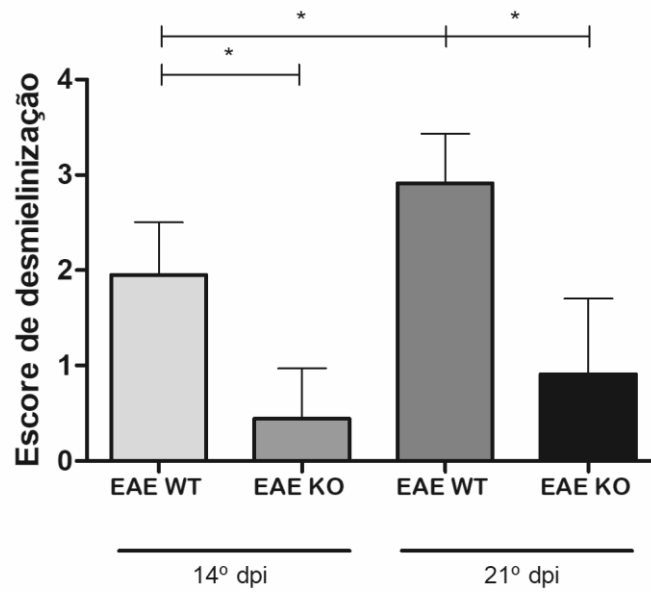


Figura 15- Deficiência de PI3K γ reduz o processo de desmielinização da EAE. Escore de desmielinização da medula espinhal de camundongos WT ou PI3K γ ^{-/-} imunizados com 100 μ g de peptídeo MOG₃₅₋₅₅ nos dias 14 e 21 após a imunização. 8 a 12 cortes representativos dos grupos examinados foram corados com Luxol Fast-Blue (LFB) para análise da desmielinização do SNC. Cada ponto representa a média \pm SEM. * $<0,05$.

4.3 Avaliação do infiltrado inflamatório e desmielinização na medula espinhal

Da mesma forma que o cérebro, a avaliação do infiltrado inflamatório da medula espinhal também foi realizada nos animais WT e PI3K γ ^{-/-} (KO), imunizados ou não com o MOG₃₅₋₅₅, nos 14º e 21º dias pós-imunização. A figura 16 mostra os cortes de medulas espinhais corados com Hematoxilina-Eosina (HE) para avaliação do infiltrado inflamatório.

Assim como observado no cérebro, os animais dos grupos controles, não imunizados, não apresentaram anormalidades no padrão parenquimatoso cerebral, sem presença de infiltrados inflamatórios (Fig. 16 A, C, E e G).

No 14º dia pós- imunização, os animais WT- EAE apresentaram intenso infiltrado celular inflamatório parenquimático, enquanto o grupo KO-EAE apresentou-se com a manutenção habitual do parênquima medular sem presença de infiltrados inflamatórios (Fig. 16 B e F).

No 21º dia pós-imunização, observa-se que no grupo WT-EAE ocorre-se a presença de um infiltrado celular inflamatório moderado, enquanto o grupo KO-EAE, observou-se a presença de infiltrado inflamatório discreto na região parenquimática da medula espinhal (Fig. 16 D e H).

A figura 17 apresenta o escore inflamatório observado na medula espinhal dos animais imunizados com o MOG₃₅₋₅₅, nos 14º e 21º dias pós-imunização, de acordo com XIAO et al., 2015), onde pode-se observar que os animais PI3K γ ^{-/-} induzidos para a EAE obtiveram atraso e menor processo inflamatório na medula espinhal dos animais, de forma similar ao observado no cérebro destes animais.

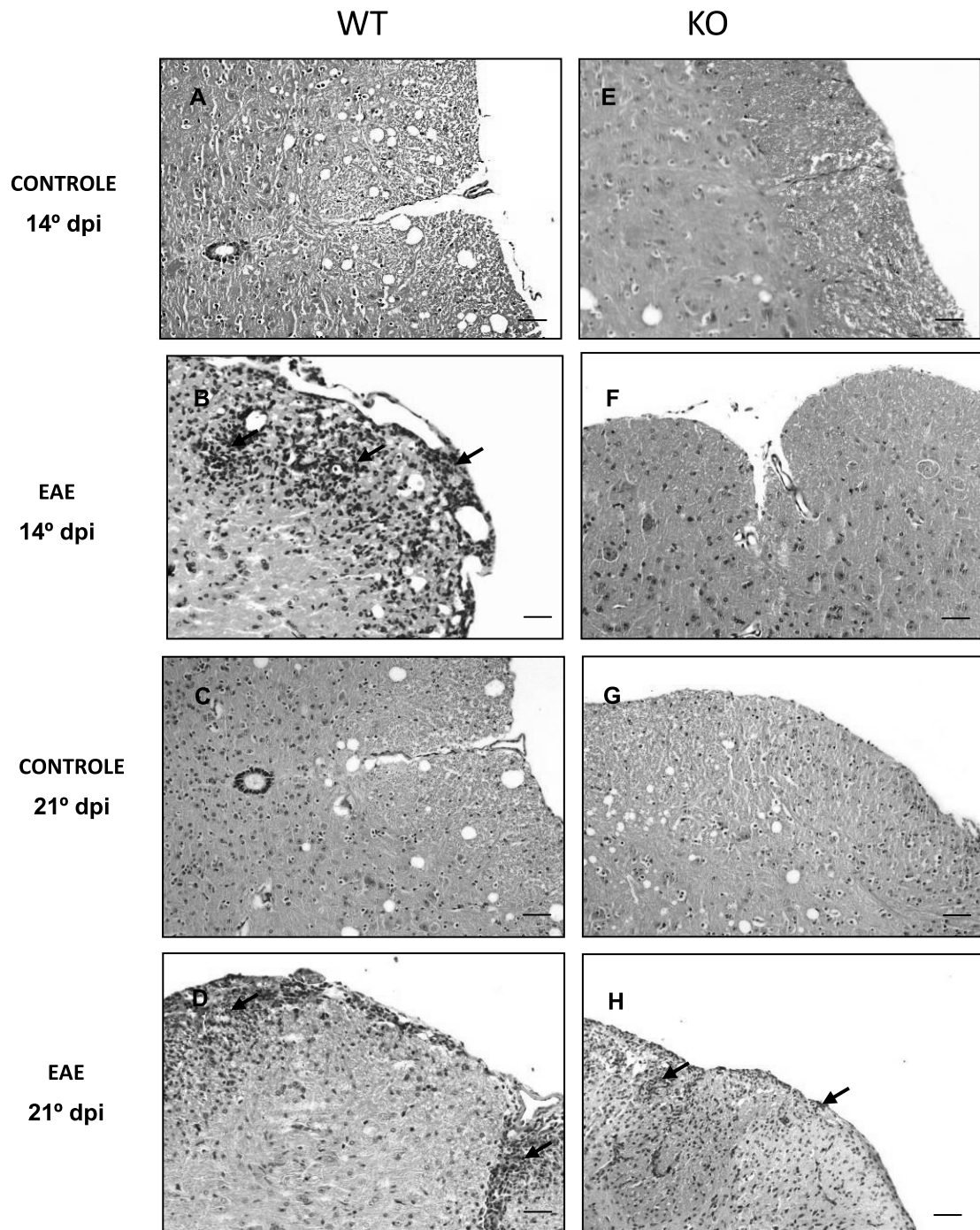


Figura 16 - Deficiência de PI3K γ reduz a presença de infiltrados celulares da EAE. Histopatologia do cérebro de camundongos WT ou PI3K γ ^{-/-} imunizados (B- D- F- H) ou não (A- E- C- G) com 100 μ g de peptídeo MOG₃₅₋₅₅ nos dias 14 e 21 após a imunização. 8 a 12 cortes representativos dos grupos examinados foram corados com hematoxilina e eosina (H&E) para análise do infiltrado de células. Aumento Original: objetiva de 20X. Setas indicam os infiltrados celulares. Barra 50 μ m.

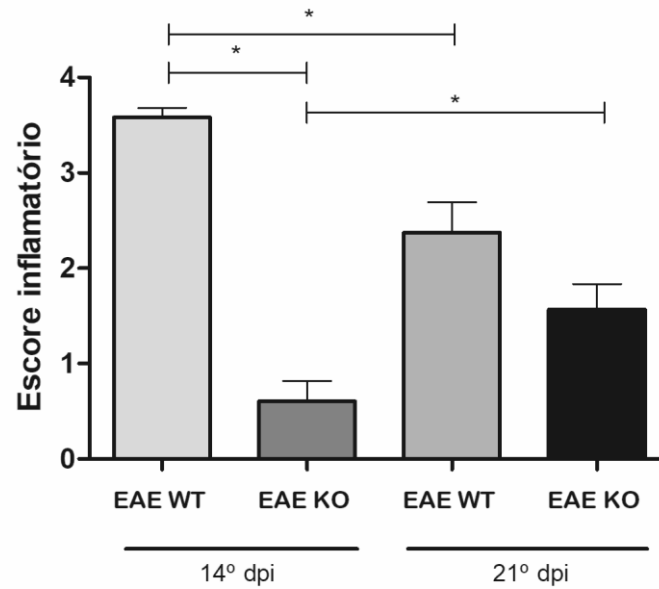


Figura 17- Deficiência de PI3K γ reduz a presença de infiltrados celulares da EAE. Escore inflamatório da medula espinhal de camundongos WT ou PI3K γ ^{-/-} imunizados com 100 μ g de peptídeo MOG₃₅₋₅₅ nos dias 14 e 21 após a imunização. 8 a 12 cortes representativos dos grupos examinados foram corados com hematoxilina e eosina (H&E) para análise do infiltrado de células. Cada ponto representa a média \pm SEM. * $<0,05$.

A avaliação do processo de desmielinização da medula espinhal foi realizada nos 14º e 21º dias pós-imunização. A figura 18 mostra os cortes de medula espinhal corados com Luxol Fast-Blue (LFB) para avaliação do processo de desmielinização.

Os animais dos grupos controles, não imunizados, não apresentaram anormalidades no padrão parenquimatoso cerebral, sem presença de focos de desmielinização, de forma compatível com o achado na coloração de LFB (Fig. 18 A, E, C e G).

No 14º dia pós- imunização, os animais WT-EAE apresentaram áreas de desmielinização na região subapical de forma isolada, enquanto o grupo KO-EAE apresentou-se com a manutenção habitual do parênquima cerebral sem presença de focos de desmielinizaçã visíveis (Fig. 18 B e F).

No 21º dia pós-imunização, assim como observado no cérebro, os animais do grupo WT-EAE apresentaram-se com áreas de desmielinização na região subapical da medula espinhal de forma isolada e confluyente, enquanto o grupo KO-EAE, observou-se a presença de focos desmielinização de forma isolada na medula espinhal (Fig. 18 D e H).

A figura 19 apresenta o processo de desmielinização observado na medula espinhal dos animais imunizados com o MOG₃₅₋₅₅, nos 14º e 21º dias pós-imunização, de acordo com ABDUL-MAJID et al., 2003, onde pode-se observar que os animais PI3K γ ^{-/-} (KO) induzidos para a EAE obtiveram menor destruição mielínica na medula espinhal, de forma semelhante ao observado no cérebro.

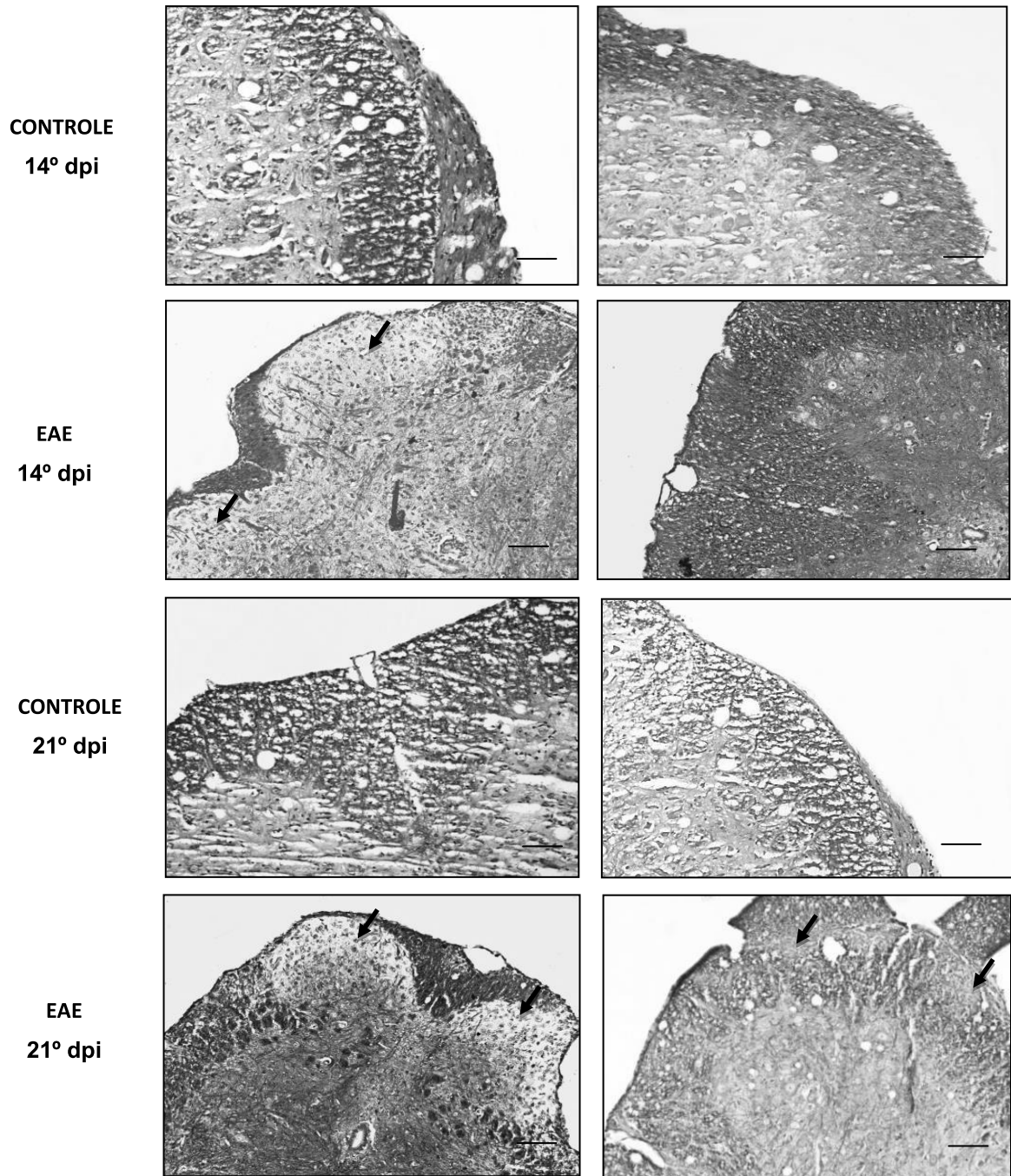


Figura 18 - Deficiência de PI3K γ reduz o processo de desmielinização da EAE. Histopatologia de medula espinal de camundongos WT ou PI3K γ ^{-/-} imunizados ou não com 100 μ g de peptídeo MOG₃₅₋₅₅ nos dias 14 e 21 após a imunização. 8 a 12 cortes representativos dos grupos examinados foram corados com Luxol Fast- Blue (LFB), para análise do processo de desmielinização. Aumento Original: objetiva de 20X. Setas indicam focos de desmielinização. Barra 50 μ m.

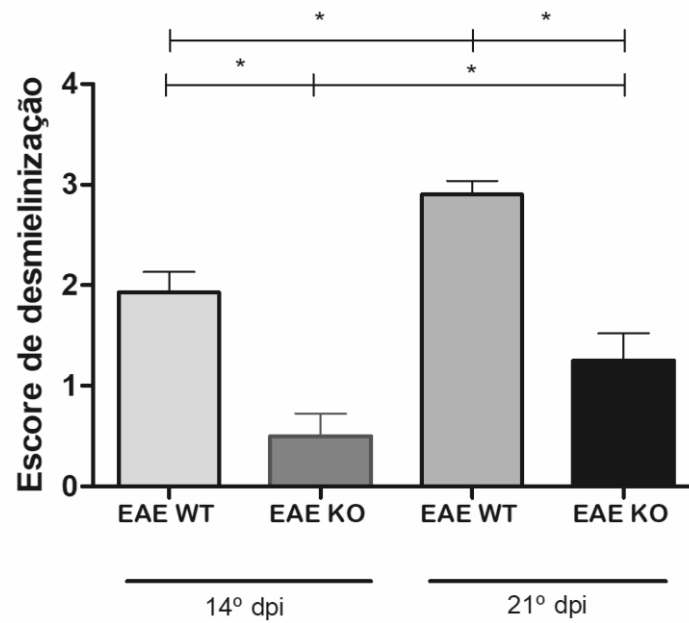


Figura 19- Deficiência de PI3K γ reduz o processo de desmielinização da EAE. Escore de desmielinização da medula espinhal de camundongos WT ou PI3K γ ^{-/-} imunizados com 100 μ g de peptídeo MOG₃₅₋₅₅ nos dias 14 e 21 após a imunização. 8 a 12 cortes representativos dos grupos examinados foram corados com Luxol Fast-Blue (LFB) para análise da desmielinização do SNC. Cada ponto representa a média \pm SEM. * $<0,05$.

Os resultados relacionados ao processo de infiltração celular e desmielinização do SNC observados corroboram com a evolução clínica dos animais WT-EAE e KO-EAE imunizados com MOG₃₅₋₅₅, uma vez que no grupo WT-EAE, já no 14º dpi, houve acentuação dos infiltrados inflamatórios de forma compatível ao agravamento dos sinais clínicos da EAE, culminando com um maior processo de destruição mielínica no 21ºdpi. Já os animais KO-EAE apresentaram menor intensidade de infiltrados inflamatórios e de destruição mielínica nos dois pontos avaliados, de forma compatível com a menor evolução clínica da EAE neste grupo.

4.4 Avaliação dos níveis das quimiocinas CCL5 e CCL20 em homogenato de cérebro

Para uma melhor compreensão dos resultados relacionados ao processo de infiltração celular no SNC dos animais induzidos para a EAE, os níveis de produção das quimiocinas CCL5 e CCL20 foram determinados em homogenato de cérebro de animais WT e PI3K^{-/-} imunizados ou não, com 100µg de MOG₃₅₋₅₅, nos 14^o e 21^o dpi (Fig. 20).

Os animais imunizados com 100µg de MOG₃₅₋₅₅ do grupo WT-EAE apresentaram aumento significativo da quimiocina CCL5 no 14^o dpi em relação aos grupos controles WT e KO e ainda, ao grupo KO-EAE. No 21^o dpi, o nível desta quimiocina permaneceu elevado em relação aos grupos WT e KO, porém não foi significativo o seu aumento em relação ao grupo KO-EAE (Fig. 20-A)

Os animais do grupo KO-EAE apresentaram aumento da quimiocina CCL5 tanto no 14^o como no 21^o dpi em relação aos grupos WT e KO. Em relação ao grupo WT-EAE, o grupo KO-EAE apresentou diferença significativa apenas no 14^o dpi, com uma produção menor em relação ao grupo WT-EAE (Fig. 20-A).

A quimiocina CCL20 apresentou-se de forma similar à CCL5. No 14^o dpi, o grupo WT-EAE apresentou níveis elevados de CCL20 em relação aos grupos WT, KO e KO-EAE. No dia 21 após a imunização, observou-se que grupo WT-EAE manteve os níveis dessa citocina elevados em relação aos demais grupos, da mesma forma que o grupo KO-EAE apresentou níveis da CCL20 inferiores em relação aos grupos WT-EAE e maiores em relação aos grupos WT e KO (Fig. 20-B).

Estes resultados corroboram com aqueles referentes ao processo inflamatório no SNC, uma vez que o grupo WT-EAE apresentou níveis elevados das quimiocinas CCL5 e CCL20 no 14^o dpi, de forma compatível com a presença de intenso infiltrado inflamatório no cérebro, o que foi minimizado no 21^o dpi, tanto na produção das quimiocinas, como na intensidade da presença dos infiltrados inflamatórios. Já os animais KO-EAE apresentaram níveis reduzidos de CCL20 nos dois pontos avaliados, também de forma compatível com o menor escore inflamatório dos animais nos mesmos pontos da análise.

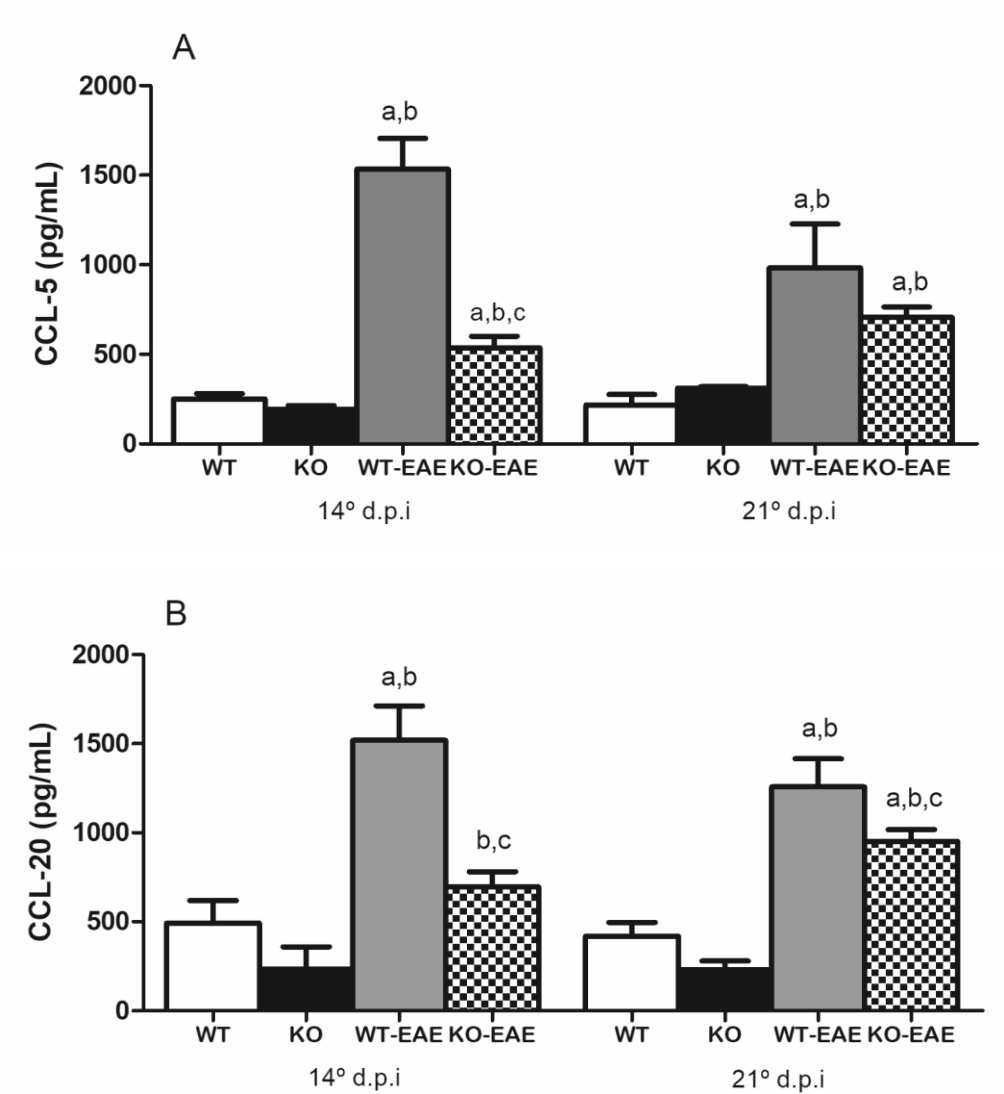


Figura 20- Deficiência de PI3K γ reduz a produção de quimiocinas da EAE Avaliação da produção de quimiocinas CCL5 (A) e CCL20 (B) no sobrenadante de homogenato de cérebro de camundongos WT ou PI3K γ ^{-/-} imunizados ou não com 100 μ g de peptídeo MOG₃₅₋₅₅, nos dias 14 e 21 após a imunização. a= $p < 0,05$ versus grupo WT, b= $p < 0,05$ versus grupo KO, c= $p < 0,05$ versus grupo WT-EAE (n= 6 animais/grupo).

4.5 Avaliação dos níveis das quimiocinas CCL5 e CCL20 em homogenato de medula espinhal

Os níveis de produção das quimiocinas CCL5 e CCL20 também foram determinados nos homogenatos de medula espinhal de animais WT ou PI3K γ ^{-/-} imunizados ou não, com 100 μ g de MOG₃₅₋₅₅, nos dias 14 e 21 pós-imunização (Fig. 21).

Os animais imunizados do grupo WT-EAE apresentaram níveis da quimiocina CCL5 elevados em relação aos demais grupos no 14^odpi, porém, no 21^o dpi, este resultado só se repetiu em relação aos grupos WT e KO. O grupo KO-EAE apresentou nível de CCL5 maior em relação aos grupos WT e KO nos dois pontos avaliados, mas somente no 14^o dpi apresentou resultado significativo em relação ao grupo WT-EAE, sendo este resultado, menor (Fig. 21-A).

Com relação à quimiocina CCL20, o grupo WT-EAE apresentou nível elevado em relação aos demais grupos nos dois pontos avaliados. O grupo KO-EAE, por sua vez, apresentou nível de CCL20 superior aos grupos WT e KO, porém, seu nível foi menor em relação ao grupo WT-EAE (Fig. 21-B).

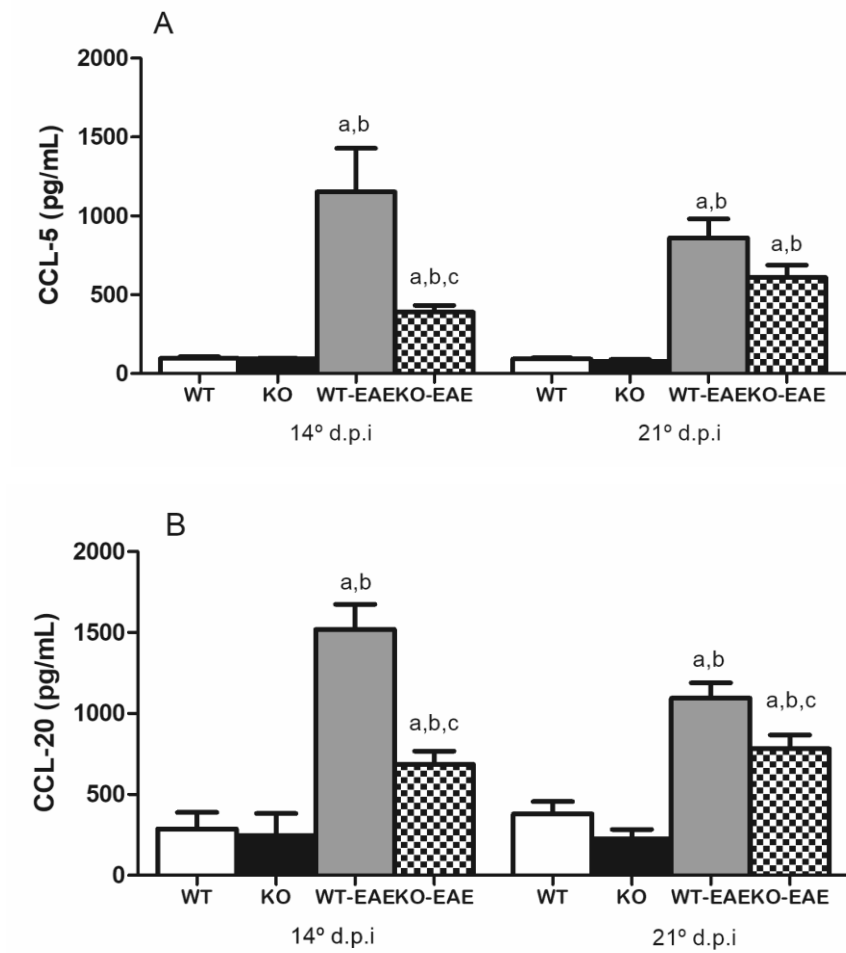


Figura 21- Deficiência de PI3K γ reduz a produção de quimiocinas da EAE Avaliação da produção de quimiocinas CCL5 (A) e CCL20 (B) no sobrenadante de homogenato de medula espinhal de camundongos WT ou PI3K γ ^{-/-} imunizados ou não com 100 μ g de peptídeo MOG₃₅₋₅₅, nos dias 14 e 21 após a imunização. a= p< 0,05 versus grupo WT, b= p< 0,05 versus grupo KO, c= p< 0,05 versus grupo WT-EAE (n= 6 animais/grupo).

4.6 Avaliação da proliferação microglial e astrocitária na medula espinhal

Após a observação de que a deleção genética da PI3K γ promove a redução dos processos de inflamação e desmielinização no SNC, buscou-se verificar o efeito de tal deleção na proliferação microglial e astrocitária, as quais correspondem a importantes células gliais envolvidas na patogênese da EAE (Fig. 22, 23, 24 e 25);

Para tanto, cortes histológicos de medula espinhal de camundongos WT e PI3K γ ^{-/-} imunizados ou não com MOG₃₅₋₅₅ referentes aos 14^o e 21^o dpi foram submetidos às marcações microglial (células Iba-1⁺) e astrocitária (células GFAP⁺), pela técnica de imunofluorescência (Fig. 22 e 23);

Os animais WT-EAE apresentaram maior intensidade de fluorescência para o marcador Iba-1, quantificada a partir da intensidade de pixels/mm² nos dois pontos avaliados, em relação aos grupos controle e KO-EAE, o que indica maior proliferação microglial no grupo EAE. Além disso, pode-se notar que a intensidade de pixels/mm² no grupo WT-EAE no 21^o dpi foi significativamente maior em relação ao 14^o dpi desse grupo (Fig. 22 e 23)

Os animais KO-EAE não obtiveram diferenças significativas entre a intensidade de pixels/mm² para o marcador Iba-1 entre os dois pontos analisados, porém estes valores foram superiores em relação aos grupos controles, nos dois pontos analisados (Fig. 22 e 23)

A figura 23 mostra as fotomicrografias obtidas por esta técnica, enquanto a figura 21 apresenta o gráfico construído a partir das da intensidade de pixels/mm² para o marcador Iba-1 de cada grupo estudado.

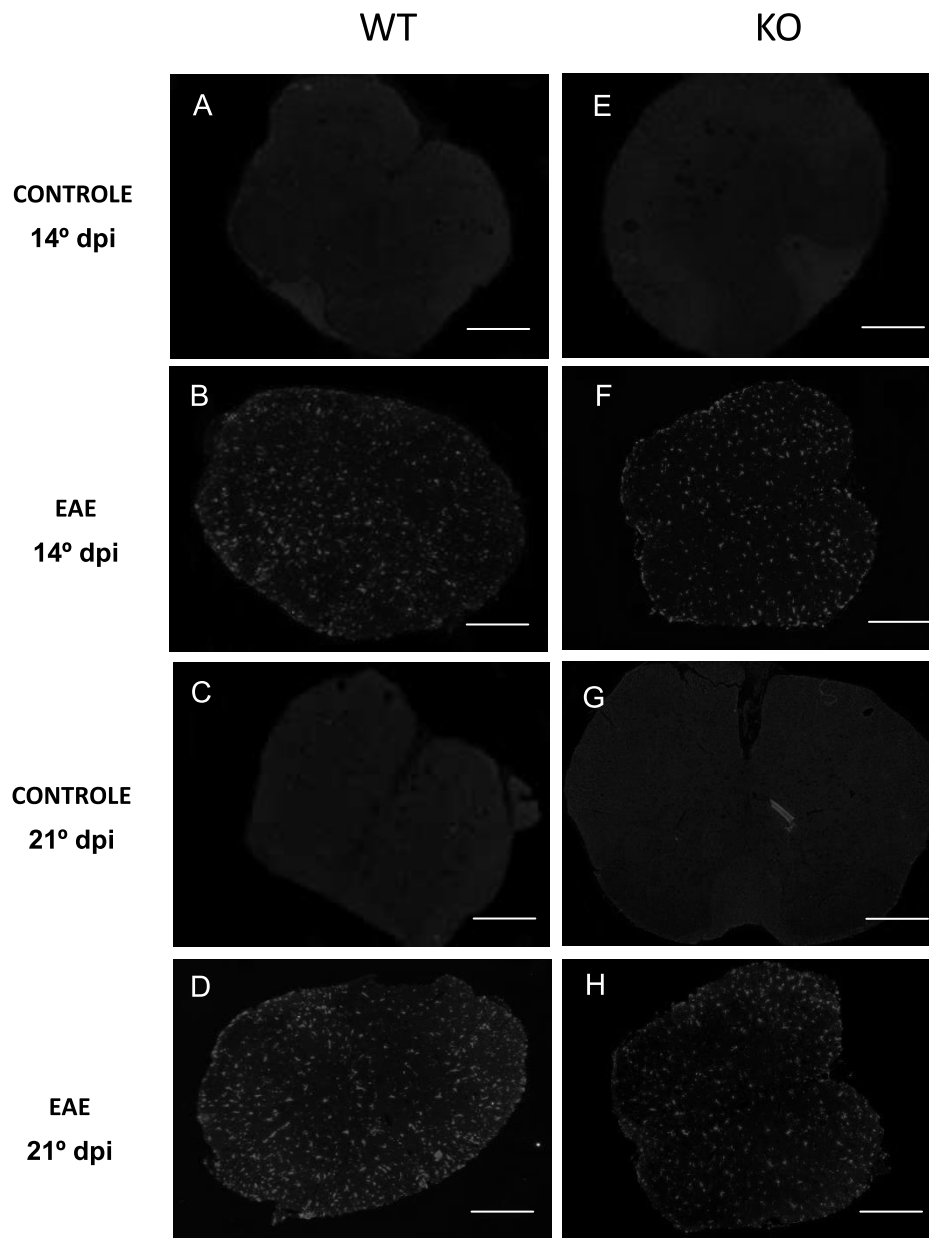


Figura 22 - Deficiência de PI3K γ reduz a proliferação microglial na EAE. Imunofluorescência da medula espinhal de camundongos WT ou PI3K γ ^{-/-} imunizados (B- D- F- H) ou não (A- E- C- G) com 100 μ g de peptídeo MOG₃₅₋₅₅ nos dias 14 e 21 após a imunização. 8 a 12 cortes representativos dos grupos examinados foram marcados com Iba-1 (marcador de micróglia). Aumento Original: objetiva de 10X. Barra 50 μ m.

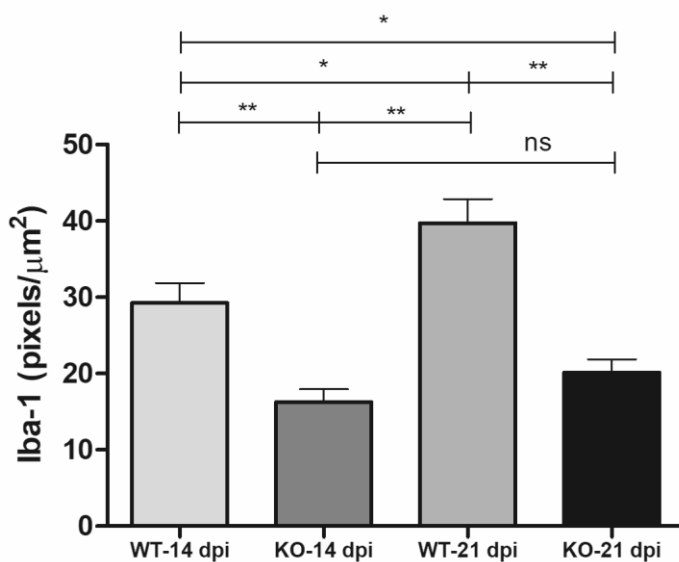


Figura 23- Deficiência de PI3K γ reduz a proliferação microglial na EAE. Imunofluorescência da medula espinhal de camundongos WT ou PI3K γ ^{-/-} imunizados com 100 μ g de peptídeo MOG₃₅₋₅₅ nos dias 14 e 21 após a imunização. . 8 a 12 cortes representativos dos grupos examinados foram marcados com Iba-1 (marcador de micróglia). Cada ponto representa a média \pm SEM. * $<0,1$, ** $<0,05$ e *** $<0,01$.

Com relação à marcação de células GFAP⁺, as quais correspondem a astrócitos, os animais WT-EAE apresentaram maior intensidade de fluorescência para o marcador GFAP, quantificada a partir da intensidade de pixels/mm² no 14º dpi, em relação aos grupos controle e KO-EAE, o que indica maior proliferação astrocitária, neste ponto, no grupo EAE. No 21º dpi, não houve diferença significativa na intensidade de fluorescência entre os grupos WT-EAE e KO-EAE, porém, ambos os grupos foram superiores ao grupo controle (Fig. 24 e 25)

Os animais KO-EAE obtiveram diferenças significativas entre a intensidade de pixels/mm² para o marcador GFAP entre os dois pontos analisados, no 21º dpi, foi observada maior proliferação de astrócitos em relação ao 14º dpi, além disso, estes valores foram superiores em relação aos grupos controles, nos dois pontos analisados (Fig. 24 e 25)

A figura 25 mostra as fotomicrografias obtidas por esta técnica, enquanto a figura 23 apresenta o gráfico construído a partir das da intensidade de pixels/mm² para o marcador GFAP de cada grupo estudado.

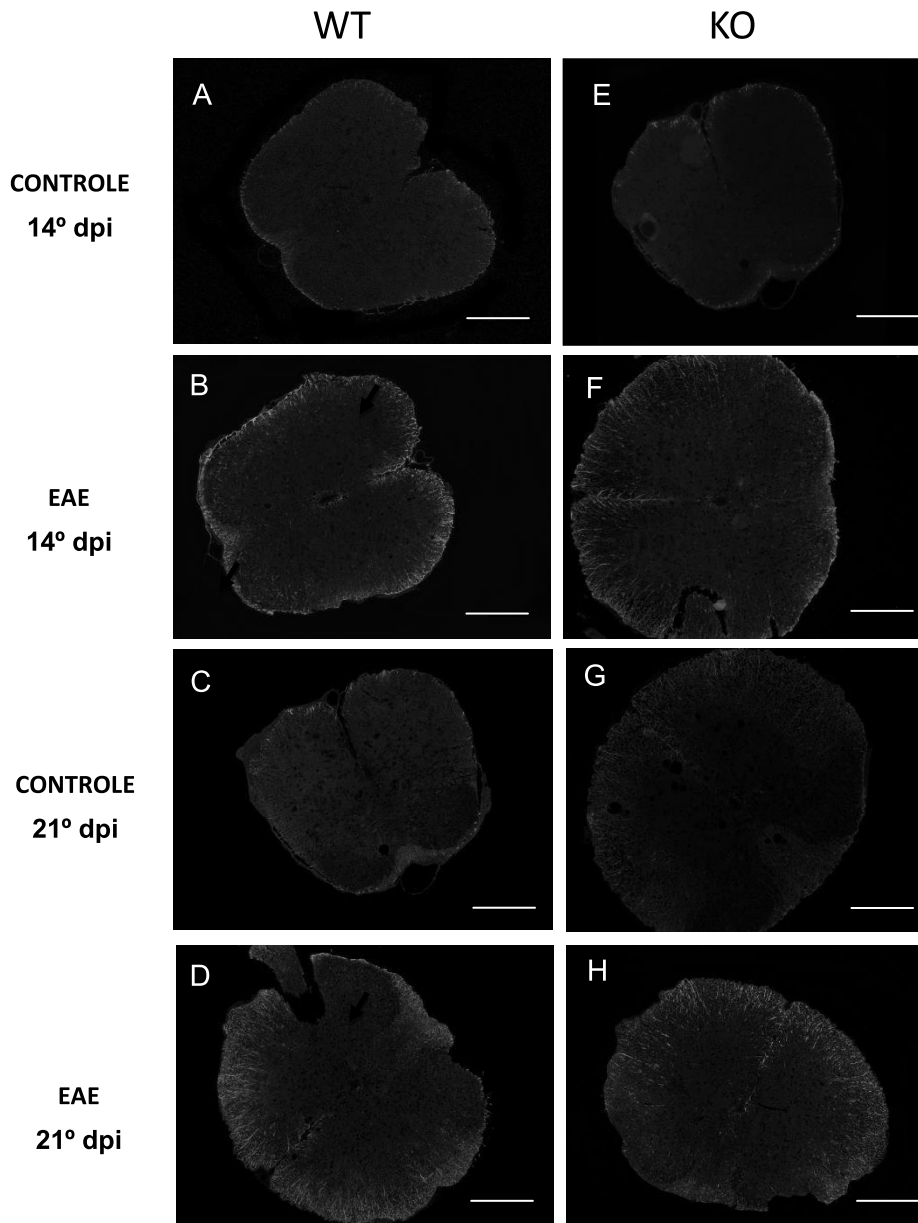


Figura 24- Deficiência de PI3K γ atrasa a proliferação astrocitária na EAE. Imunofluorescência da medula espinhal de camundongos WT ou PI3K γ ^{-/-} imunizados (B- D- F- H) ou não (A- E- C- G) com 100 μ g de peptídeo MOG₃₅₋₅₅ nos dias 14 e 21 após a imunização. 8 a 12 cortes representativos dos grupos examinados foram marcados com GFAP (marcador de astrócitos). Aumento Original: objetiva de 10X. Barra 50 μ m.

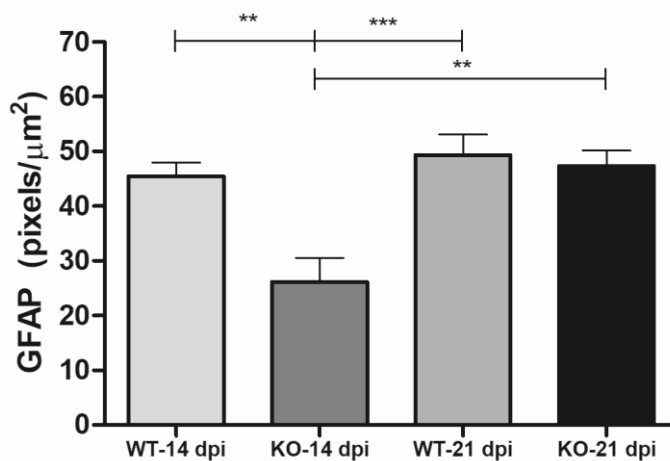


Figura 25- Deficiência de PI3K γ atrasa a proliferação astrocitária na EAE. Imunofluorescência da medula espinhal de camundongos WT ou PI3K γ ^{-/-} imunizados com 100 μ g de peptídeo MOG₃₅₋₅₅ nos dias 14 e 21 após a imunização. 8 a 12 cortes representativos dos grupos examinados foram marcados com GFAP (marcador de astrócitos). Cada ponto representa a média \pm SEM. * $<0,1$, ** $<0,05$ e *** $<0,01$.

4.7 Avaliação dos níveis das citocinas IFN- γ , IL-6, IL-17 e TGF- β em homogenato de cérebro

Os níveis de produção da citocinas de perfil pró- inflamatório (IFN- γ , IL-6, IL-17 e TGF- β) foram determinados em homogenato de cérebro de animais WT ou PI3K γ ^{-/-} imunizados ou não, com 100 μ g de MOG₃₅₋₅₅, nos dias 14 e 21 pós-imunização (Fig. 26).

O grupo de animais imunizados com 100 μ g de MOG₃₅₋₅₅ WT-EAE apresentou aumento no nível da citocina IFN- γ em relação aos grupos controles WT, KO e ao grupo KO-EAE no 14^o dpi, assim como no dia 21^o dpi. O grupo KO-EAE apresentou nível reduzido desta citocina apenas em relação ao grupo WT-EAE, nos 14^o dpi e 21^o dpi, porém apresentou aumento no nível de IFN- γ em relação apenas aos grupos WT e KO no 21^o dpi (Fig. 26-A).

A citocina IL-6 apresentou níveis elevados no grupo WT-EAE em relação aos demais grupos nos 14^o e 21^o dpi. Com relação ao grupo KO-EAE, os níveis de IL-6 foram maiores que os observados nos grupos WT e KO, porém menor que no grupo WT-EAE nos dois pontos avaliados (Fig. 26-B).

A citocina TGF- β apresentou perfil semelhante ao da citocina IL-6, estando elevada no grupo WT-EAE em relação aos demais grupos nos 14^o e 21^o dpi. O grupo KO-EAE, em nenhum dos pontos avaliados, obteve diferença significativa em relação aos grupos WT e KO (Fig. 26-C).

A citocina IL-17, também compatível ao padrão IL-6/TGF- β , apresentou-se elevada no grupo WT-EAE em relação aos demais grupos nos dois pontos avaliados. O grupo KO-EAE apresentou nível da IL-17 superior aos grupos WT e KO apenas no 21^o dpi (Fig. 26-D).

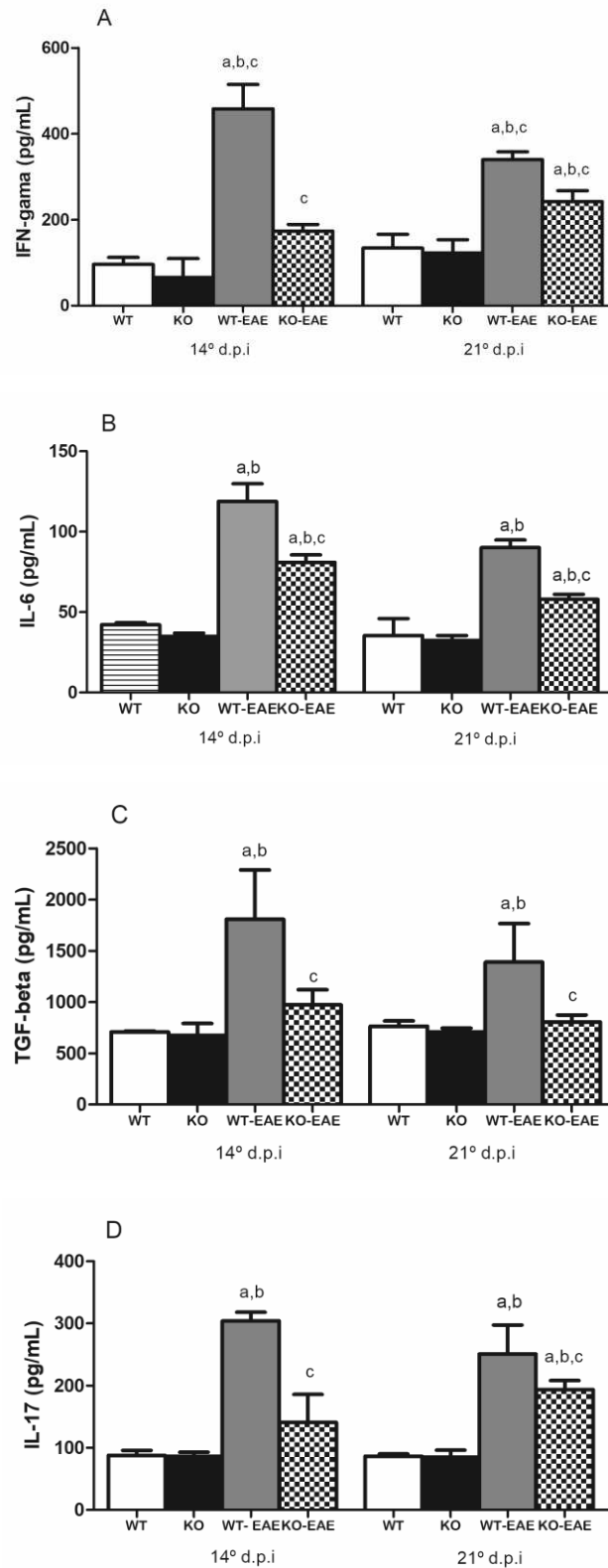


Figura 26 - Deficiência de PI3K γ reduz a produção de citocinas pró-inflamatórias na EAE. Avaliação da produção de citocinas pró-inflamatórias IFN- γ (A), IL-6 (B), TGF- β (C) e IL-17 (D) no sobrenadante de homogenato de cérebro de camundongos WT ou PI3K $\gamma^{-/-}$ imunizados com 100 μ g de peptídeo MOG₃₅₋₅₅, nos dias 14 e 21 após a imunização. a= $p < 0,05$ versus grupo WT, b= $p < 0,05$ versus grupo KO, c= $p < 0,05$ versus grupo WT-EAE (n= 6 animais/grupo).

4.8 Avaliação dos níveis da citocina IL-10 em homogenato de cérebro

Os níveis de produção da citocina de perfil anti- inflamatório IL-10 foi determinado em homogenato de cérebro de animais WT ou PI3K γ ^{-/-} imunizados ou não, com 100 μ g de MOG₃₅₋₅₅, nos dias 14 e 21 pós-imunização.

De forma similar às citocinas IL-6/IL-17/TGF- β , a citocina IL-10 apresentou-se elevada no grupo WT-EAE em relação aos demais grupos no 14º dpi, porém, no 21º dpi, a mesma não apresentou diferença significativa em relação ao grupo KO-EAE. O grupo KO-EAE apresentou níveis mais altos de IL-10 em relação aos grupos WT e KO, de forma significativa, apenas no 21ºdpi (Fig. 27).

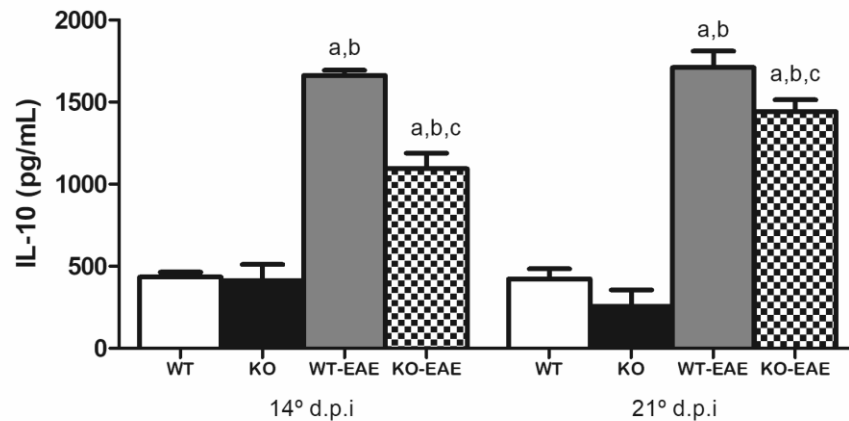


Figura 27 - Deficiência de PI3K γ não reduz a produção da citocina anti-inflamatória IL-10 na EAE. Avaliação da produção da citocina anti-inflamatórias IL-10 no sobrenadante de homogenato de cérebro de camundongos WT ou PI3K γ ^{-/-} imunizados com 100 μ g de peptídeo MOG₃₅₋₅₅, nos dias 14 e 21 após a imunização. a= p< 0,05 versus grupo WT, b= p< 0,05 versus grupo KO, c= p< 0,05 versus grupo WT-EAE (n= 6 animais/grupo).

Os resultados observados da quantificação de citocinas pró e anti-inflamatórias no cérebro dos camundongos WT ou PI3K γ ^{-/-} imunizados ou não com MOG corroboram com os resultados encontrados na avaliação clínica dos animais, assim como no escore inflamatório, de desmielinização e na quantificação das quimiocinas. De forma esperada, os animais do grupo WT-EAE apresentaram níveis elevados das citocinas pró-inflamatórias no 14^o dpi, o que foi minimizado no 21^o dpi, enquanto a citocina anti-inflamatória IL-10 permanece elevada. Já os animais KO-EAE apresentaram níveis menores das citocinas pró-inflamatórias nos dois pontos avaliados e elevação de IL-10 no 21^o dpi, também de forma compatível com o menor escore inflamatório e avaliação clínica dos animais, em relação ao grupo WT-EAE nos pontos da análise.

4.9 Avaliação dos níveis das citocinas IFN- γ , IL-6, IL-17 e TGF- β em homogenato de medula espinhal

Os níveis de produção da citocinas de perfil pró- inflamatório (IFN- γ , IL-6, IL-17 e TGF- β) foram determinados em homogenato de medula espinhal de animais WT ou PI3K $\gamma^{-/-}$ imunizados ou não, com 100 μ g de MOG₃₅₋₅₅, nos dias 14 e 21 pós-imunização (Fig. 28).

O grupo imunizado WT-EAE apresentou níveis mais elevados de IFN- γ em relação aos demais grupos nos dois pontos avaliados. Já o grupo KO-EAE apresentou nível de IFN- γ elevado de forma significativa em relação aos grupos WT e KO apenas no 21^o dpi (Fig. 28-A).

Com relação à citocina IL-6, o grupo WT-EAE apresentou nível elevado desta, em relação aos demais grupos, nos dois pontos analisados. O grupo KO-EAE apresentou elevação de IL-6 em relação aos grupos WT e KO nos dois pontos avaliados (Fig. 28-B).

A citocina TFG- β apresentou-se em níveis mais elevados nos grupos imunizados com 100 μ g de MOG₃₅₋₅₅ em relação aos grupos controles, nos dias 14^o e 21^o após a imunização. Além disso, neste ponto, o grupo KO-EAE apresentou níveis mais elevados de TFG- β em relação ao grupo WT-EAE. No 21^o dia pós-imunização, não houve diferenças significativas entre os grupos WT-EAE e KO-EAE em relação a essa citocina (Fig. 28-C).

A citocina IL-17 de forma semelhante à IFN- γ , IL-6 e TFG- β , apresentou-se mais elevada nos grupos imunizados com 100 μ g de MOG₃₅₋₅₅ em relação aos grupos controles, nos dias 14^o e 21^o após a imunização. Ainda, o grupo KO-EAE apresentou níveis reduzidos de IL-17 em relação ao grupo WT-EAE, neste ponto. No 21^o dia pós-imunização o WT-EAE apresentou níveis reduzidos de IL-17 em relação ao grupo WT, enquanto o grupo KO-EAE apresentou níveis elevados desta citocina em relação aos demais grupos (Fig. 28-D).

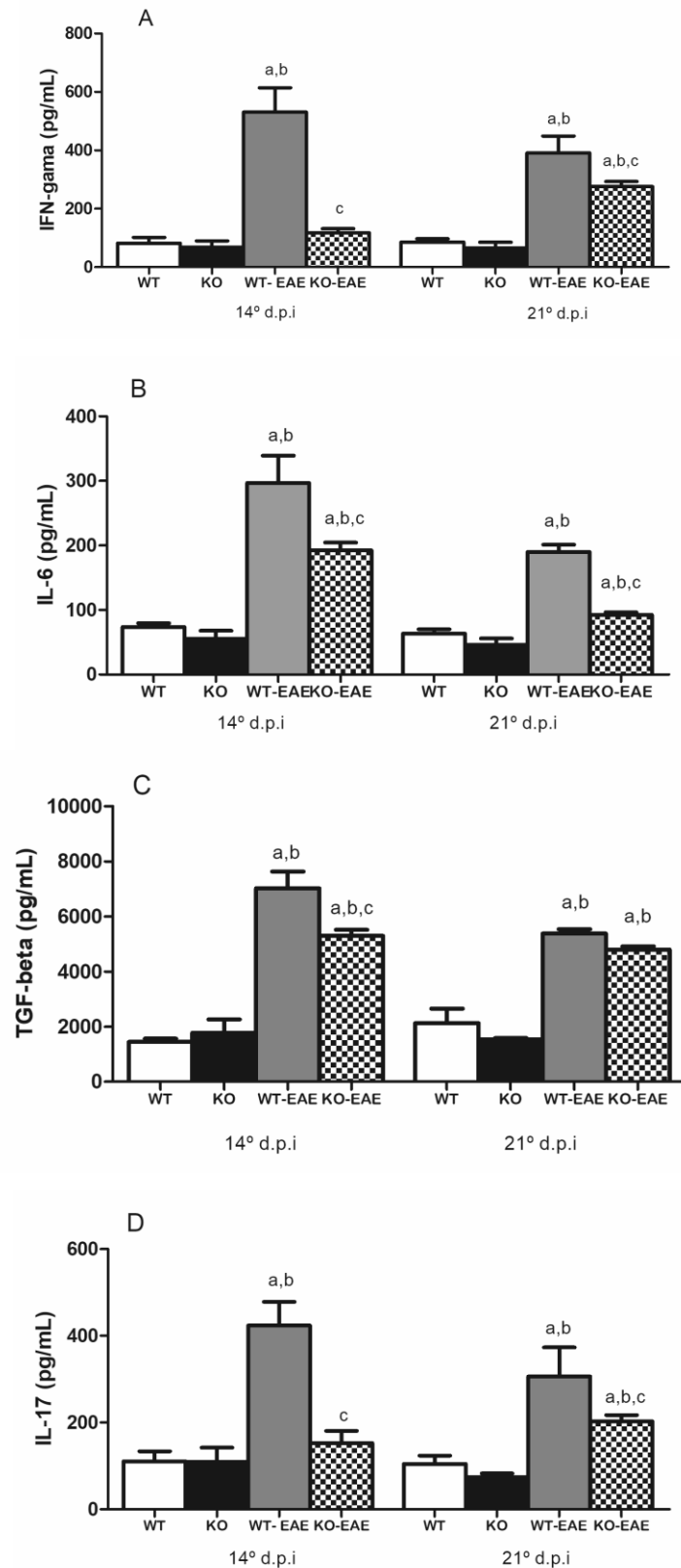


Figura 28 - Deficiência de PI3K γ reduz a produção de citocinas pró-inflamatórias na EAE. Avaliação da produção de citocinas pró-inflamatórias IFN- γ (A), IL-6 (B), TGF- β (C) e IL-17 (D) no sobrenadante de homogenato de medula espinhal de camundongos WT ou PI3K γ ^{-/-} imunizados com 100 μ g de peptídeo MOG₃₅₋₅₅, nos dias 14 e 21 após a imunização. a= p< 0,05 versus grupo WT, b= p< 0,05 versus grupo KO, c= p< 0,05 versus grupo WT-EAE (n= 6 animais/grupo).

4.10 Avaliação dos níveis da citocina IL-10 em homogenato de medula espinhal

Os níveis de produção da citocina de perfil anti-inflamatório IL-10 foram determinados em homogenato de medula espinhal de animais WT ou PI3K γ ^{-/-} imunizados ou não, com 100 μ g de MOG₃₅₋₅₅, nos dias 14 e 21 pós-imunização (Fig. 29).

O grupo WT-EAE apresentou nível elevado de IL-10 em relação aos demais grupos nos dois pontos analisados, enquanto que o grupo KO-EAE apresentou níveis maiores da citocina em relação aos grupos WT e KO nos dois pontos analisados (Fig. 29).

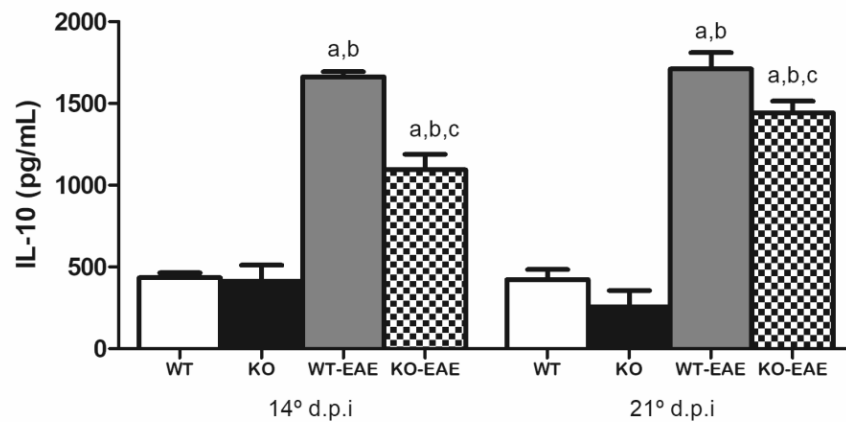


Figura 29 - Deficiência de PI3K γ não reduz a produção da citocina anti-inflamatória IL-10 na EAE. Avaliação da produção da citocina anti-inflamatórias IL-10 no sobrenadante de homogenato de medula espinhal de camundongos WT ou PI3K γ ^{-/-} imunizados com 100 μ g de peptídeo MOG₃₅₋₅₅, nos dias 14 e 21 após a imunização. a= p < 0,05 versus grupo WT, b= p < 0,05 versus grupo KO, c= p < 0,05 versus grupo WT-EAE (n= 6 animais/grupo).

Os resultados observados a partir da quantificação de citocinas pró e anti-inflamatórias na medula espinhal dos camundongos WT ou PI3K γ ^{-/-} imunizados ou não com MOG corroboram com aqueles encontrados por estas mesmas análises realizadas no cérebro destes animais. O grupo WT-EAE de forma similar apresentou níveis elevados de citocinas pró e anti-inflamatórias nos 14^o e 21^o dpi em relação ao grupo KO-EAE, o qual demonstrou um menor quadro inflamatório e desmielinizante seguido de uma menor evolução clínica da EAE, tanto no cérebro como na medula espinhal.

4.11 Avaliação dos níveis das quimiocinas CCL5 e CCL20 em homogenato de linfonodos inguinais

Para analisar o efeito da deleção genética da enzima PI3K γ ^{-/-} na promoção da resposta imune do modelo de EAE em órgãos linfoides periféricos, foi realizada a quantificação dos níveis de produção das quimiocinas CCL5 e CCL20 em homogenato de linfonodos inguinais de animais WT ou PI3K γ ^{-/-} imunizados ou não, com 100 μ g de MOG₃₅₋₅₅, nos dias 14 e 21 pós-imunização (Fig. 30).

O grupo WT-EAE apresentou níveis elevados das quimiocinas CCL5 e CCL20 em relação aos demais grupos em ambos os pontos analisados. O grupo KO-EAE apresentou aumento na produção de ambas quimiocinas em relação aos grupos WT e KO tanto no 14^o como no 21^odpi (Fig. 30- A e B).

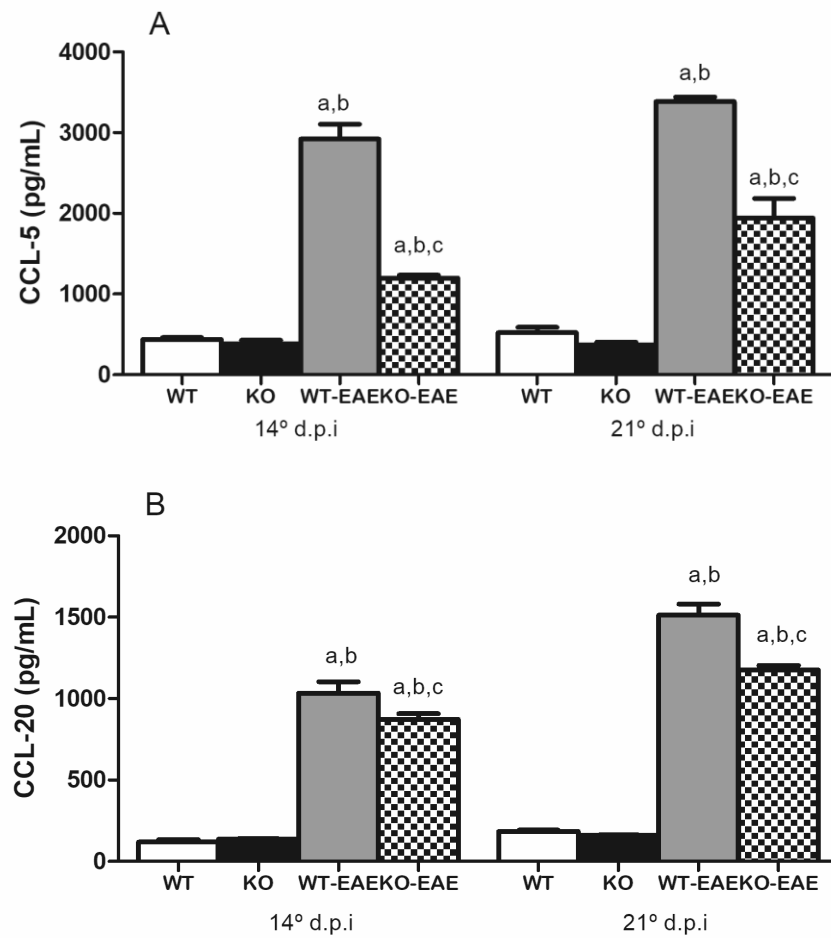


Figura 30 - Deficiência de PI3K γ reduz a produção de quimiocinas da EAE Avaliação da produção de quimiocinas CCL5 (A) e CCL20 (B) no sobrenadante de homogenato de linfonodos inguinais de camundongos WT ou PI3K γ ^{-/-} imunizados ou não com 100 μ g de peptídeo MOG₃₅₋₅₅, nos dias 14 e 21 após a imunização. a= p< 0,05 versus grupo WT, b= p< 0,05 versus grupo KO, c= p< 0,05 versus grupo WT-EAE (n= 6 animais/grupo).

4.12 Avaliação dos níveis das citocinas IFN- γ , IL-6, IL-17 e TGF- β em homogenato de linfonodos inguinais

Os níveis de produção das citocinas de perfil pró- inflamatório (IFN- γ , IL-6, IL-17 e TGF- β) foram determinados em homogenato de linfonodos inguinais de animais WT ou PI3K $\gamma^{-/-}$ imunizados ou não, com 100 μ g de MOG₃₅₋₅₅, nos dias 14 e 21 pós- imunização (Fig. 31).

A citocina IFN- γ , assim como IL-6, TGF- β e IL-17 apresentaram-se em níveis mais elevados no grupo WT-EAE em relação aos demais grupos nos dois pontos avaliados. Além disso, o grupo KO-EAE apresentou níveis reduzidos dessas citocinas em relação ao grupo WT-EAE nos dois pontos avaliados, porém em níveis elevados em relação aos grupos WT e KO (Fig. 31- A, B, C e D).

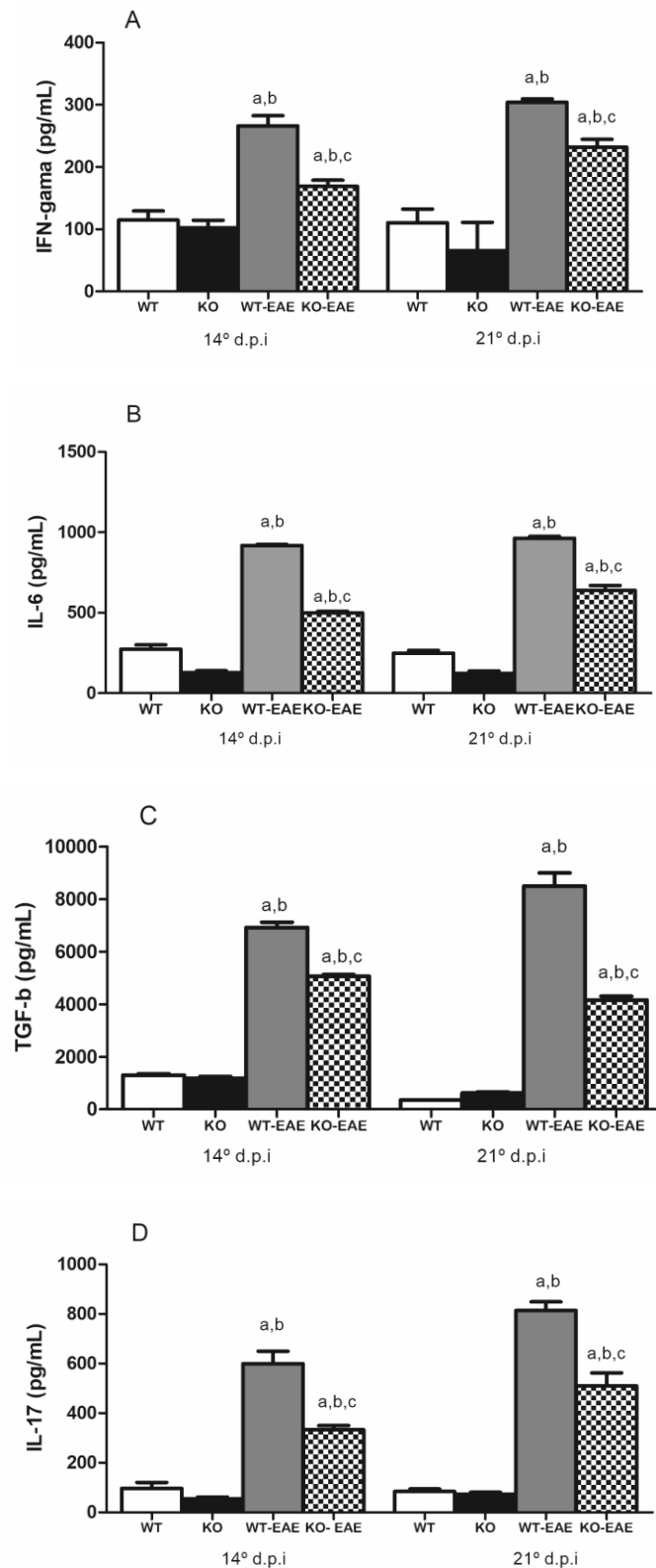


Figura 31 - Deficiência de PI3K γ reduz a produção de citocinas pró-inflamatórias na EAE. Avaliação da produção de citocinas pró-inflamatórias IFN- γ (A), IL-6 (B), TGF- β (C) e IL-17 (D) no sobrenadante de homogenato de linfonodos inguinais de camundongos WT ou PI3K $\gamma^{-/-}$ imunizados com 100 μ g de peptídeo MOG₃₅₋₅₅, nos dias 14 e 21 após a imunização. a= p< 0,05 versus grupo WT, b= p< 0,05 versus grupo KO, c= p< 0,05 versus grupo WT-EAE (n= 6 animais/grupo).

4.13 Avaliação dos níveis da citocina IL-10 em homogenato de linfonodos inguinais

Os níveis de produção da citocina de perfil anti- inflamatório IL-10 foi determinado em homogenato de linfonodos inguinais de animais WT ou PI3K γ ^{-/-} imunizados ou não, com 100 μ g de MOG₃₅₋₅₅, nos dias 14 e 21 pós-imunização (Fig. 32);

O grupo WT-EAE apresentou nível elevado de IL-10 em relação aos demais grupos no 14ºdpi, já no 21º dpi, só apresenta elevação de IL-10 em relação aos grupos WT e KO. O grupo KO-EAE apresentou níveis elevados de IL-10 em relação aos grupos WT e KO no 14º dpi, enquanto no 21º dia pós-imunização, o mesmo apresentou níveis maiores desta citocina em relação a todos os demais grupos (Fig. 32);

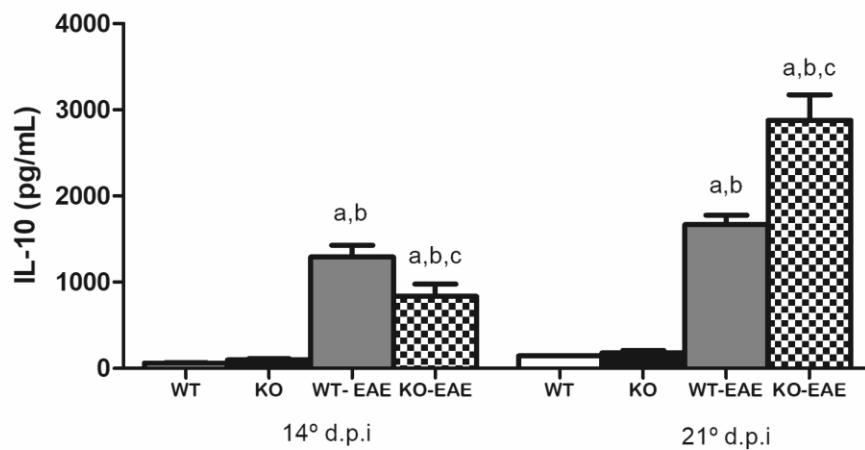


Figura 32- Deficiência de PI3K γ aumenta a produção da citocina anti-inflamatória IL-10 na EAE. Avaliação da produção da citocina anti-inflamatórias IL-10 no sobrenadante de homogenato de linfonodos inguinais de camundongos WT ou PI3K γ ^{-/-} imunizados com 100 μ g de peptídeo MOG₃₅₋₅₅, nos dias 14 e 21 após a imunização. a= p< 0,05 versus grupo WT, b= p< 0,05 versus grupo KO, c= p< 0,05 versus grupo WT-EAE (n= 6 animais/grupo).

Finalizando os resultados da quantificação de citocinas pró e anti-inflamatórias nos linfonodos inguinais de camundongos WT ou PI3K γ ^{-/-} imunizados ou não com MOG, pode-se notar que o grupo WT-EAE, de forma similar ao observado no cérebro e medula espinhal, apresentou níveis elevados de citocinas pró- inflamatórias nos 14^o e 21^o dpi em relação ao grupo KO-EAE. Porém, a citocina anti-inflamatória IL-10 esteve mais elevada no grupo KO-EAE em relação ao WT-EAE nos linfonodos inguinais no 21^o dpi, de forma não observada em nenhuma outra citocina no SNC durante a evolução clínica da EAE.

4.14 Avaliação da morte celular programada em células no SNC

Para avaliar a morte celular programada de células no SNC, cortes histológicos de medula espinhal de camundongos C57BL/6 WT ou PI3K^{-/-} imunizados com MOG₃₅₋₅₅ referentes aos 14^o e 21^o dpi da EAE foram submetidas à técnica de TUNEL. Esta técnica permite a marcação da fragmentação de DNA nuclear em células em processo de morte programada. A figura 29 mostra as imagens representativas de medulas espinhais através da técnica de TUNEL e a análise densitométrica quantitativa de células apoptóticas na medula espinhal dos animais.

O grupo WT- EAE apresentou maior número de células apoptóticas no 14^o dpi em relação ao grupo KO-EAE, o que se manteve no 21^odpi. Porém, quando se compara o número de células apoptóticas dos grupos entre os dois pontos avaliados, observa-se que o grupo WT-EAE obteve maior taxa de morte celular na medula espinhal no 21^o dpi em relação ao 14^o dpi e ainda em relação aos dois pontos analisados do grupo KO-EAE. Estes resultados mostram maior neurodegeneração nos animais WT no 21^o dpi, o que se apresenta compatível com a maior gravidade de sintomas da EAE observado neste ponto (Fig.33).

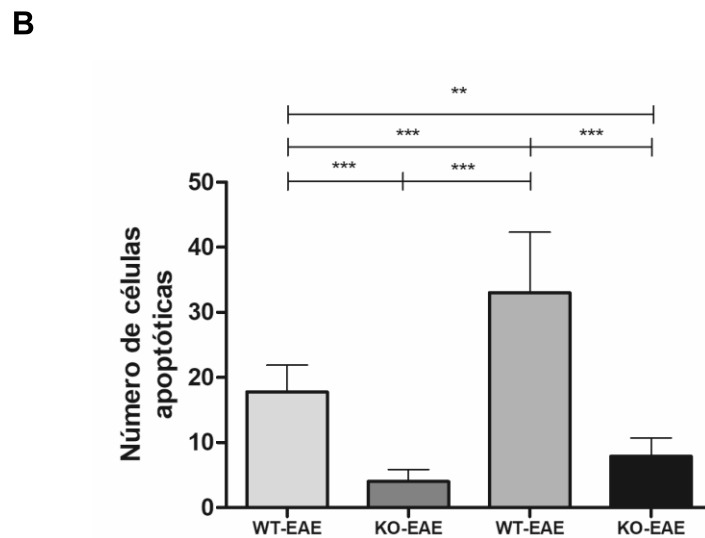
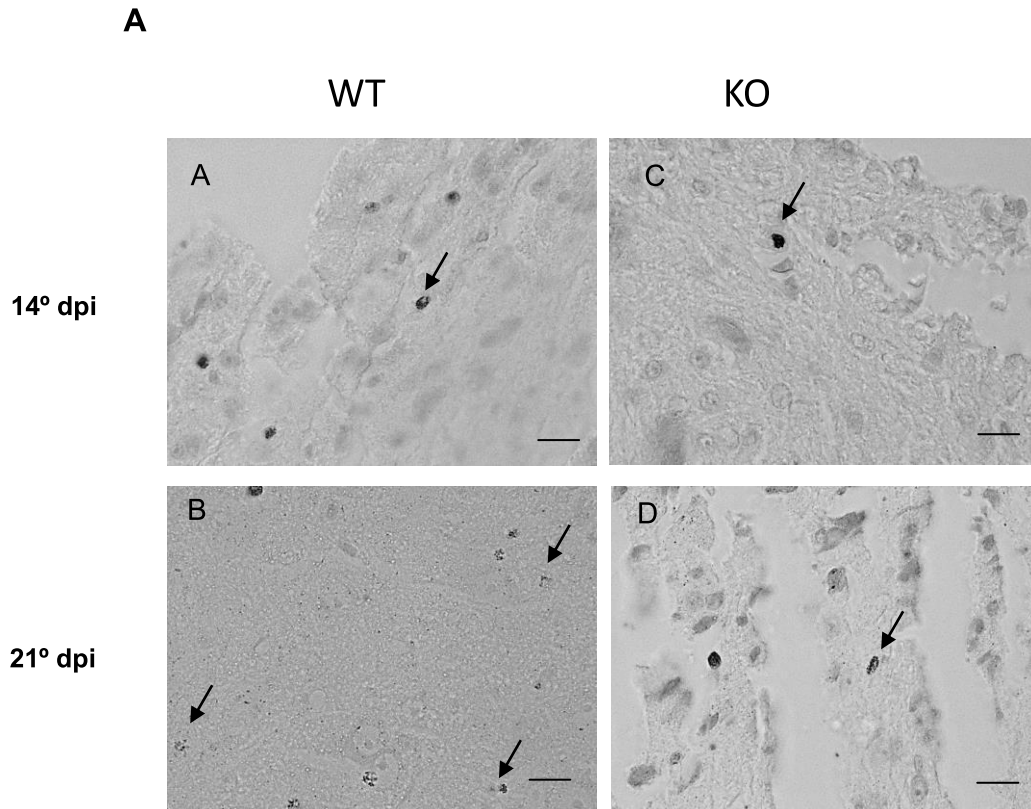


Figura 33- Deficiência de PI3K γ reduz a morte celular programada no SNC na EAE. Histopatologia de medula espinal de camundongos WT ou PI3K γ ^{-/-} imunizados com 100 μ g de peptídeo MOG₃₅₋₅₅ nos dias 14 e 21 após a imunização. 8 a 12 cortes representativos dos grupos examinados foram corados através da técnica de TUNEL. Setas indicam células em processo de morte programada. A) Imagens representativas dos cortes histológicos. B) Análise densitométrica quantitativa das células em processo de morte programada. Aumento Original: objetiva de 100X. Barra 20 μ m. Cada ponto representa a média \pm SEM. * $<0,1$, ** $<0,05$ e *** $<0,01$.

4.15 Avaliação do curso clínico da EAE após os tratamentos com o composto FTY720 ou seu análogo lipofílico

Para avaliar o efeito dos tratamentos com o composto FTY720 e de seu análogo lipofílico no desenvolvimento clínico da EAE, foi realizada a análise da evolução do quadro clínico da doença. Esta análise foi determinada através dos pontos atribuídos aos sinais clínicos apresentados na tabela 2.

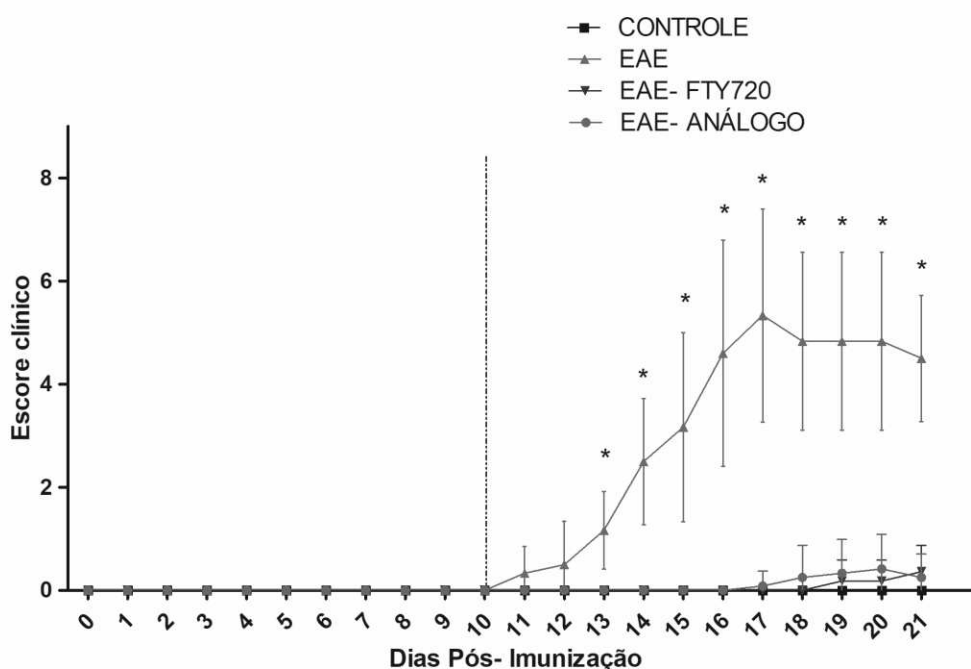


Figura 34 – FTY720 e seu análogo lipofílico inibem o desenvolvimento da EAE. Camundongos fêmeas C57BL/6 WT foram monitorados diariamente para os sinais clínicos da EAE após imunização com 100 µg de peptídeo MOG₃₅₋₅₅ e tratados ou não com o composto FTY720 ou seu análogo lipofílico. Cada ponto representa a média aritmética ± SEM. *, $p < 0,05$ quando comparados os animais EAE, EAE-FTY720 e EAE-ANÁLOGO aos animais controles ($n = 12$ animais/grupo imunizado). A linha pontilhada representa o dia em que se iniciaram os tratamentos.

De acordo com a figura 34, pode-se notar que os animais WT imunizados com MOG₃₅₋₅₅ e que não receberam nenhum tratamento apresentaram início dos sinais clínicos da EAE, como perda de tônus e fraqueza da cauda, por volta do 10º dpi. Além disso, o agravamento da evolução clínica deu-se a partir do 13ºdpi atingindo o pico do escore clínico no 17º dpi. Nos grupos em que os animais WT foram imunizados com MOG₃₅₋₅₅ e tratados com o composto FTY720 ou seu análogo lipofílico, apenas 4 animais de cada grupo (30%) desenvolveram sinais clínicos iniciais da doença, não apresentando evolução destes até o 21º dpi. Entre os grupos imunizados tratados e o grupo controle não imunizado, não houve diferença significativa entre os escores clínicos em nenhum ponto avaliado. Este resultado mostra que tanto o composto FTY720 como seu análogo lipofílico foram capazes de inibir a evolução clínica da EAE.

4.16 Avaliação do infiltrado inflamatório e desmielinização no cérebro após os tratamentos com FTY720 ou seu análogo lipofílico

A avaliação do infiltrado inflamatório no SNC foi realizada, no 21º dpi, em amostras de cérebro dos animais WT imunizados com o MOG₃₅₋₅₅, tratados com o composto FTY720 ou seu análogo lipofílico do 10º ao 20ºdpi.

A figura 35 mostra os cortes de cérebros corados com Hematoxilina-Eosina (HE), a qual foi utilizada para avaliação do infiltrado inflamatório.

O grupo EAE apresentou maior intensidade na infiltração de células no parênquima cerebral em relação aos grupos tratados, este infiltrado foi caracterizado como moderado, enquanto que os grupos EAE-FTY720 e EAE- ANÁLOGO apresentaram infiltrados inflamatórios discretos e, em alguns animais, esteve visível apenas nas áreas perivasculares. Não foram visualizados infiltrados inflamatórios no grupo controle (Fig. 35-A);

Ainda nesta figura, pode ser observado o escore inflamatório no cérebro dos animais imunizados com o MOG₃₅₋₅₅ e tratados com FTY720 ou o análogo, de acordo com XIAO et al., 2015), onde pode-se observar que os animais tratados EAE obtiveram redução do processo inflamatório no cérebro (Fig. 35-B).

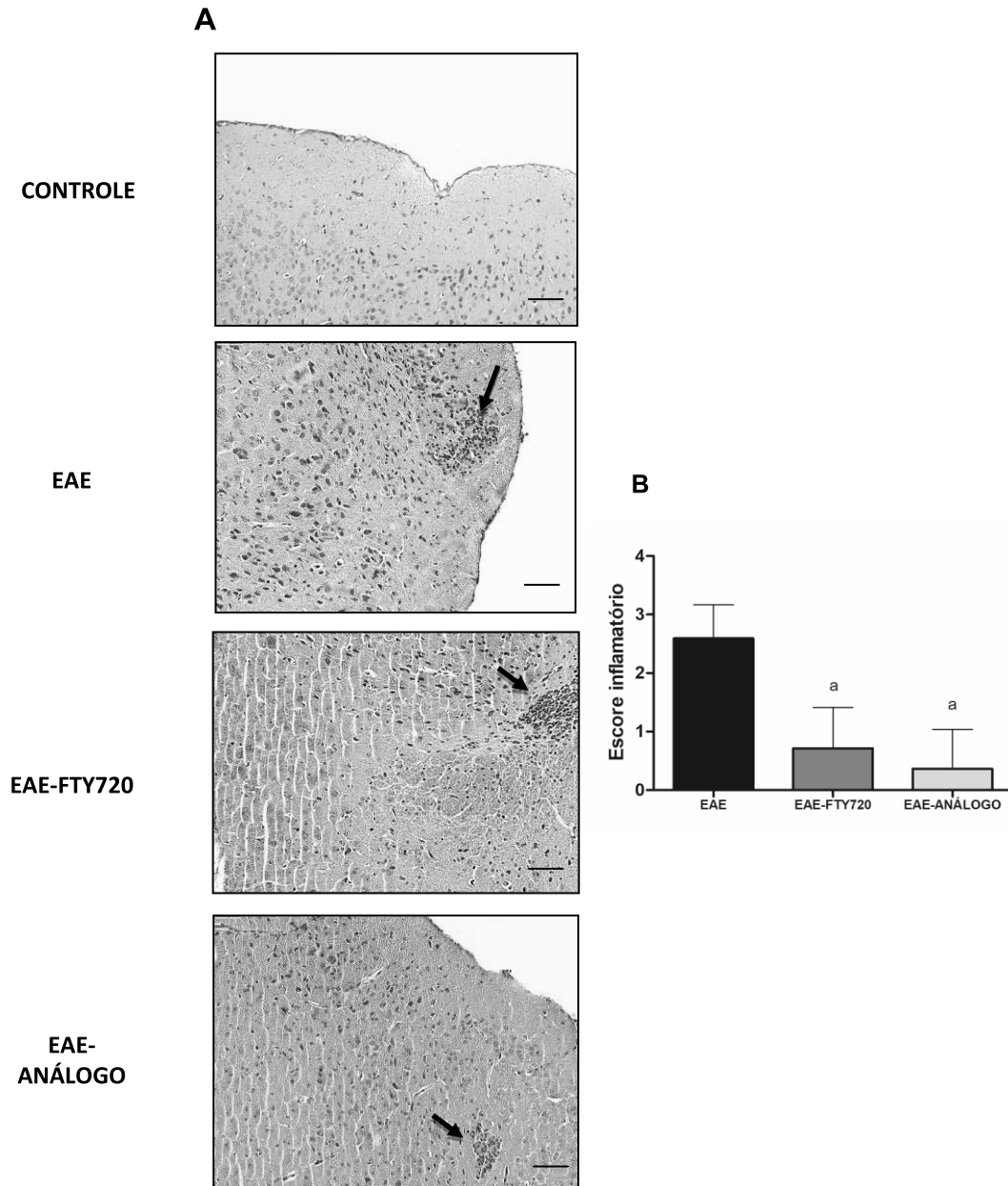


Figura 35- FTY720 e seu análogo lipofílico reduzem a presença de infiltrados inflamatórios no SNC. A) Histopatologia de cérebro de camundongos WT imunizados com 100 µg de peptídeo MOG₃₅₋₅₅ e tratados ou não com o composto FTY720 ou seu análogo lipofílico do 10^o ao 21^o dpi. Aumento Original: objetiva de 20X. Setas indicam os infiltrados celulares. Barra 50 µm. B) Escore inflamatório do cérebro. 8 a 12 cortes representativos dos grupos examinados foram corados com hematoxilina e eosina (H&E) para análise do infiltrado de célula. a= p< 0,05 versus grupo EAE, b= p< 0,05 versus grupo EAE-FTY720, c= p< 0,05 versus grupo EAE-ANÁLOGO.

A avaliação do processo de desmielinização no SNC também foi realizada, no 21º dpi, em amostras de cérebro dos animais WT imunizados com o MOG₃₅₋₅₅, tratados com o composto FTY720 ou seu análogo lipofílico do 10º ao 20ºdpi.

A figura 29 mostra os cortes de cérebros corados com Luxol Fast- Blue (LFB), a qual foi utilizada para avaliação da destruição mielínica (Fig. 36-A).

O grupo EAE apresentou maior número de focos de desmielinização no parênquima cerebral em relação aos grupos tratados, esta foi caracterizada como confluyente, enquanto que os grupos EAE-FTY720 e EAE- ANÁLOGO apresentaram vestígios de desmielinização subapical e, em alguns animais, esteve visível apenas nas áreas perivasculares, de forma compatível com a presença dos infiltrados inflamatórios observados pela coloração de H&E. Não foram focos de desmielinização no grupo controle (Fig. 36-A);

A mesma figura ainda apresenta o escore de desmielinização observado no cérebro dos animais imunizados com o MOG₃₅₋₅₅ e tratados com FTY720 ou o análogo, de acordo com ABDUL-MAJID et al., 2003), onde pode-se observar que os animais tratados EAE obtiveram redução da destruição mielínica no cérebro, de forma compatível com a redução do processo inflamatório e evolução clínica da doença (Fig. 36-B).

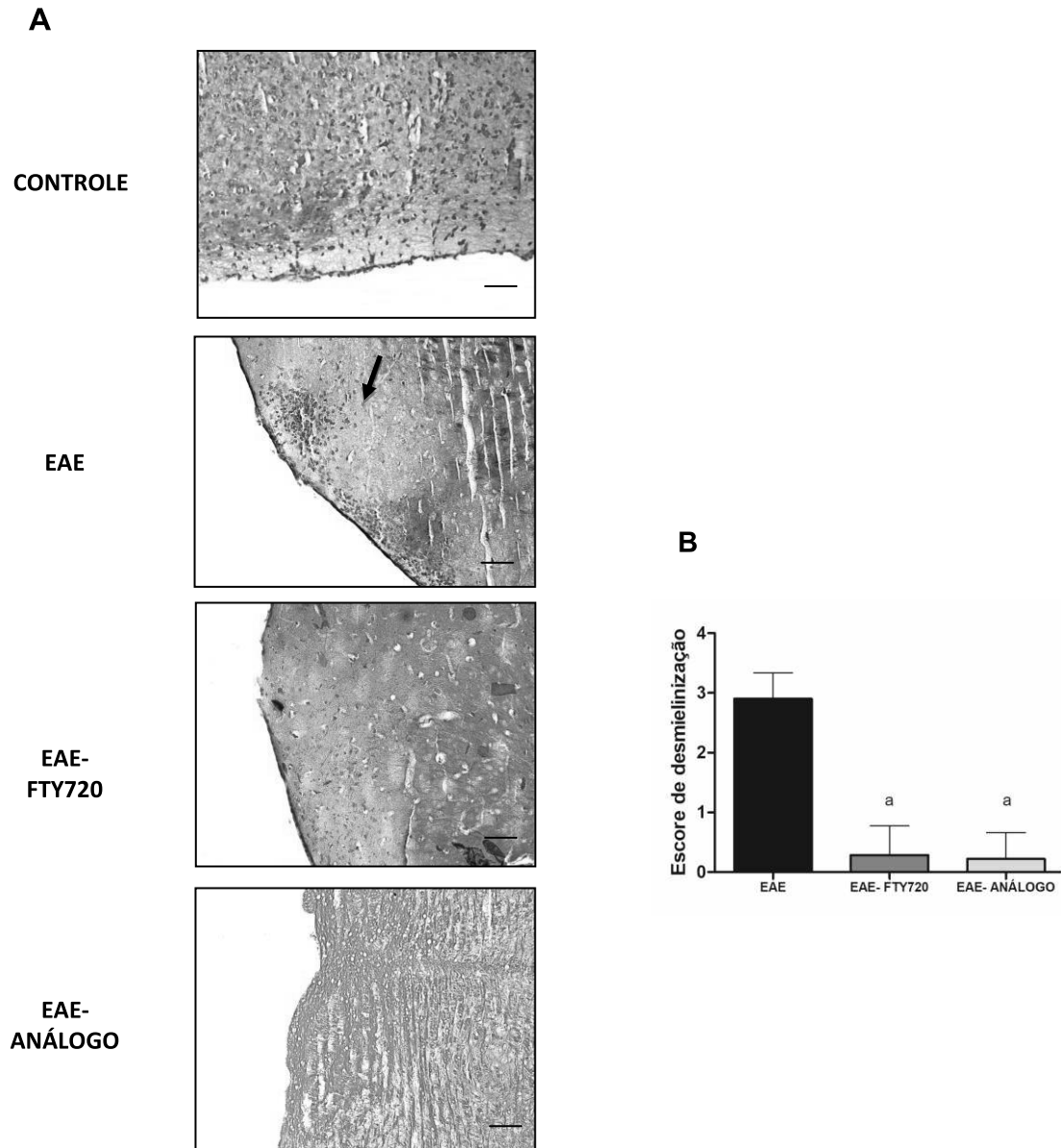


Figura 36- FTY720 e seu análogo lipofílico reduzem a desmielinização. A) Histopatologia de cérebro de camundongos WT imunizados com 100 µg de peptídeo MOG₃₅₋₅₅ e tratados ou não com o composto FTY720 ou seu análogo lipofílico do 10^o ao 21^o dpi. Aumento Original: objetiva de 20X. Setas indicam os focos de desmielinização. Barra 50 µm. B) Escore de desmielinização do cérebro. 8 a 12 cortes representativos dos grupos examinados foram corados com Luxol Fast- Blue (LFB) para análise da desmielinização. a= $p < 0,05$ versus grupo EAE, b= $p < 0,05$ versus grupo EAE-FTY720, c= $p < 0,05$ versus grupo EAE-ANÁLOGO.

4.17 Avaliação do infiltrado inflamatório e desmielinização na medula espinhal após os tratamentos com FTY720 ou seu análogo lipofílico

A avaliação do infiltrado inflamatório no SNC foi realizada ainda, no 21º dpi, em amostras de medula espinhal dos animais WT imunizados com o MOG₃₅₋₅₅, tratados com o composto FTY720 ou seu análogo lipofílico do 10º ao 20ºdpi.

A figura 37 mostra os cortes de medula espinhal corados com Hematoxilina-Eosina (HE), a qual foi utilizada para avaliação do infiltrado inflamatório (Fig. 37-A).

O grupo EAE apresentou maior intensidade na infiltração de células na região parenquimática da medula espinhal em relação aos grupos tratados, esta infiltração foi caracterizada como moderado, enquanto que os grupos EAE-FTY720 e EAE-ANÁLOGO apresentaram infiltrados inflamatórios discretos e, em alguns animais, esteve visível apenas nas áreas perivasculares. Não foram visualizados infiltrados inflamatórios no grupo controle (Fig. 37-A);

Ainda nesta figura, pode ser observado o escore inflamatório na medula espinhal dos animais imunizados com o MOG₃₅₋₅₅ e tratados com FTY720 ou o análogo, de acordo com XIAO et al., 2015), onde pode-se observar que os animais tratados EAE obtiveram redução do processo inflamatório na medula espinhal, assim como o observado no cérebro (Fig. 37-B).

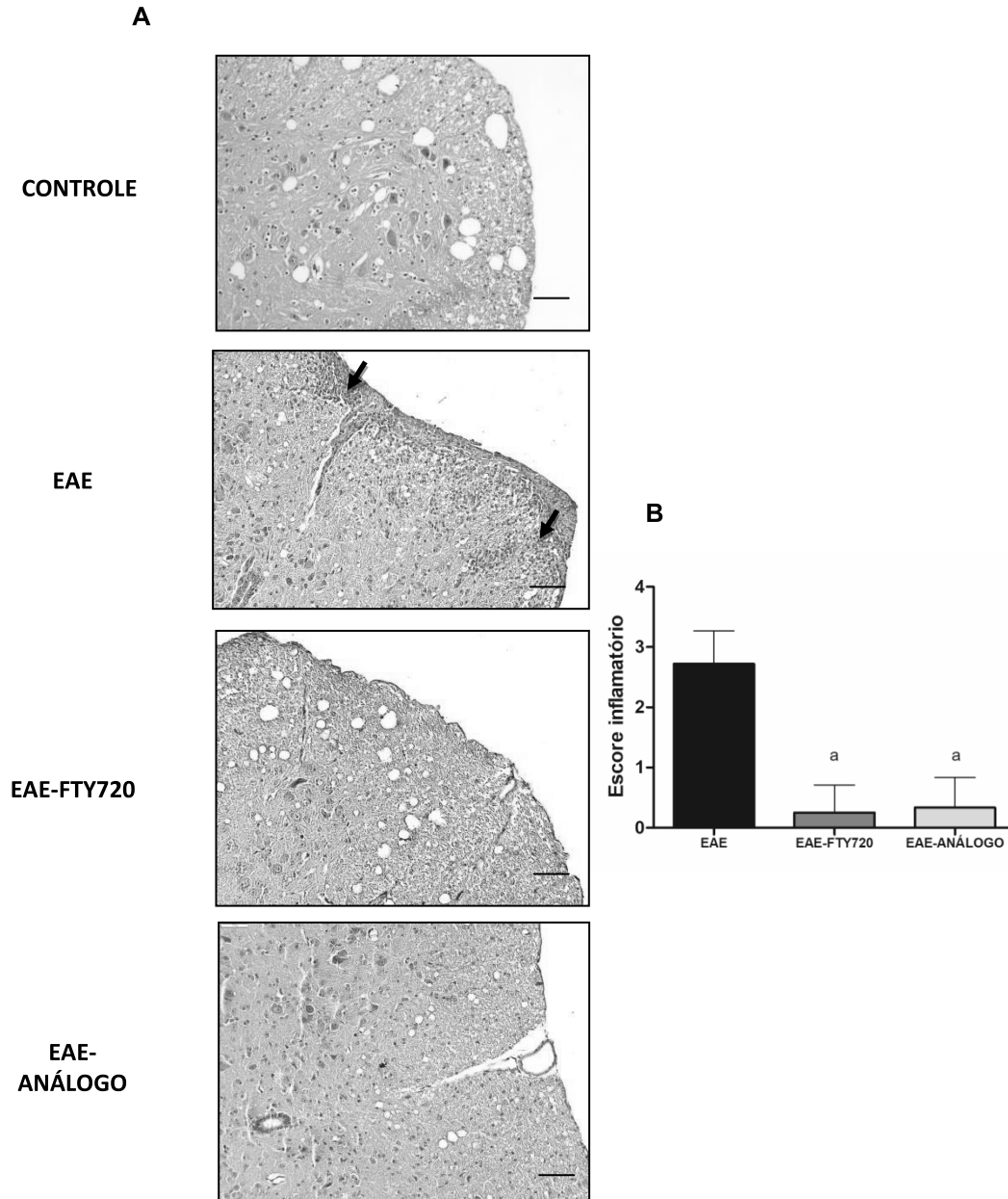


Figura 37- FTY720 e seu análogo lipofílico reduzem a presença de infiltrados inflamatórios no SNC. A) Histopatologia de medula espinal de camundongos WT imunizados com 100 μ g de peptídeo MOG₃₅₋₅₅ e tratados ou não com o composto FTY720 ou seu análogo lipofílico do 10^o ao 21^o dpi. Aumento Original: objetiva de 20X. Setas indicam os infiltrados celulares. Barra 50 μ m. B) Escore inflamatório da medula espinal. 8 a 12 cortes representativos dos grupos examinados foram corados com hematoxilina e eosina (H&E) para análise do infiltrado de células. a= $p < 0,05$ versus grupo EAE, b= $p < 0,05$ versus grupo EAE-FTY720, c= $p < 0,05$ versus grupo EAE-ANÁLOGO.

A avaliação do processo de desmielinização no SNC também foi realizada, no 21º dpi, em amostras de medula espinhal dos animais WT imunizados com o MOG₃₅₋₅₅, tratados com o composto FTY720 ou seu análogo lipofílico do 10º ao 20ºdpi.

A figura 38 mostra os cortes de medula espinhal corados com Luxol Fast- Blue (LFB), a qual foi utilizada para avaliação da destruição mielínica (Fig. 38-A);

O grupo EAE apresentou focos de desmielinização caracterizados como confluente nas regiões perivasculares, enquanto que os animais dos grupos EAE-FTY720 e EAE- ANÁLOGO não apresentaram focos de desmielinização, assim como o grupo controle (Fig. 38-A);

A mesma figura ainda apresenta o escore de desmielinização observado na medula espinhal dos animais imunizados com o MOG₃₅₋₅₅ e tratados com FTY720 ou o análogo, de acordo com ABDUL-MAJID et al., 2003), onde pode-se observar que os animais tratados EAE obtiveram redução da destruição mielínica na medula espinhal, de forma compatível com a redução do processo inflamatório e evolução clínica da doença (Fig. 38-B).

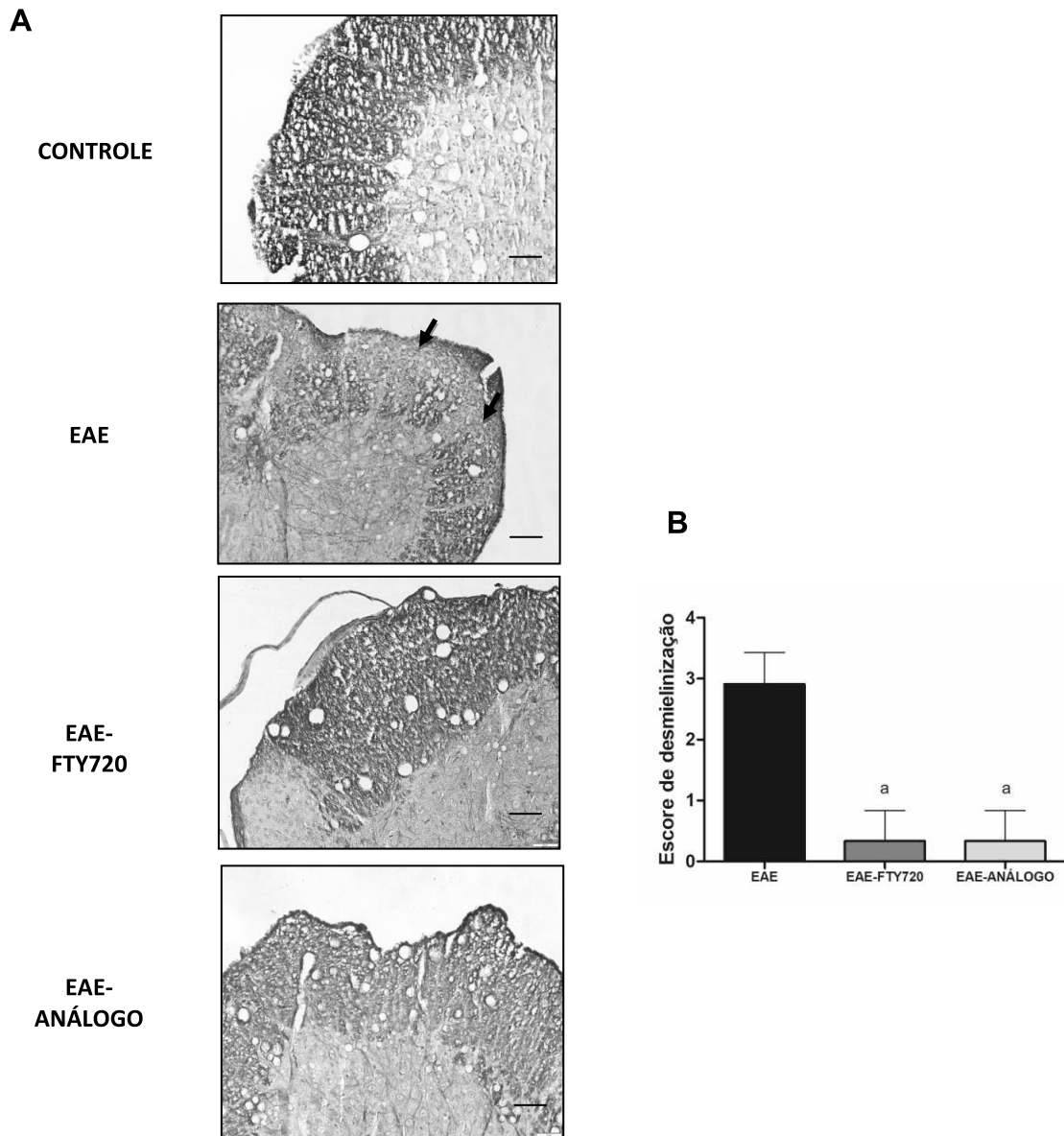


Figura 38- FTY720 e seu análogo lipofílico reduzem a desmielinização. A) Histopatologia de medula espinhal de camundongos WT imunizados com 100 μ g de peptídeo MOG₃₅₋₅₅ e tratados ou não com o composto FTY720 ou seu análogo lipofílico do 10^o ao 21^o dpi. Aumento Original: objetiva de 20X. Setas indicam os focos de desmielinização. Barra 50 μ m. B) Escore de desmielinização da medula espinhal. 8 a 12 cortes representativos dos grupos examinados foram corados com Luxol Fast- Blue (LFB) para análise da desmielinização. a= $p < 0,05$ versus grupo EAE, b= $p < 0,05$ versus grupo EAE-FTY720, c= $p < 0,05$ versus grupo EAE-ANÁLOGO.

4.18 Avaliação dos níveis das quimiocinas CCL5 e CCL20 em homogenato de cérebro após os tratamentos com o composto FTY720 ou seu análogo lipofílico

Para analisar o efeito dos tratamentos com o composto FTY720 e de seu análogo lipofílico na quimioatração celular para o SNC, foi realizada a quantificação dos níveis de produção das quimiocinas CCL5 e CCL20, no 21º dpi, em homogenato de cérebro de animais WT imunizados ou não, com 100µg de MOG₃₅₋₅₅ e tratados com os compostos do dia 10º dpi até o 21º dpi (Fig. 39).

O grupo EAE apresentou níveis elevados das quimiocinas CCL5 e CCL20 em relação aos demais grupos. O grupo EAE- FTY apresentou redução de ambas quimiocinas em relação ao grupo EAE. O grupo EAE- ANÁLOGO apresentou redução de ambas quimiocinas em relação ao grupo EAE e ainda a produção de CCL5 neste grupo foi menor que a observada no grupo EAE- FTY720 (Fig. 39- A e B).

O grupo EAE-FTY720 apresentou aumento da quimiocina CCL5 em relação ao grupo controle, enquanto que o grupo EAE-ANÁLOGO não obteve diferença significativa em relação ao grupo controle para esta quimiocina. Com relação à quimiocina CCL20, os grupos tratados não obtiveram diferenças em relação ao grupo controle (Fig. 39- B).

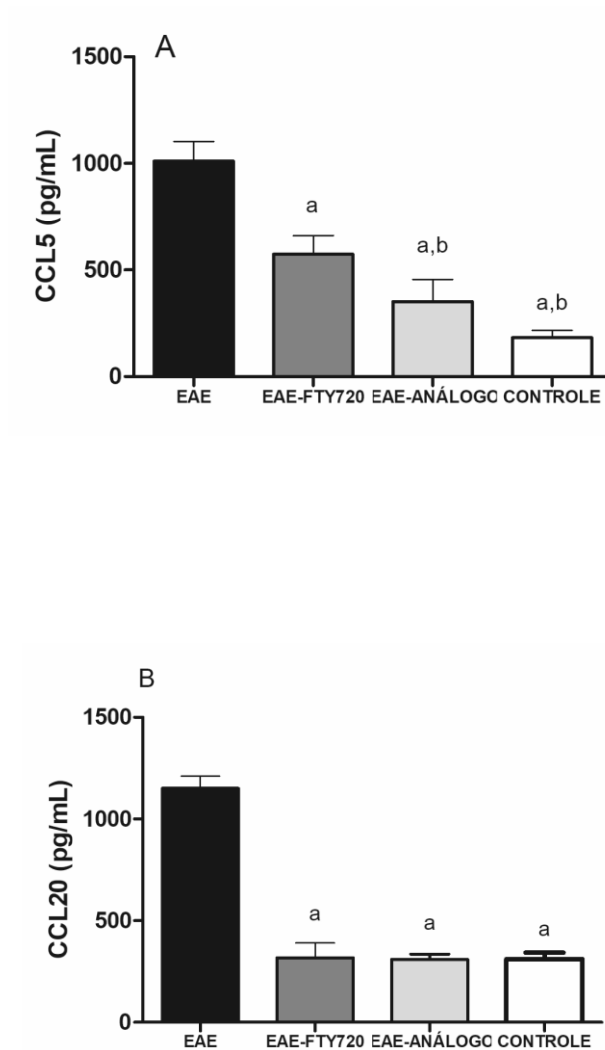


Figura 39 - FTY720 e seu análogo lipofílico inibem a produção de quimiocinas da EAE Avaliação da produção de quimiocinas CCL5 (A) e CCL20 (B) no sobrenadante de homogenato de cérebro de camundongos WT imunizados ou não com 100 µg de peptídeo MOG₃₅₋₅₅ e tratados ou não com o composto FTY720 ou seu análogo lipofílico do 10^o ao 21^o dpi. a= p< 0,05 versus grupo EAE, b= p< 0,05 versus grupo EAE-FTY720, c= p< 0,05 versus grupo EAE-ANÁLOGO (n= 6 animais/grupo).

4.19 Avaliação dos níveis das citocinas IFN- γ , IL-17 e IL-10 em homogenato de cérebro após os tratamentos com o composto FTY720 ou seu análogo lipofílico

Os níveis de produção das citocinas IFN- γ , IL-17 e IL-10 foram determinados em homogenato de cérebro de animais WT, no 21^o dpi, imunizados ou não, com 100 μ g de MOG₃₅₋₅₅ e tratados com os compostos do dia 10^o dpi até o 21^o dpi (Fig. 40).

A citocina IFN- γ apresentou-se em níveis mais elevados no grupo EAE em relação aos grupos EAE- ANÁLOGO e controles, porém não foi significativa a sua redução em relação ao grupo EAE-FTY-720. O grupo EAE- ANÁLOGO foi capaz de reduzir a produção de IFN- γ em relação aos grupos EAE e EAE-FTY720, porém em relação ao grupo controle não houve diferença significativa (Fig. 40-A);

A citocina IL-17 teve sua maior produção no grupo EAE, de forma semelhante à citocina IFN- γ , embora esta citocina tenha sido reduzida em todos os demais grupos. Entre os grupos EAE tratados e o grupo controle não houve diferença significativa. (Fig. 40- B);

A citocina IL-10 teve sua maior produção no grupo FTY720 em relação a todos os demais grupos. O grupo EAE- ANÁLOGO teve uma produção menor de IL-10 em relação ao grupo EAE-FTY720. Todos os grupos induzidos apresentaram níveis de IL-10 superiores ao grupo controle (Fig. 40- C).

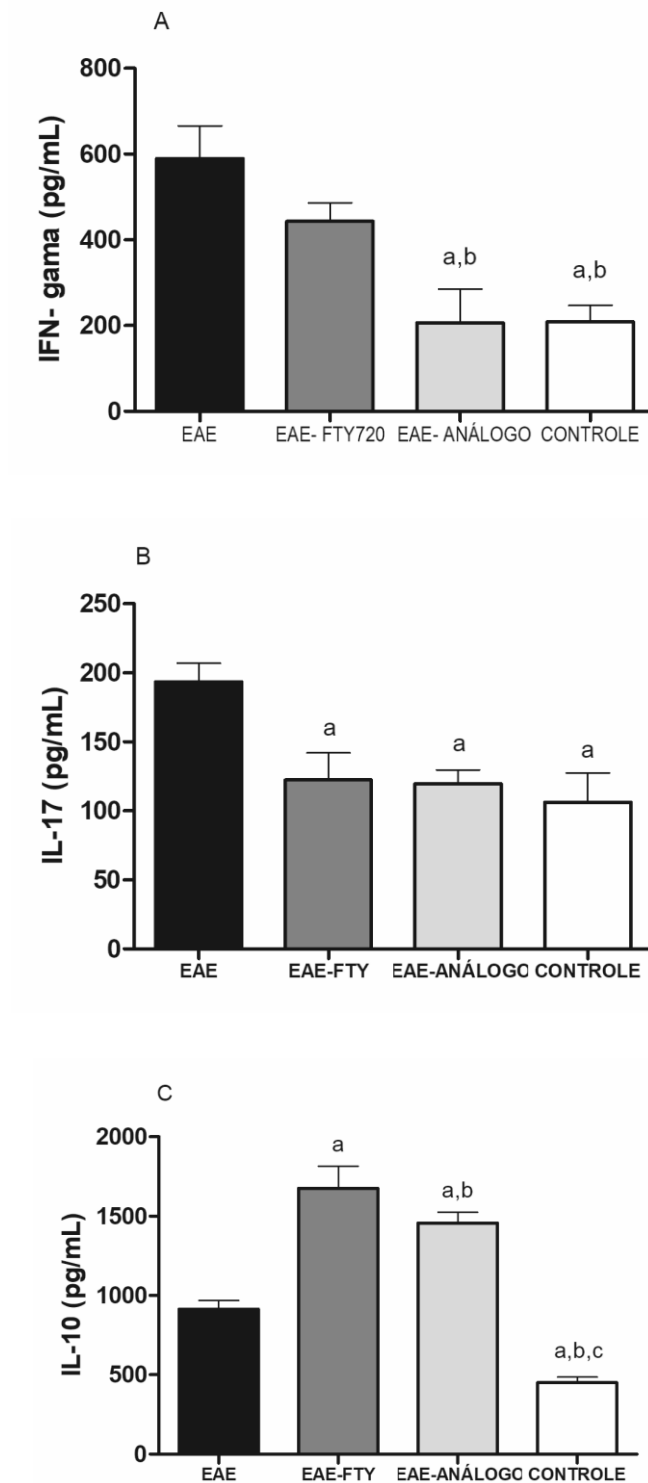


Figura 40 - FTY720 e seu análogo lipofílico inibem a produção de citocinas pró-inflamatórias e elevam a produção de IL-10 da EAE. Avaliação da produção de citocinas IFN-gama (A), IL-17 (B) e IL-10 (C) no sobrenadante de homogenato de cérebro de camundongos WT imunizados ou não com 100 µg de peptídeo MOG₃₅₋₅₅ e tratados ou não com o composto FTY720 ou seu análogo lipofílico do 10^o ao 21^o dpi. a= p< 0,05 versus grupo EAE, b= p< 0,05 versus grupo EAE-FTY720, c= p< 0,05 versus grupo EAE-ANÁLOGO (n= 6 animais/grupo).

4.20 Avaliação dos níveis das quimiocinas CCL5 e CCL20 em homogenato de medula espinhal após os tratamentos com o composto FTY720 ou seu análogo lipofílico

A análise do efeito dos tratamentos com o composto FTY720 e de seu análogo lipofílico na quimioatração celular para o SNC, também foi realizada através da quantificação dos níveis de produção das quimiocinas CCL5 e CCL20, no 21º dpi, em homogenato de medula espinhal de animais WT imunizados ou não, com 100µg de MOG₃₅₋₅₅ e tratados com os compostos do dia 10º dpi até o 21º dpi (Fig. 41);

O grupo EAE apresentou níveis elevados das quimiocinas CCL5 e CCL20 em relação aos demais grupos. Os grupos EAE- FTY e EAE-ANÁLOGO apresentaram redução de ambas quimiocinas em relação ao grupo EAE, porém, não houve diferença significativa entre os tratamentos (Fig. 41- A e B);

Os grupos tratados também não apresentaram diferença significativa em relação ao grupo controle para ambas quimiocinas (Fig. 41- A e B).

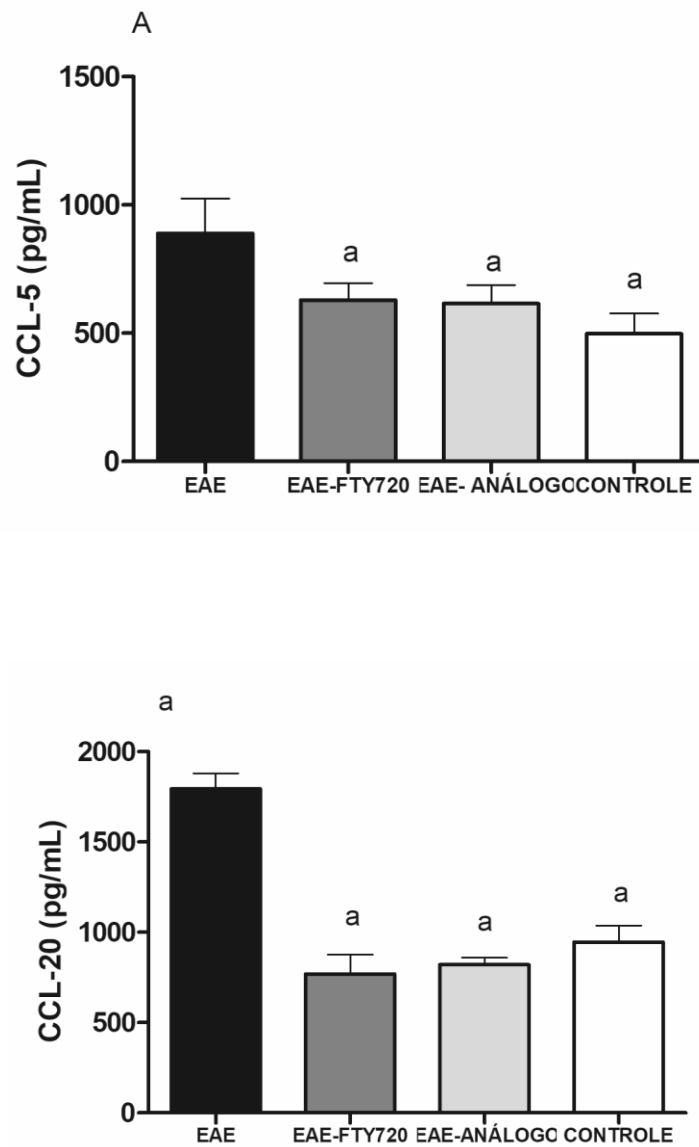


Figura 41 - FTY720 e seu análogo lipofílico inibem a produção de quimiocinas da EAE Avaliação da produção de quimiocinas CCL5 (A) e CCL20 (B) no sobrenadante de homogenato de medula espinhal de camundongos WT imunizados ou não com 100 µg de peptídeo MOG₃₅₋₅₅ e tratados ou não com o composto FTY720 ou seu análogo lipofílico do 10^o ao 21^o dpi. a= p< 0,05 versus grupo EAE, b= p< 0,05 versus grupo EAE-FTY720, c= p< 0,05 versus grupo EAE-ANÁLOGO (n= 6 animais/grupo).

4.21 Avaliação dos níveis das citocinas IFN- γ , IL-17 e IL-10 em homogenato de medula espinhal após os tratamentos com o composto FTY720 ou seu análogo lipofílico

Os níveis de produção das citocinas IFN- γ , IL-17 e IL-10 foram também determinados em homogenato de medula espinhal de animais WT, no 21^o dpi, imunizados ou não, com 100 μ g de MOG₃₅₋₅₅ e tratados com os compostos do dia 10^o dpi até o 21^o dpi (Fig. 42).

A citocina IFN- γ apresentou-se em níveis mais elevados no grupo EAE em relação aos demais grupos. Os grupos EAE-FTY720 e o EAE-ANÁLOGO apresentaram aumento de IFN- γ em relação ao grupo controle, porém, o grupo EAE-ANÁLOGO obteve maior redução da produção de IFN- γ em relação ao grupo EAE-FTY720 (Fig. 42-A);

A citocina IL-17 teve sua maior produção no grupo EAE, de forma semelhante à citocina IFN- γ , embora esta citocina tenha sido reduzida em todos os demais grupos. Entre os grupos EAE tratados e o grupo controle não houve diferença significativa. (Fig. 42- B);

A citocina IL-10 teve sua maior produção nos grupos EAE-FTY720 e EAE-ANÁLOGO em relação aos grupos EAE e controle, porém não houve diferença significativa entre ambos os grupos. Todos os grupos induzidos apresentaram níveis de IL-10 superiores ao grupo controle (Fig. 42- C).

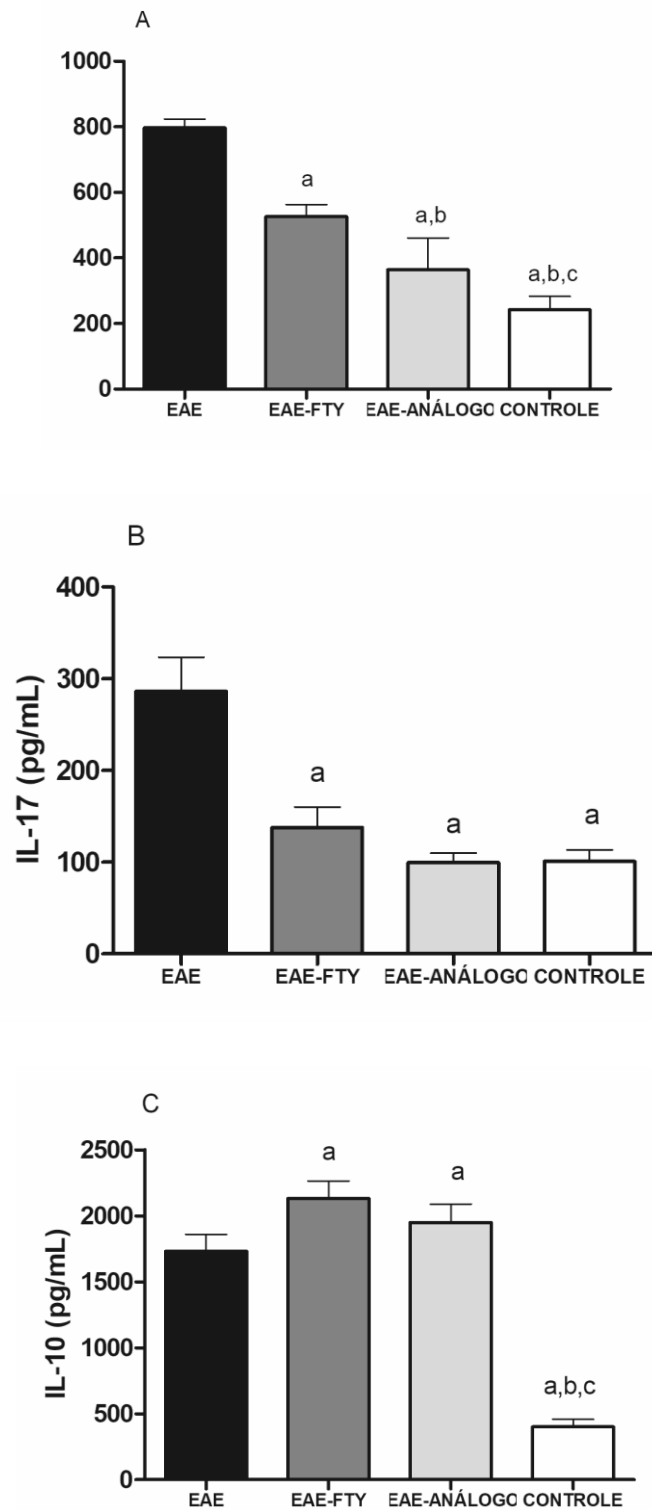


Figura 42 - FTY720 e seu análogo lipofílico inibem a produção de citocinas pró-inflamatórias e elevam a produção de IL-10 da EAE. Avaliação da produção de citocinas IFN-gama (A), IL-17 (B) e IL-10 (C) no sobrenadante de homogenato de medula espinhal de camundongos WT imunizados ou não com 100 µg de peptídeo MOG₃₅₋₅₅ e tratados ou não com o composto FTY720 ou seu análogo lipofílico do 10^o ao 21^o dpi. a= p< 0,05 versus grupo EAE, b= p< 0,05 versus grupo EAE-FTY720, c= p< 0,05 versus grupo EAE-ANÁLOGO (n= 6 animais/grupo).

4.22 Avaliação dos níveis das quimiocinas CCL5 e CCL20 em homogenato de linfonodos inguinais após os tratamentos com o composto FTY720 ou seu análogo lipofílico

Para analisar o efeito dos tratamentos com o composto FTY720 e de seu análogo lipofílico na quimioatração celular para os linfonos inguinais, foi realizada a quantificação dos níveis de produção das quimiocinas CCL5 e CCL20, no 21º dpi, em homogenato de linfonodos inguinais de animais WT imunizados ou não, com 100µg de MOG₃₅₋₅₅ e tratados com os compostos do dia 10º dpi até o 21º dpi (Fig. 43);

O grupo EAE apresentou níveis elevados das quimiocinas CCL5 e CCL20 em relação aos demais grupos. Os grupos EAE-FTY e EAE-ANÁLOGO apresentaram redução de ambas quimiocinas em relação ao grupo EAE, porém, não houve diferença significativa nos níveis de CCL5 e CCL20 entre os tratamentos (Fig. 43- A e B);

O grupo controle apresentou menor produção das quimiocinas em relação a todos os outros grupos (Fig. 43- B).

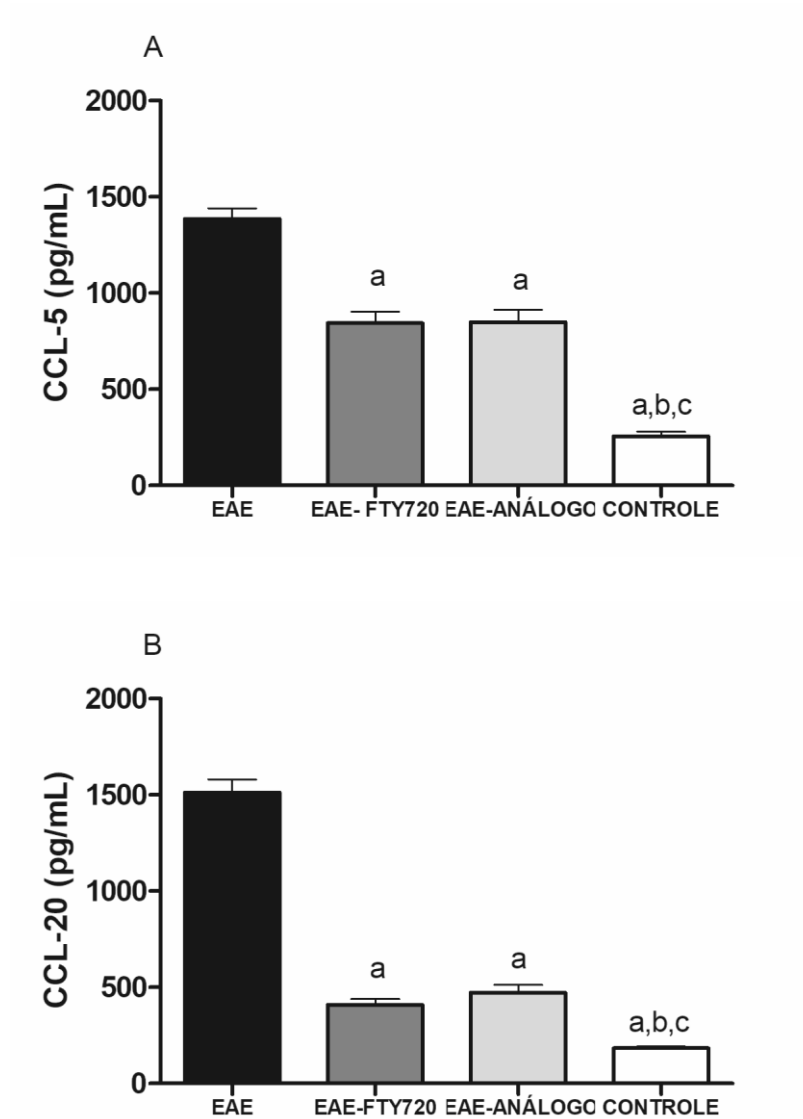


Figura 43 - FTY720 e seu análogo lipofílico inibem a produção de quimiocinas da EAE Avaliação da produção de quimiocinas CCL5 (A) e CCL20 (B) no sobrenadante de homogenato de linfonodos inguinais de camundongos WT imunizados ou não com 100 µg de peptídeo MOG₃₅₋₅₅ e tratados ou não com o composto FTY720 ou seu análogo lipofílico do 10^o ao 21^o dpi. a= p< 0,05 *versus* grupo EAE, b= p< 0,05 *versus* grupo EAE-FTY720, c= p< 0,05 *versus* grupo EAE-ANÁLOGO (n= 6 animais/grupo).

4.23 Avaliação dos níveis das citocinas IFN- γ , IL-17 e IL-10 em homogenato de linfonodos inguinais após os tratamentos com o composto FTY720 ou seu análogo lipofílico

Os níveis de produção das citocinas IFN- γ , IL-17 e IL-10 foram também determinados em homogenato de linfonodos inguinais de animais WT, no 21º dpi, imunizados ou não, com 100 μ g de MOG₃₅₋₅₅ e tratados com os compostos do dia 10º dpi até o 21º dpi (Fig. 44).

As citocinas IFN- γ e IL-17 apresentaram-se em níveis mais elevados no grupo EAE em relação aos demais grupos. Os grupos EAE tratados não apresentaram diferença significativa entre eles, assim como quando comparados com o grupo controle (Fig. 44-A e B);

A citocina IL-10 teve sua maior produção nos grupos EAE-FTY720 e EAE-ANÁLOGO em relação aos grupos EAE e controle, porém não houve diferença significativa entre ambos os grupos. Todos os grupos induzidos apresentaram níveis de IL-10 superiores ao grupo controle (Fig. 44- C).

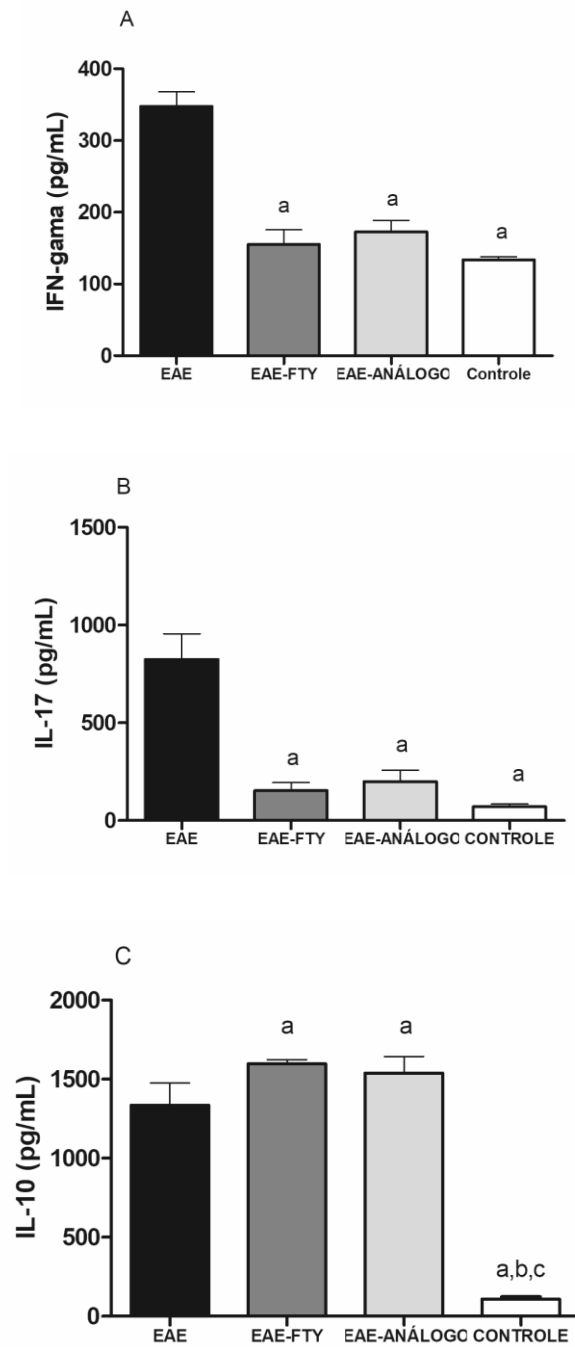


Figura 44 - FTY720 e seu análogo lipofílico inibem a produção de citocinas pró-inflamatórias e elevam a produção de IL-10 da EAE. Avaliação da produção de citocinas IFN-gama (A), IL-17 (B) e IL-10 (C) no sobrenadante de homogenato de linfonodos inguinais de camundongos WT imunizados ou não com 100 µg de peptídeo MOG₃₅₋₅₅ e tratados ou não com o composto FTY720 ou seu análogo lipofílico do 10^o ao 21^o dpi. a= p< 0,05 versus grupo EAE, b= p< 0,05 versus grupo EAE-FTY720, c= p< 0,05 versus grupo EAE-ANÁLOGO (n= 6 animais/grupo).

4.24 Avaliação do efeito dos tratamentos com o composto FTY720 e seu análogo lipofílico na fosforilação de Akt na medula espinhal na EAE

Uma vez o composto FTY720 e seu análogo lipofílico tendo apresentado efeitos significativos na inibição da evolução clínica da EAE induzida por MOG₃₅₋₅₅ em camundongos selvagens da linhagem C57BL/6, foi investigado se estes tratamentos seriam capazes de interferir na fosforilação da proteína Akt no SNC. Para isso, foi determinada a razão entre os níveis de expressão da proteína Akt fosforilada em relação à Akt total, no 21º dpi, na medula espinhal dos camundongos EAE tratados com o FTY720 ou seu análogo lipofílico do 10º ao 21º dpi, através da técnica de Western Blotting (Fig. 45);

Pode-se notar que o grupo WT-EAE apresentou maior nível de expressão de pAKT em relação aos grupos controles e tratados no 21º dpi, o que indica maior ativação da via PI3K/Akt neste grupo. Com relação aos grupos tratados com FTY-720 e seu análogo, não houve diferenças significativas entre estes e o grupo controle (Fig.45).

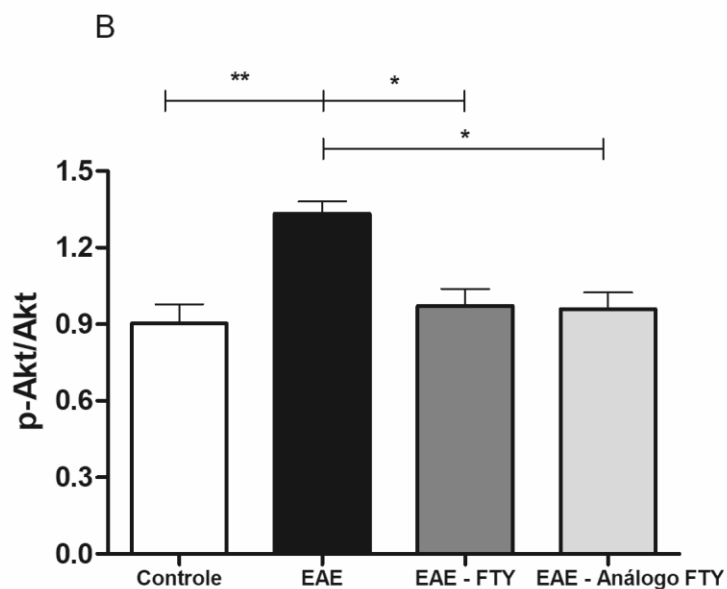
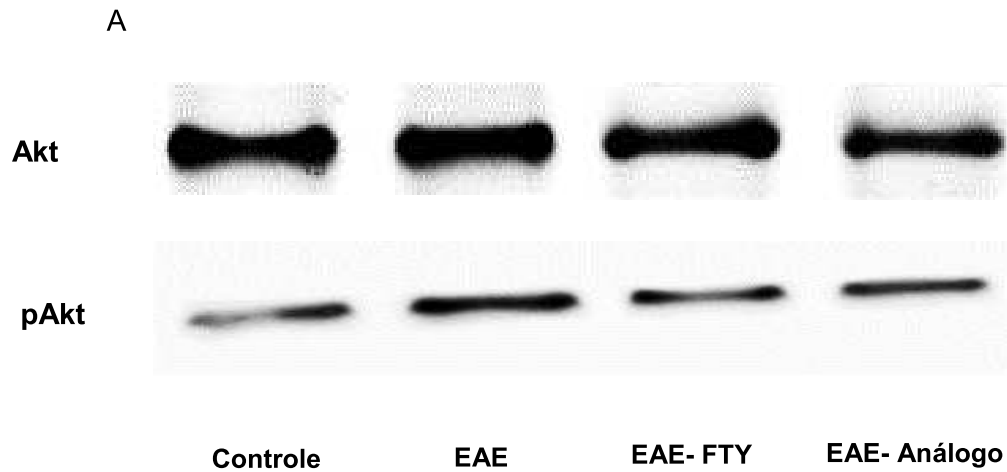


Figura 45- FTY720 e seu análogo lipofílico reduzem a expressão de p-Akt na EAE. Imunorreatividade de p-Akt na medula espinhal de camundongos WT imunizados ou não com 100 µg de peptídeo MOG₃₅₋₅₅ e tratados ou não com o composto FTY720 ou seu análogo lipofílico do 10º ao 21º dpi. A) Análise densitométrica quantitativa de fosfo-Akt normalizada para controle de carga de Akt total. B) Imagens representativas dos Western blots. Cada ponto representa a média ± SEM. * $<0,1$, ** $<0,05$ e *** $<0,01$. (n=6 animais/grupo).

5 DISCUSSÃO

A EM é uma doença inflamatória crônica do SNC, de origem autoimune, que é caracterizada por um processo de destruição da bainha de mielina presente nos axônios dos neurônios, gerando problemas na condução nervosa, muitas vezes graves e incapacitantes para o paciente. Além disso, a predisposição genética, mimetismo molecular, deficiência de vitaminas e minerais, localização geográfica também são fatores etiológicos que podem contribuir para o desencadeamento da doença. Atualmente, mais de 2,5 milhões de indivíduos são afetados pela doença, a qual propicia tanto um incremento nos custos financeiros em saúde pública, gerando um custo estimado de US\$ 2-3 bilhões por ano, quanto à ocorrência de problemas psicológicos, uma vez que afeta a qualidade de vida dos pacientes e seus familiares (COMPSTON et al. 2002; GRYTEN et al. 2015).

Os mecanismos fisiopatológicos da EM envolvem predominantemente células T autorreativas, como as T helper CD4⁺ Th1 e as células Th17, levando a secreção de citocinas e ativação de uma cascata inflamatória resultando em desmielinização no cérebro e medula espinhal, além de auto-anticorpos produzidos e secretados por células B autorreativas (GAFSON et al. 2012; MAHAD et al. 2015). Um dos eventos de destaque na doença é a quebra da barreira hematoencefálica levando à migração de células imunes (macrófagos, células T, células B) para o SNC, as quais induzem inflamação, formação de placas escleróticas (lesões), desmielinização e neurodegeneração (STEINMAN, 1996).

Embora hoje seja amplamente estudada, a EM apresenta etiologia complexa, a multiplicidade de informações sobre a imunopatofisiologia da doença e a disponibilidade de opções de tratamento e novos tratamentos futuros, tornam possível o gerenciamento e tratamento da doença.

Os tratamentos atuais destinados à EM são capazes de diminuir as taxas de recaídas em pacientes que apresentam a forma remitente-recorrente, porém, a prevenção dos efeitos em longo prazo continua a ser um problema; medicamentos para formas progressivas de EM também são limitados na sua eficácia. Por isso, novas drogas são ainda necessárias para efetivamente tratar a EM (GAFSON et al. 2012; MAHAD et al. 2015).

A Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE) é o modelo animal de doença desmielinizante mais utilizado para o estudo da EM (DENIC et al., 2011). Durante os últimos 30 anos, a EAE tornou-se um dos modelos animais mais bem sucedidos na pesquisa básica, pré-clínica e de células T na imunologia. De fato, a EAE em suas múltiplas variantes, não só reproduz as características histopatológicas da EM, como também é um modelo adequado para o estudo do desenvolvimento de células T durante as reações imunológicas (HART et al., 2011).

Além de se buscarem novas opções de tratamento para a EM, torna-se ainda necessário, a melhor compreensão dos mecanismos envolvidos no desencadeamento da doença, como a regulação da expressão gênica, transdução de sinais, morte e proliferação celular, mecanismos estes, que podem oferecer ferramentas para auxiliar no desenvolvimento de novas terapias baseadas na ativação de vias de sinalizações neuroprotetoras e/ou inibição daquelas que são deletérias.

Os processos envolvidos durante a ativação da cascata de sinalização da via PI3K/Akt exercem um papel fundamental na sobrevivência celular. Estudos diversos têm revelado que esta via pode ser ativada por diversos estímulos químicos como, por exemplo, na presença de câmara anaeróbica utilizada para o tratamento isquêmico em cultura de astrócitos (JIANG et al., 2003), na presença da quimiocina CCL5 necessária para o recrutamento de neutrófilos durante o desenvolvimento do processo inflamatório em modelo de artrite reumatoide (FERRANDI et al., 2007), na presença de canabinoides envolvidos na neuroproteção em modelos animais, e no modelo experimental de epilepsia induzido por pilocarpina (LIMA et al., 2015).

Estudos mostram que a via de sinalização PI3K/Akt é relevante para o desenvolvimento da EAE. Os mecanismos de redução de sinais da EAE quando a PI3K é excluída ou inibida, provavelmente ocorre, devido a reduções nos processos de ativação, migração e sobrevivência de leucócitos no SNC. Portanto, uma melhor compreensão do papel desta via de sinalização na EAE seria capaz de fornecer indícios que apoiem a noção de que inibidores ou moduladores de PI3K poderiam ser úteis na terapêutica de doenças autoimunes humanas desmielinizantes, tais como a EM (COMERFORD et al., 2012).

Nosso grupo há dez anos vem trabalhando com o modelo de EAE induzido com o peptídeo MOG₃₅₋₅₅ em camundongos C57BL/6, no qual já foram estudados os efeitos de drogas naturais como a genisteína (de PAULA et al., 2007; CASTRO et al., 2013) e sintéticas como a mitoxantrona (SOUSA ALVES et al., 2013) no tratamento e/ou

prevenção dos sinais clínicos desenvolvidos pela EAE. Além disso, alguns estudos já analisaram qual seria o melhor protocolo para a indução do modelo de forma que o mesmo reproduza aspectos específicos da EM, o que permitiria o estudo de terapias mais promissoras (DIAS et al., 2015). Posteriormente, alguns analisaram a resposta imune inicial desenvolvida no modelo de EAE, a fim de buscarmos uma melhor compreensão dos mecanismos relacionados à imunopatogênese da doença (EVANGELISTA et. al., 2016).

Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo avaliar o funcionamento da via de sinalização PI3K/Akt no desenvolvimento da patogenia da EAE e em, segundo plano, avaliar o efeito dos tratamentos com o composto FTY720 ou um análogo lipofílico na redução do agravamento dos sinais clínicos da EAE através de suas ações nesta via de sinalização no SNC.

Inicialmente, camundongos fêmeas C57BL/6 selvagens (WT) e *knockout* para a isoforma γ da proteína PI3K (PI3K^{-/-}) imunizados com o peptídeo MOG₃₅₋₅₅ foram acompanhadas durante 21 dias, sendo observado que o curso clínico da EAE em animais deficientes da isoforma γ de PI3K (PI3K γ) apresentou-se mais tardio e reduzido em relação aos animais selvagens (WT). Enquanto no grupo WT os sinais clínicos tornaram-se aparentes entre o 9º e 11º d.p.i., atingindo um pico no 19º d.p.i., no grupo PI3K^{-/-}, os mesmos tornaram-se aparentes entre o 14º e 15º d.p.i., apresentando um pico significativamente menor no 20º d.p.i, com tendência a queda após esse dia. Tal resultado está compatível com o observado na literatura (RODRIGUES et. al., 2010).

Uma vez tendo sido feita esta análise com relação ao curso clínico da EAE em camundongos WT e PI3K^{-/-}, nosso próximo passo foi verificar, através da análise histopatológica do SNC, a presença de infiltrados inflamatórios e desmielinização no cérebro e medula espinhal dos animais.

Os pontos escolhidos para este estudo foram os 14º e 21º dpi, uma vez que tais pontos correspondem a períodos de início do agravamento e o pico do escore clínico da EAE, respectivamente. Além disso, estes pontos já foram selecionados para o estudo cinético da EAE em outros trabalhos do nosso grupo (DIAS et al., 2015; SOUSA ALVES et al., 2013) sendo considerados relevantes no processo patológico da doença.

O infiltrado inflamatório celular no SNC é uma característica patológica importante, tanto na EM, quanto na EAE (ADAMS et al., 1989). O recrutamento de

leucócitos para a microcirculação do SNC, em diferentes condições inflamatórias, depende da expressão de moléculas de adesão em leucócitos (selectinas e integrinas) e de seus ligantes nas células endoteliais (VCAM-1 e ICAM-1) (JAMES et al., 2003; DOS SANTOS et al., 2005).

Neste trabalho foi verificado que, no 14º d.p.i., apenas o grupo WT-EAE apresentou significativo infiltrado leucocítico inflamatório no SNC, tanto no cérebro como na medula espinhal, o que foi compatível com áreas de desmielinização nas mesmas regiões, sugerindo uma relação com o agravamento dos sinais clínicos da EAE observados a partir deste ponto do estudo. Estudos mostram que as lesões à bainha de mielina dos neurônios levam à deficiência ou completa perda da transmissão dos impulsos nervosos, causando assim, sinais e sintomas neurológicos intermitentes que com a evolução da doença podem agravar-se progressivamente (FRISCHER et al., 2009). No 21º dia, observa-se intensificação do infiltrado leucocítico no SNC do grupo WT-EAE, também compatível com o agravamento do processo de desmielinização e a alta pontuação no score clínico dos animais. O grupo KO-EAE, apresentou infiltração leucocítica inflamatória caracterizada como discreta apenas no 21º dpi levando a um pico no score clínico dos animais, que apesar de menor em relação ao grupo WT-EAE, poderia ser justificado pelo surgimento de áreas de desmielinização discretas neste ponto do grupo.

Os mecanismos que regulam a entrada de leucócitos no SNC relacionam-se a atuação de quimiocinas, uma vez que as mesmas ao serem produzidas por diferentes tipos de leucócitos funcionam como moléculas quimioatraentes que regulam a expressão de moléculas de adesão em linfócitos, assim como de seus ligantes em células endoteliais e a migração celular para o SNC (VILELA et al., 2008; DIAS et al., 2015).

A quimiocina CCL5 já tem sido relacionada ao processo de recrutamento de leucócitos para o SNC em doenças neuroinflamatórias. Altos níveis de expressão do receptor de CCL5 em células T foram observados no fluido cerebrospinal de pacientes com EM (TELESHOVA et al., 2002).

Já é conhecido que as células Th17, importantes figurantes da patogênese da EAE e produtoras da quimiocina CCL20, ao produzirem esta quimiocina, podem promover o recrutamento de outras células Th17 que expressam o ligante CCR6 para a CCL20 (YAMAZAKI, 2008).

Neste trabalho, foi observado que no, 14^o dpi, o grupo WT-EAE apresentou elevada produção de ambas quimiocinas analisadas, CCL5 e CCL20, tanto no cérebro como na medula espinhal. Este resultado está compatível com o intenso infiltrado inflamatório observado neste ponto do grupo. No grupo KO-EAE os níveis de ambas as quimiocinas apresentaram-se baixos em comparação com o grupo WT-EAE, o que pode ter sido a causa de uma menor migração de células leucocíticas para o SNC neste ponto do grupo. No 21^o dpi, foi observada uma redução da produção das quimiocinas CCL5 e CCL20 no SNC no grupo WT-EAE, assim como uma redução no processo de infiltração celular neste local.

Estudos em que o acompanhamento do curso clínico da EAE induzida por 100mg de MOG₃₅₋₅₅ segue além do 21^o dpi mostram que, após este período, ocorre uma queda na evolução da EAE, com recuperação parcial e/ou total dos sinais clínicos pelos animais (DIAS et al., 2015; RODRIGUES et al., 2010). Dessa forma, a queda na produção de quimiocinas e da intensidade do infiltrado inflamatório, no grupo WT-EAE, pode ser em decorrência de uma regulação imunológica do quadro inflamatório a partir deste período.

No grupo KO-EAE foi observada redução das quimiocinas nos dois pontos analisados em relação ao grupo WT-EAE, o que pode ter sido provocado por um atraso e/ou dificuldade na montagem de uma resposta inflamatória nos órgãos linfoides secundários, onde normalmente são apresentados antígenos mielínicos para as células T autorreativas que, orquestradas por quimiocinas, migram para o SNC.

Dessa forma, as dosagens de CCL5 e CCL20 também foram realizadas no homogenato de linfonodos inguinais de animais WT e PI3K^{-/-} induzidos para EAE. A coleta destes linfonodos em especial ocorreu-se pelo fato dos mesmos localizarem-se mais próximos do sítio onde ocorre a inoculação do peptídeo MOG, que é a base da cauda dos animais, sendo assim, importantes linfonodos drenantes de antígenos neste modelo.

Pode ser observado que, tanto no 14^o dpi como no 21^o dpi, os níveis destas quimiocinas apresentaram-se menores no grupo KO-EAE em relação ao grupo WT-EAE, apesar de estarem mais elevadas no 21^o dpi em relação ao 14^o dpi no grupo KO-EAE, nos linfonodos inguinais. O grupo KO-EAE apresentou ao longo de todo o experimento menor pontuação no escore clínico, até mesmo o pico dos sinais clínicos que ocorreu no 21^o dpi foi significativamente menor em relação ao observado no grupo WT-EAE. Logo, baixos níveis de produção de quimiocinas nos linfonodos

inguinais no grupo KO-EAE podem estar relacionados a uma menor migração de leucócitos para estes locais e conseqüentemente, a uma menor apresentação antigênica, ativação, proliferação e migração de células imunes autorreativas para o SNC. Enquanto que no grupo WT-EAE, no 14ºdpi, os níveis destas quimiocinas já estavam altas mantendo-se mais elevadas no 21ºdpi em relação ao grupo KO-EAE.

Dias e colaboradores (2015) ao acompanharem a evolução clínica da EAE até o 58º dpi, observaram que após o 28º dpi, um novo pico, porém menor, na pontuação dos sinais clínicos é observado em animais WT-EAE. Este pico permanece até o 40º dpi, seguido de uma pequena queda e posteriormente, aumento, o qual é sucedido por um platô até o 58ºdpi. Portanto, o aumento de quimiocinas nos linfonodos inguiniais observado neste trabalho, no 21ºdpi deste grupo, pode ser precedente de uma nova montagem de resposta inflamatória MOG-específica nos linfonodos drenantes.

Sasaki e colaboradores (2000) após desenvolverem a deleção genética da isoforma γ da proteína PI3K em camundongos C57BL/6, observaram que estes animais apresentavam menor sobrevivência de timócitos e de ativação de células T maduras no sangue e baço. Além disso, os neutrófilos destes animais apresentavam menor capacidade migratória dos órgãos linfoides secundários para os sítios da infecção e de produção de superóxidos através do processo de *burst* oxidativo em um modelo de peritonite *in vivo*. Portanto, com base nesse estudo, pode-se verificar que a deficiência da proteína PI3K γ provoca uma menor geração e atividade de células imunes que são importantes na construção de uma resposta imune inflamatória, como no caso da EAE.

A ativação de células T autorreativas na periferia do organismo é uma das etapas importantes para o desencadeamento da EM e EAE, assim como a migração de tais células para o SNC. Porém, a reativação de células infiltrantes através da reapresentação de antígenos mielínicos via APCs residentes no SNC, como micróglia e astrócitos, é algo essencial para a ocorrência do processo neuropatológico (LASSMANN, 2017).

Dessa forma, neste trabalho, buscou-se verificar a influência da deleção genética de PI3K γ na proliferação de micróglia (células Iba-1⁺) e astrócitos (células GFAP⁺) na medula espinhal de animais WT e PI3K γ ^{-/-} após a indução da EAE.

Foi observado que, no grupo WT-EAE, no 14º dpi, houve aumento na intensidade de fluorescência do marcador Iba-1 em relação ao grupo KO-EAE, o que foi também

verificado no 21º dpi, com o detalhe de que no grupo WT-EAE a intensidade de fluorescência deste marcador foi maior no 21ºdpi em relação ao 14ºdpi. Esses resultados sugerem uma maior proliferação microglial no grupo WT- EAE já no 14º dpi, momento em que foram observados maiores escores inflamatório e de desmielinização no SNC neste grupo, assim, tais células da glia atuam, a partir deste ponto, no processo de reativação linfocítica através de uma maior atividade fagocítica e de reapresentação de antígenos mielínicos às células infiltrantes. Goverman (2009) discute sobre a fase de reativação de células T por células residentes do SNC ou APCs associadas a estas como crucial para a iniciação e eficácia da fase efetora da EAE. Doucette (1995) mostrou que a ativação microglial é uma importante participante da remoção de detritos celulares necróticos em processos de injúrias no SNC, o que corrobora com os dados encontrados neste estudo de uma maior proliferação microglial ao longo da fase de agravamento dos sinais clínicos da EAE.

Com relação ao grupo KO-EAE, nos dois pontos estudados, houve menor intensidade de fluorescência do marcador Iba-1, sugerindo menor proliferação microglial neste grupo, o que também corrobora com os resultados já apresentados de um menor processo inflamatório e desmielinizante no SNC destes animais.

Heppner e colaboradores (2005) mostraram que o tratamento com ganciclovir em animais transgênicos CD11b-HSVTK, os quais expressam uma timidina quinase proveniente de herpes simplex em micróglia e macrófagos, gerou toxicidade em células hematopoiéticas na medula óssea vermelha dos animais e aboliu a produção de mediadores inflamatórios por micróglia, como nitrito, citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, *in vitro*. Nestes animais, o tratamento com ganciclovir resultou em menor atividade microglial e menor evolução clínica da EAE, o que reafirma a ideia de que tais células são importantes na indução efetiva deste modelo.

Os astrócitos são considerados células satélites dos neurônios. Essas células apresentam ramificações que se estendem e normalmente preenchem o espaço entre os corpos das células nervosas, participando do suporte e separação destas. Além disso, os astrócitos podem exercer efeitos neuroprotetores através dos mecanismos de regulação negativa das respostas inflamatórias do SNC e diminuição do estresse oxidativo. Os estudos mostram ainda que a hiperativação de astrócitos no modelo de EAE pode aumentar a expressão de genes para a produção de citocinas pró-

inflamatórias como IFN- γ e TNF- α , e ainda redução da expressão de IL-10 no cérebro dos animais, promovendo a progressão da doença (LIZHI ZHANG et al., 2018).

Barres (2008) também fez contribuições a respeito do envolvimento astrocitário no processo patológico da EAE. Em seu trabalho, destaca a proliferação e ativação de astrócitos como personagens importantes para a ocorrência do rompimento da BHE. Brosnan & Raine (2013) acrescentam que a permeabilidade aumentada da BHE ocorre devido a um aumento da expressão de moléculas de adesão estimulado por astrócitos em regiões perivasculares, o que favorece o influxo celular inflamatório para o SNC.

Dessa forma, também foi objetivo do presente trabalho analisar a influência da deleção genética de PI3K γ na proliferação de astrócitos (células GFAP⁺) na medula espinhal de animais WT e PI3K γ ^{-/-} após a indução da EAE.

De forma semelhante ao observado na análise microglial, a intensidade e fluorescência do marcador GFAP no grupo WT-EAE foi maior em relação ao grupo KO-EAE, no 14ºdpi, outro dado que corrobora com o achado de maior intensidade de influxo celular para o SNC neste ponto da EAE, além disso, sugere-se que a maior proliferação astrocitária no 14º dpi no grupo WT-EAE estaria relacionada à maior ativação de astrócitos e assim, permeabilidade vascular a partir desse período, compatível mais uma vez com a neuroinflamação e evolução clínica da EAE. No 21º dpi, não foi verificada diferença significativa entre os grupos KO-EAE e WT-EAE. Lizhi zhang e colaboradores (2018) mostraram que no 21ºdpi após a indução da EAE em ratos, os altos níveis de expressão de GFAP no cérebro foram relacionados à hiperplasia e necrose astrocitária e ainda, foram relacionados a uma maior produção de citocinas pró-inflamatórias.

Curiosamente, no grupo KO-EAE, no 21ºdpi, foi observada intensa marcação GFAP, de forma semelhante ao grupo WT-EAE, o que poderia sinalizar um processo de participação tardio de tais células no desenvolvimento da EAE neste grupo, uma vez que no 14º dpi houve menor intensidade de fluorescência de GFAP em relação ao observado no 21ºdpi.

Como já foi mencionado, a hiperplasia, a hiperativação microglial e astrocitária no modelo de EAE contribuem para a aceleração da expressão de genes relacionados à produção de mediadores inflamatórios que iniciam uma cascata inflamatória, promovendo a EAE (NISHIYAMA et al., 1999).

Dessa forma, este estudo buscou analisar a influência da deleção genética de PI3K γ na cinética de citocinas no SNC, tanto no cérebro como na medula espinhal, como nos linfonodos inguinais de animais WT e PI3K $\gamma^{-/-}$ após a indução da EAE.

Quando se correlaciona os níveis das citocinas no SNC com o curso clínico da EAE, observa-se que a citocina pró-inflamatória de perfil Th1, IFN- γ , e a de perfil Th17, IL-17, apresentaram-se elevadas no 14^o dpi no grupo WT-EAE tanto no cérebro como na medula espinhal. Este resultado está de acordo com a literatura, uma vez que tais citocinas são importantes para o desenvolvimento da fase aguda da doença, estando elevadas em pontos que antecedem o início e o pico do escore clínico, 10^o dpi e 19^o dpi, respectivamente (DIAS et al., 2015). No grupo KO-EAE, os níveis de tais citocinas encontraram-se ainda baixos no SNC, o que estaria compatível com a baixa pontuação no escore clínico observado nos animais deste grupo neste ponto de estudo.

As citocinas IL-6 e TGF- β apresentaram um padrão característico em relação às citocinas IFN- γ e IL-17 no SNC dos animais imunizados com MOG₃₅₋₅₅. Foi observado que tanto no cérebro como na medula espinhal, as citocinas IL-6 e TGF- β estavam em níveis maiores no grupo WT-EAE em relação ao grupo KO-EAE, assim como no 21^odpi. Já é conhecido que a polarização de linfócitos Th17 a partir de células T naive ocorre na presença de IL-6 e de TGF- β no momento da apresentação antigênica. Em protocolos experimentais utilizando camundongos geneticamente deficientes em IL-6 não foi possível induzir a EAE, indicando a importância desta citocina no desenvolvimento da patologia e consequentemente da geração de linfócitos Th17 (KROENKE, 2008; QUINTANA, 2009).

No presente trabalho, foi observado que o pico de citocinas IL-6 e TGF- β antecedeu o pico da produção da citocina IL-17 no SNC de camundongos EAE, corroborando com os achados da literatura. O grupo KO-EAE também demonstrou comportamento parecido ao grupo selvagem, apesar de apresentar menores níveis de IL-6 e TGF- β , em relação aos WT-EAE, o que pode ser explicado pelo atraso na montagem da resposta imune contra antígenos mielínicos, o que estaria de acordo com o observado na pontuação do escore clínico deste grupo neste ponto do estudo.

No 21^o dpi, podemos observar que as citocinas IFN- γ e IL-17 permanecem mais elevadas no grupo WT-EAE no cérebro e medula espinhal, em relação ao grupo KO-EAE, o que estaria compatível com a piora do escore clínico deste grupo neste ponto

do estudo. Porém nota-se que no grupo WT-EAE, apresenta uma tendência à redução dos níveis destas citocinas a partir deste ponto, o que corrobora com estudos anteriores que indicam um processo de regulação imunológica iniciada neste período (DIAS et al., 2015).

A análise das citocinas pró-inflamatórias foi também realizada nos linfonodos inguinais dos animais WT e PI3K^{-/-} após a indução da EAE.

Os animais do grupo WT-EAE apresentaram níveis elevados de IL-6, TGF- β , IFN- γ e IL-17 no 14ºdpi com aumento destes no 21ºdpi, em relação ao grupo KO-EAE, que no 14ºdpi, de forma esperada, apresentou baixos níveis destas citocinas com pequeno aumento no 21º dpi. Tais resultados apresentam-se compatíveis com o achado no presente estudo de uma menor produção de quimiocinas no grupo KO-EAE em ambos os pontos em relação ao grupo WT-EAE, o que poderia explicar um menor quadro de recrutamento celular para os linfonodos inguinais e consequente, menores ativação linfocítica e secreção de citocinas pró-inflamatórias nos animais em que a proteína PI3K γ foi geneticamente deletada. Nos animais WT-EAE, os níveis de citocinas pró-inflamatórias nos linfonodos inguinais no 21ºdpi também poderiam sinalizar um futuro agravamento de sinais clínicos da EAE, assim como foi discutido na análise de quimiocinas neste ponto e também no trabalho de Dias e colaboradores (2015).

A análise da citocina anti-inflamatória IL-10 foi também realizada no SNC, no cérebro e medula espinhal e ainda, em linfonodos inguinais dos animais WT e PI3K^{-/-} após a indução da EAE.

Como foi verificado, a citocina IL-10 esteve elevada nos animais WT-EAE no 14ºdpi, com aumento em sua produção no 21ºdpi. A citocina IL-10 tem sido implicada na regulação de doenças autoimunes. Camundongos com deficiência em IL-10 desenvolvem EAE de forma grave sendo incapazes de se recuperar da doença. As células T de camundongos deficientes em IL-10 exibem uma alta proliferação antígeno-específica e produzem níveis elevados de IFN- γ quando estimuladas com um peptídeo encefalitogênico e induzem uma EAE muito grave após transferência para camundongos selvagens (KLOSE et al., 2013). Além disso, camundongos transgênicos em que ocorre a superexpressão para a IL-10 são resistentes à indução da EAE e a expressão do mRNA para a IL-10 é aumentada no SNC durante a fase de recuperação da EAE (SAMOILOVA, 1998). No grupo KO-EAE esta citocina esteve em

baixos níveis no 14ºdpi, apresentando elevação no 21ºdpi, porém nos dois pontos analisados, esteve abaixo nos níveis encontrados no grupo WT-EAE.

Portanto, esses resultados corroboram com o achado no presente trabalho, sugerindo que o pico de IL-10 observado no grupo WT-EAE no 21º dpi teria como objetivo a regulação do processo inflamatório no período do pico do escore clínico da doença. Alguns autores também têm discutido a ação conjunta entre IL-10 e TGF- β na regulação do processo inflamatório desencadeado na EAE (FARIAS et al., 2013). No grupo KO-EAE, a menor produção de IL-10 no SNC poderia ser consequência de um menor quadro inflamatório observado neste grupo desde a sua iniciação, nos linfonodos inguinais, seguida de uma menor infiltração celular, ativação de células da glia e liberação de citocinas pró-inflamatórias. Logo, sugere-se uma menor necessidade de regulação do processo neuroinflamatório neste grupo.

A citocina anti-inflamatória IL-10 apresentou-se elevada no grupo WT-EAE no 14º dpi nos linfonodos inguinais com aumento da mesma no 21ºdpi, em relação ao grupo KO-EAE. Este resultado pode sinalizar uma tentativa de regulação imunológica nos linfonodos inguinais no 21ºdpi, uma vez que foi verificada elevação na produção de citocinas pró-inflamatórias IL-6, TGF- β , IFN- γ e IL-17 nestes locais. Curiosamente, nos animais WT-EAE pode-se observar um quadro inverso ao verificado no SNC com relação à cinética de citocinas, uma vez que, no 14ºdpi, ocorrem maiores níveis de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias no SNC, enquanto nos linfonodos inguinais, a produção das mesmas encontra-se elevada, mas não de forma superior ao SNC. Quando se analisa o 21ºdpi, tal fato se inverte, uma vez que os maiores níveis de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias encontram-se nos linfonodos e menos elevadas no SNC. A citocina IL-10 apresentou comportamento que acompanhou as elevações das citocinas pró- inflamatórias nos respectivos pontos analisados. O comportamento que foi descrito ao se comparar a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias nos linfonodos inguinais e SNC já havia sido descrito em trabalhos anteriores de nosso grupo (DIAS et al., 2015; EVANGELISTA et al., 2016).

Hoffstetter e Forsthuber (2010) em seu trabalho envolvendo a indução da EAE em camundongos SJL/J imunizados com PLP₁₃₉₋₁₅₁ (1mg/mL) e toxina pertussis (200ng) mostrou a presença de células T específicas para PLP produtoras de IFN- γ e IL-17 nos linfonodos drenantes no 4º dpi, não sendo verificadas no SNC, neste ponto. Logo, podemos observar que essa cinética inversa da produção de citocinas pró-inflamatórias no SNC e linfonodos drenantes seria em decorrência da presença de

uma intensa resposta imunológica precoce, possivelmente acontecendo nos dias iniciais nos órgãos linfoides periféricos. Tal fato poderia influenciar no influxo de células e a resposta imunológica no SNC posteriormente.

Nos animais KO-EAE, esta cinética característica de citocinas no SNC e linfonodos também é possível de ser observada, porém, em uma escala de níveis bem menor, uma vez que a deleção de PI3K γ provoca uma deficiência na montagem de uma resposta inflamatória MOG-específica.

Até então, observa-se que a via de sinalização PI3K/Akt apresenta papel importante no desenvolvimento da EAE, uma vez que camundongos C57BL/6 deficientes de PI3K γ apresentaram maior proteção aos sinais clínicos da EAE, redução dos escores histopatológicos inflamatórios e desmielinizantes no SNC, redução de quimiocinas, citocinas pró-inflamatórias e ainda aumento de citocinas anti-inflamatórias.

Estudos apontam que os mecanismos pelo qual a PI3K atua na redução e/ou controle de processos inflamatórios provavelmente combina interrupções na ativação, migração e sobrevivência celular (CAMPOS et al., 2005; BARBER et al., 2005).

Dessa forma, no presente trabalho, também se procurou verificar através da técnica de TUNEL, a qual analisa a fragmentação de DNA em células apoptóticas, a influência da via PI3K/Akt na sobrevivência de células da medula espinhal nos animais WT e PI3K $^{-/-}$, nos 14^o e 21^o dpi, após a imunização com o peptídeo MOG₃₅₋₅₅.

Foi observado um maior número de células apoptóticas no grupo WT-EAE no 21^odpi em relação ao encontrado neste grupo no 14^odpi e ainda em relação aos dois pontos analisados nos animais KO-EAE. Analisando os resultados encontrados no grupo KO-EAE nos 14^o e 21^o dpi, não se observou diferença significativa entre os dois pontos.

Logo, o aumento numérico de células em processo de morte celular no SNC, em animais WT-EAE, sugere um maior processo neurodegenerativo neste grupo ocasionado pelo influxo de células inflamatórias orquestrado por um aumento na produção de quimiocinas e, conseqüentemente, de mediadores inflamatórios nos pontos analisados, os quais podem contribuir para um maior processo de degradação mielínica, degeneração e morte neuronal, característicos da EM e EAE. O maior número de células apoptóticas no SNC, no 21^odpi do grupo WT-EAE, está compatível com o escore clínico elevado observado nos animais neste período.

A morte programada celular por apoptose atua tanto em condições normais permitindo a renovação tecidual como em situações patológicas como em quadros inflamatórios. Durante o desenvolvimento normal do SNC, especialmente do cérebro, ocorre a eliminação de determinado número de células, a fim de manter a regulação da proliferação destas (BIBEL e BARDE, 2000; SINGH, 2007). Por outro lado, a apoptose estando desregulada já foi relacionada à iniciação da progressão de processos infecciosos, doenças autoimunes e degenerativas, e também, câncer (SINGH, 2007).

Estudos demonstram que a apoptose é um importante mecanismo patológico na evolução da EM e EAE (DASGUPTA et al., 2012, DASGUPTA et al., 2013). Por esta razão, estudos que visam descobrir e/ou aplicar terapias que podem ser usadas no controle da morte celular no SNC são necessários, pois poderiam contribuir para o gerenciamento destas doenças.

Duarte-Silva e colaboradores (2018) mostraram que o tratamento com o composto Sildenafil reduziu o número de células TUNEL⁺ (células em apoptose) na medula espinhal de camundongos EAE.

No presente trabalho, foi observado que a deleção de PI3K γ foi capaz de reduzir o número de células apoptóticas na medula espinhal de animais EAE, o que pode ter refletido em um menor agravamento de sinais clínicos da EAE neste grupo. Este fato corrobora com os achados de que a via de sinalização PI3K/Akt é importante no processo de sobrevivência celular em condições inflamatórias.

A via de sinalização PI3K/Akt/mTOR atua em um importante papel no metabolismo, crescimento, sobrevivência, migração e proliferação celular e sua desregulação tem sido implicada em algumas patologias. Zhao e colaboradores (2002) mostram em seu estudo que a redução da ativação da sinalização Akt/mTOR, após o tratamento com Dihidroartemisinina, foi uma potencial estratégia terapêutica para EAE em camundongos, levando a uma menor atuação de células T efetoras neste modelo.

No presente estudo, objetivou-se reduzir a fosforilação de Akt, o que possivelmente, influenciaria na ativação da via de sinalização PI3K/Akt/mTOR através dos tratamento com o composto FTY720 (Fingolimod), o primeiro medicamento oral aprovado pelo FDA para o tratamento da EM e ainda um análogo lipofílico que apresentou interessantes resultados na redução de mediadores inflamatórios em modelos inflamatórios *in vitro* e *in vivo*.

O FTY720 é um antagonista dos receptores esfingosina-1-fosfato (S1P) e tem sido demonstrado que um destes receptores, o receptor de S1P1, possui a capacidade de induzir a ativação da via de sinalização Akt/mTOR, bloqueando as funções das células Tregulatórias e promovendo respostas de células Th1, enquanto a deficiência deste receptor pode levar a um quadro oposto (LIU et al., 2017).

Hou e colaboradores (2015) mostraram que o tratamento com FTY720 foi capaz de modular o receptor S1P1 levando ao bloqueio da via de sinalização Akt/mTOR em esplenócitos extraídos de camundongos EAE. Neste estudo, o tratamento com FTY720 foi capaz de inibir o agravamento dos sinais clínicos da EAE.

Dessa forma, após ser verificado que a deleção genética da proteína PI3K γ provocar atraso e redução do agravamento clínico da EAE induzida por MOG em camundongos C57BL/6 através da redução do processo neuroinflamatório, objetivou-se no presente estudo verificar se a inibição da fosforilação de Akt, já bem identificada a partir do tratamento com composto FTY720, poderia ocorrer no SNC levando a um atraso e/ou redução dos sinais clínicos da EAE de forma similar ao observado em animais em que a deleção de PI3K foi realizada de forma genética. Além disso, buscou-se verificar também se o análogo do FTY720, de caráter mais lipofílico poderia apresentar efeitos semelhantes e/ou melhores nesta inibição farmacológica na redução do processo neuroinflamatório.

Para tanto, camundongos C57BL/6 selvagens foram induzidos para EAE e submetidos ao tratamento com FTY720 ou seu análogo do 10^o dpi ao 20^odpi. A escolha do 10^odpi como ponto inicial dos tratamentos decorreu-se pelo fato de que este ponto geralmente ocorre o início dos sinais clínicos observados na EAE como perda de tônus da cauda e fraqueza e/ou paralisia de membros, tal como foi observado neste trabalho. Dessa forma, sugere-se que a atuação precoce dos tratamentos na via de sinalização Akt/mTOR poderia evitar a progressão da EAE.

De forma esperada, os animais EAE apresentaram o início dos sinais clínicos surgindo por volta do 10^o dpi, alcançando um pico do escore clínico por volta do 17^odpi e uma tendência a redução a partir do 20^odpi. Os animais EAE tratados com FTY720 ou seu análogo apresentaram, em ambos os grupos, inibição do desenvolvimento dos sinais clínicos da EAE, uma vez que a maioria dos animais, cerca de 70%, não apresentou nenhum sinal clínico da doença, até o 21^odpi.

Além disso, ambos os tratamentos foram capazes de reduzir significativamente, e de forma semelhante, o processo de infiltração leucocítica inflamatória e a

desmielinização no SNC, em relação ao grupo EAE, a níveis similares aos observados no grupo controle, o que foi acompanhado pela redução significativa na produção de CCL5 e CCL20 tanto no cérebro como na medula espinhal, também de forma similar nos dois compostos, com destaque para a quimiocina CCL5, que esteve em menores níveis no grupo EAE tratado com análogo em relação ao grupo EAE e ao grupo EAE tratado com FTY720 no cérebro dos animais. Nos linfonodos inguinais, a produção de ambas quimiocinas foi reduzida em relação ao grupo EAE a níveis similares aos observados no grupo controle, tanto após o tratamento com FTY720 como o análogo.

A produção de citocinas pró-inflamatórias IFN- γ e IL-17 e da anti-inflamatória IL-10 foi também avaliada nos animais EAE após o tratamento com FTY720 seu análogo mais lipofílico. Pode-se observar que ambos os tratamentos foram capazes de reduzir de forma significativa a produção das citocinas pró-inflamatórias a níveis similares aos do grupo controle, tanto no cérebro e na medula espinhal como nos linfonodos inguinais. O grupo EAE tratado com o análogo obteve menor produção de IFN- γ em relação ao grupo EAE-FTY720 tanto no cérebro como na medula espinhal.

Com relação à produção de IL-10, ambos os tratamentos foram capazes de aumentar os níveis de IL-10 no cérebro, medula e controles, em relação aos grupos controle e EAE, sendo que no grupo EAE tratado com o análogo a produção de IL-10 foi menor em relação ao grupo EAE tratado com FTY720, apenas no cérebro. Nos linfonodos inguinais, a atuação dos dois compostos na produção de IL-10 foi de forma similar entre eles, gerando o mesmo aumento desta citocina em relação ao grupo EAE e controle.

Desta forma, pode-se observar que os tratamentos com o FTY720 ou seu análogo lipofílico atuaram reduzindo significativamente a produção de citocinas pró-inflamatórias, elevando a produção de IL-10, tanto na periferia como no SNC. O grupo EAE tratado com o análogo apresentou melhores resultados referentes à redução de CCL5 no cérebro e IFN- γ tanto no cérebro como na medula. Os menores níveis de CCL5 neste grupo seguidos de uma menor produção de IFN- γ , sugere que o análogo possa ter atuado de forma mais efetiva em células Th1 e Th17 reduzindo assim, a necessidade de uma maior regulação imunológica em relação ao grupo EAE tratado com o FTY720, o que pode ser explicado pela menor produção de IL-10 no cérebro dos animais tratados com o análogo.

O análogo do FTY720 utilizado como um dos tratamentos no presente trabalho trata-se de um aminoálcool lipofílico, pelo fato de apresentar uma cadeia carbônica longa. A lipofilicidade gerada por essa condição favorece a maior difusão através das membranas biológicas aumentando a concentração intracelular do composto (POLKOWSKI et al., 2004).

Estudos mostram que aminoalcoois lipofílicos foram capazes de reduzir a produção de mediadores inflamatórios como NO, citocinas pró- inflamatórias como TNF- α , IL-1 β em modelos *in vitro* e também na atuação frente a quadros inflamatórios *in vivo* (REIS et al., 2008; CORREIA et al., 2013).

Em trabalhos anteriores do nosso grupo, foi mostrado que derivados lipofílicos da genisteína, um fitoestrógeno presente na soja, também apresentaram diferentes efeitos moduladores quando testado em linhagens de macrófagos J774. A1 estimulados por LPS, onde ocorreu a inibição da produção de IL-12 e NO, provavelmente através da atuação na via do NF- κ B (CASTRO et al., 2012).

Para uma melhor compreensão dos mecanismos de atuação dos compostos FTY720 e seu análogo lipofílico na redução de todos os parâmetros neuroimunológicos observados no presente estudo, buscou-se avaliar se os mesmos seriam capazes de regular negativamente o eixo PI3K/Akt, uma vez que foi mostrado também neste trabalho que tal via é essencial na evolução clínica do modelo de EAE.

Para tanto, foi analisada a fosforilação da proteína Akt, o que sugere ativação da via Akt/mTOR (Hou et al., 2015).

Hou e colaboradores (2015) mostraram redução da fosforilação de Akt em células esplênicas de animais EAE após o tratamento com FTY720, porém, nenhum estudo foi encontrado referente ao processo de redução e/ou inibição da ativação da via Akt/mTOR no SNC de animais EAE após este tratamento.

Dessa forma, a análise da fosforilação de Akt foi realizada na medula espinhal de animais EAE tratados com FTY720 ou o análogo lipofílico, do 10^o ao 20^o dpi.

Foi observado que a fosforilação de Akt esteve elevada no grupo EAE no 21^o dpi, em relação ao grupo controle. Com relação aos tratamentos com FTY720 e o análogo durante 10 dias após o surgimento dos sinais clínicos da EAE, verificou-se que ambos foram capazes de reduzir a fosforilação de Akt de forma significativa a níveis similares aos do grupo controle. Porém não houve diferença nos níveis de pAkt entre os dois grupos tratados.

Embora a Akt esteja sendo extensivamente estudada no desencadeamento de processos inflamatórios, o seu papel ainda permanece não totalmente compreendido no desencadeamento de doenças autoimunes.

Ouyang e colaboradores (2019) mostram em seu estudo que a Akt esteve relacionada à inibição da proliferação de células Tregulatórias, as quais atuam de forma a controlar a ação de células T efetoras durante a indução da EAE. Logo, a inibição de Akt poderia ser uma possível terapia para a EAE e a EM.

A via de sinalização PI3K/Akt/mTOR, entre outras funções, atua na regulação da ativação de células T, proliferação, metabolismo glicídico, expressão de citocinas e sobrevivência celular em resposta à co-estimulação de CD28 e citocinas (KANE et al., 2003).

No presente estudo, a fosforilação de Akt esteve reduzida, na medula espinhal, nos grupos EAE que foram tratados com o composto FTY720 e seu análogo lipofílico. Este resultado sugere uma menor ativação da via PI3K/Akt/mTOR no SNC após os tratamentos, o que poderia ter contribuído para o menor recrutamento, proliferação e sobrevivência de células imunes inflamatórias infiltrantes no SNC, o que foi demonstrado neste estudo, levando conseqüentemente a um menor processo de neuroinflamatório, de degradação mielínica e inibição do agravamento da evolução clínica da EAE.

Apesar de já ser amplamente usado como primeira terapia convencional oral para o tratamento da EM através da redução do egresso de células imunes para os sítios inflamatórios via atuação em receptores SP1, o FTY720 ainda atua em diferentes mecanismos celulares, como por exemplo, na via de sinalização PI3K/Akt/mTOR. Porém, novos estudos ainda se fazem necessários para a identificação e compreensão destes mecanismos, assim como estratégias que possam utilizar este composto ou seu análogo mais lipofílico no gerenciamento da EAE e EM, minimizando ainda mais os efeitos adversos, como a imunossupressão periférica, que pode ser gerada a partir destes tratamentos.

6 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos, observa-se que a enzima PI3K γ e a via de sinalização PI3K/Akt/mTOR apresentam um importante papel no recrutamento, sobrevivência e proliferação de células imunes autorreativas e a atuação destas no SNC, culminando com o processo inflamatório e desmielinizante observados na EAE. Além disso, os compostos FTY720 e seu análogo lipofílico foram capazes de reduzir a fosforilação de Akt levando à redução da neuroinflamação provocada por esta doença no SNC.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A.K., Grzesiuk. Clinical and epidemiologic characteristics of 20 patients with multiple sclerosis in Cuiabá - Mato Grosso, Brazil. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, 2006.

ABDUL-MAJID K. B *et al.* Comparing the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis in CD4^{-/-} and CD8^{-/-} DBA/1 mice defines qualitative roles of different T cell subsets. **J Neuroimmunol**, v.141, p.10-9. 2003.

ABE, Y *et al.* Apoptotic cells associated with Wallerian degeneration after experimental spinal cord injury: a possible mechanism of oligodendroglial death. **Journal of neurotrauma** v. 16, n. 10, p. 945–52, 1999.

ADAMS, D. H. The “infective” process in scrapie and human spongiform encephalopathy disease. **Medical Hypotheses** v. 45, n. 2, p. 214–218, 1995.

ALBRECHT, Philipp *et al.* Effects of dimethyl fumarate on neuroprotection and immunomodulation. **Journal of Neuroinflammation** v. 9, n. 1, p. 163 , 2012.

ALVES, Caio *et al.* Anthraquinone derivative O,O'-bis-(3'-iodopropyl)-1,4-dihydroxyanthraquinone modulates immune response and improves experimental autoimmune encephalomyelitis. **Int Immunopharmacol**. 127-32. 2012.

ALVES-LEON, Soniza Vieira *et al.* Multiple sclerosis outcome and morbimortality of a Brazilian cohort patients. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria** v. 66, n. 3 B, p. 671–677,

ANDERSSON, M *et al.* Cerebrospinal fluid in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus report. **Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry** v. 57, n. 8, p. 897–902 , 1994.

ANN YEH, E.; WEINSTOCK-GUTTMAN, B. Fingolimod: An oral disease-modifying therapy for relapsing multiple sclerosis. **Advances in Therapy**, 2011

APOSTOLOPOULOS, Vasso *et al.* The complex immunological and inflammatory network of adipose tissue in obesity. **Molecular Nutrition and Food Research**, 2016

ARAKI, Manabu *et al.* Th2 bias of CD4⁺ NKT cells derived from multiple sclerosis in remission. **International Immunology** v. 15, n. 2, p. 279–288, 2003.

ARRUDA, Walter Oleschko *et al.* Multiple sclerosis: Report on 200 cases from Curitiba, Southern Brazil and comparison with other Brazilian series. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria** v. 59, n. 2 A, p. 165–170 , 2001.

ALNYT, Renata *et al.* Associations of HLA DRB1 alleles with IgG oligoclonal bands and their influence on multiple sclerosis course and disability status. **Medicina (Lithuania)** v. 52, n. 4, p. 217–222 , 2016.

BAKSHI, Rohit *et al.* Serum lipid antibodies are associated with cerebral tissue damage in multiple sclerosis. **Neurology neuroimmunology & neuroinflammation** v. 3, n. 2, p. e200 , 2016. B

BALSIMELLI, Silvia *et al.* Attention impairment associated with relapsing-remitting multiple sclerosis patients with mild incapacity. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria** v. 65, n. 2 A, p. 262–267, 2007.

BAMM, Vladimir V.; GEIST, Arielle M.; HARAUZ, George. Correlation of geographic distributions of haptoglobin alleles with prevalence of multiple sclerosis (MS) – a narrative literature review. **Metabolic Brain Disease**, 2017

BARBER, Domingo F *et al.* PI3Kgamma inhibition blocks glomerulonephritis and extends lifespan in a mouse model of systemic lupus. **Nature medicine** v. 11, n. 9, p. 933–935, 2005.

BARRES, B. A. The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease. **Neuron** v. 60, p. 430-40, 2008.

BENNETT, Jami *et al.* Blood-brain barrier disruption and enhanced vascular permeability in the multiple sclerosis model EAE. **Journal of Neuroimmunology** v. 229, n. 1–2, p. 180–191, 2010.

BEROD, Luciana *et al.* PI3K γ deficiency delays the onset of experimental autoimmune encephalomyelitis and ameliorates its clinical outcome. **European Journal of Immunology** v. 41, n. 3, p. 833–844, 2011.

BEYERSDORF, Niklas *et al.* Selective targeting of regulatory T cells with CD28 superagonists allows effective therapy of experimental autoimmune encephalomyelitis. **The Journal of Experimental Medicine** v. 202, n. 3, p. 445–455, 2005.

BIBEL, M. et al. Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. **Genes Dev**, 2000.

BIELEKOVA, Bibiana; MARTIN, Roland. Development of biomarkers in multiple sclerosis. **Brain**, 2004

A.K., Grzesiuk. Clinical and epidemiologic characteristics of 20 patients with multiple sclerosis in Cuiaba - Mato Grosso, Brazil. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, 2006

BRÄNDLE, Simone M *et al.* Distinct oligoclonal band antibodies in multiple sclerosis recognize ubiquitous self-proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** v. 113, n. 28, p. 7864–9 , 2016.

BRETTSCHEIDER, Johannes *et al.* IgG antibodies against measles, rubella, and varicella zoster virus predict conversion to multiple sclerosis in clinically isolated syndrome. **PLoS ONE** v. 4, n. 11 , 2009.

BROSNAN, C.F., RAINE, C. S. The astrocyte in multiple sclerosis revisited. **Glia** v. 61, p. 453-65, 2013.

BRÜCK, Wolfgang *et al.* Macrophages in Multiple Sclerosis. **Immunobiology** v. 195, n. 4–5, p. 588–600 , 1996.

BRUNN, G J *et al.* Direct inhibition of the signaling functions of the mammalian target of rapamycin by the phosphoinositide 3-kinase inhibitors, wortmannin and LY294002. **The EMBO journal** v. 15, n. 19, p. 5256–5267 , 1996.

CALABRESI, Peter A *et al.* Safety and efficacy of fingolimod in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis (FREEDOMS II): a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. **The Lancet Neurology** v. 13, n. 6, p. 545–556 , 2014.

CALLEGARO, D *et al.* The prevalence of multiple sclerosis in the city of São Paulo, Brazil, 1997. **Acta neurologica Scandinavica** v. 104, n. 4, p. 208–213 .

CARLSON, Thaddeus *et al.* The Th17-ELR+ CXC chemokine pathway is essential for the development of central nervous system autoimmune disease. **The Journal of experimental medicine** v. 205, n. 4, p. 811–23 , 2008.

CARPENTIER, P. A., *et al.* Differential activation of astrocytes by innate and adaptive

immune stimuli. **Glia** v. 49, p. 360-74, 2005.

CASTRO, Sandra B R *et al.* Treatment with 7-O-tetradecanoyl-genistein reduces IFN- γ and IL-17 levels in the brain and ameliorates clinical signs of experimental autoimmune encephalomyelitis. **Biomedicine and Preventive Nutrition** v. 3, n. 1, p. 26–30 , 2013.

CASTRO, Sandra B.R. *et al.* Immunomodulatory effects and improved prognosis of experimental autoimmune encephalomyelitis after O-tetradecanoyl-genistein treatment. **International Immunopharmacology** v. 12, n. 2, p. 465–470 , 2012.

CHEN-YEN Chung ; FANG Liao. CXCR3 signaling in glial cells ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis by restraining the generation of a pro-Th17 cytokine milieu and reducing CNS-infiltrating Th17 cells. **Journal of Neuroinflammation** v13, p.76, 2016.

CHOI, J. W. *et al.* FTY720 (fingolimod) efficacy in an animal model of multiple sclerosis requires astrocyte sphingosine 1-phosphate receptor 1 (S1P1) modulation. **Proceedings of the National Academy of Sciences** v. 108, n. 2, p. 751–756 , 2011.

COFFER, P J; WOODGETT, J R. Molecular cloning and characterisation of a novel putative protein-serine kinase related to the cAMP-dependent and protein kinase C families. **European journal of biochemistry / FEBS** v. 201, n. 2, p. 475–481 .

COHEN, Jeffrey A. *et al.* Oral Fingolimod or Intramuscular Interferon for Relapsing Multiple Sclerosis. **New England Journal of Medicine** v. 362, n. 5, p. 402–415 , 2010.

COMERFORD, Iain *et al.* PI3K?? Drives Priming and Survival of Autoreactive CD4+ T Cells during Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. **PLoS ONE** v. 7, n. 9 , 2012.

COMPSTON, Alastair; COLES, Alasdair. Multiple sclerosis. 2002. 2002. p.1221–1231.

CRISTIANO, E. *et al.* Prevalence of multiple sclerosis in Buenos Aires, Argentina using the capture-recapture method. **European Journal of Neurology** v. 16, n. 2, p. 183–187 , 2009.

DARGAHI, Narges *et al.* Multiple sclerosis: Immunopathology and treatment update

.**Brain Sciences.**, 2017.

DASGUPTA, A *et al.* Protein carbonylation and aggregation precede neuronal apoptosis induced by partial glutathione depletion. **ASN Neuro** v. 4 p. 161-174, 2012.

DASGUPTA, A *et al.* Increased carbonylation, protein aggregation and apoptosis in the spinal cord of mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. **ASN Neuro**, 2013.

DE ABREU, Diana Andrea Fernandes *et al.* Prenatal vitamin d deficiency induces an early and more severe experimental autoimmune encephalomyelitis in the second generation. **International Journal of Molecular Sciences** v. 13, n. 9, p. 10911–10919 , 2012.

DE PAULA, Marcio L. *et al.* Genistein down-modulates pro-inflammatory cytokines and reverses clinical signs of experimental autoimmune encephalomyelitis. **International Immunopharmacology** v. 8, n. 9, p. 1291–1297 , 2008.

DECKER, Yann *et al.* Abnormal galactosylation of immunoglobulin G in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. **Multiple Sclerosis Journal** p. 1–10 , 2016.

DEL OLMO, E.; PLAZA, A; *et al.* Synthesis and evaluation of some lipidic aminoalcohols and diamines as immunomodulators. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 16 p. 6091-6095, 2006.

DEL PRETE, Annalisa *et al.* Defective dendritic cell migration and activation of adaptive immunity in PI3Kgamma-deficient mice. **The EMBO journal** v. 23, n. 17, p. 3505–15 , 2004.

DENG, Yaxiong *et al.* Th9 cells and IL-9 in autoimmune disorders: Pathogenesis and therapeutic potentials .**Human Immunology**, 2017

DENIC, Aleksandar *et al.* The relevance of animal models in multiple sclerosis research. **Pathophysiology** v. 18, n. 1, p. 21–29 , 2011.

DIAS, Alyria Teixeira *et al.* Different MOG35-55 concentrations induce distinguishable inflammation through early regulatory response by IL-10 and TGF- β in mice CNS despite unchanged clinical course. **Cellular Immunology** v. 293, n. 2, p. 87–94 , 2015.

DIAS, Alyria Teixeira *et al.* Genistein modulates the expression of Toll-like receptors in experimental autoimmune encephalomyelitis. **Inflamm Res.** v 67, p. 597-608, 2018.

DIEBOLD, Martin; DERFUSS, Tobias. Immunological treatment of multiple sclerosis. **Seminars in Hematology** v. 53, p. S54–S57 , 2016.

DOLATI, Sanam *et al.* Multiple sclerosis: Therapeutic applications of advancing drug delivery systems. **Biomedicine & Pharmacotherapy** v. 86, p. 343–353 , 2017.

DOS SANTOS, Adriana Carvalho *et al.* CCL2 and CCL5 mediate leukocyte adhesion in experimental autoimmune encephalomyelitis—an intravital microscopy study. **Journal of Neuroimmunology** v. 162, n. 1, p. 122–129 , 2005.

DOUKAS, John *et al.* Aerosolized phosphoinositide 3-kinase gamma/delta inhibitor TG100-115 [3-[2,4-diamino-6-(3-hydroxyphenyl)pteridin-7-yl]phenol] as a therapeutic candidate for asthma and chronic obstructive pulmonary disease. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics** v. 328, n. 3, p. 758–65 , 2009.

DRESSEL, Alexander *et al.* Autoantigen recognition by human CD8 T cell clones: enhanced agonist response induced by altered peptide ligands. **J Immunol.** v. 159, n. 10, p. 4943–51 , 1997.

DUARTE- SILVA, Eduardo *et al.* Sildenafil ameliorates EAE by decreasing apoptosis in the spinal cord of C57BL/6 mice. **Journal of Neuroimmunology.** v321, p125-137, 2018.

DYMENT, David A. *et al.* Complex interactions among MHC haplotypes in multiple sclerosis: Susceptibility and resistance. **Human Molecular Genetics** v. 14, n. 14, p. 2019–2026 , 2005.

ECKSTEIN, Christopher; BHATTI, M. Tariq. Currently approved and emerging oral therapies in multiple sclerosis: An update for the ophthalmologist .**Survey of Ophthalmology**, 2016

ERCOLINI, A. M.; MILLER, S. D. *The role of infections in autoimmune disease* .**Clinical and Experimental Immunology**, 2009

EVANGELISTA, Marcilene Gomes *et al.* Early IFN- γ production together with decreased expression of TLR3 and TLR9 characterizes EAE development conditional

on the presence of myelin. **Autoimmunity** p. 1–10 , 2016.

FAREZ, Mauricio F *et al.* Toll-like receptor 2 and poly(ADP-ribose) polymerase 1 promote central nervous system neuroinflammation in progressive EAE. **Nature Immunology** v. 10, n. 9, p. 958–964 , 2009.

FARIAS, Alessandro S. *et al.* Vitamin D3 induces IDO+ tolerogenic DCs and enhances treg, reducing the severity of EAE. **CNS Neuroscience and Therapeutics** v. 19, n. 4, p. 269–277 , 2013

FARJAM, Mojtaba *et al.* *Emerging immunopharmacological targets in multiple sclerosis* .**Journal of the Neurological Sciences**, 2015.

FAYARD, B. *et al.* The secreted brain-derived neurotrophic factor precursor pro-BDNF binds to TrkB and p75NTR but not to TrkA or TrkC. **Journal of Neuroscience Research** v. 80, n. 1, p. 18–28 , 2005.

FDA. Approved Drug Products with Therapeutic Equivalence Evaluations. **Department of Health and Human Services** n. 37, p. 1346 , 2017.

FERRANDI, Chiara *et al.* Phosphoinositide 3-kinase gamma inhibition plays a crucial role in early steps of inflammation by blocking neutrophil recruitment. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics** v. 322, n. 3, p. 923–30 , 2007.

FOSSEY, Sallyanne C *et al.* Identification of molecular biomarkers for multiple sclerosis. **The Journal of molecular diagnostics : JMD** v. 9, n. 2, p. 197–204 , 2007.

FOSTER, T.C. *et al.* Calcineurin Links Ca⁺⁺ Dysregulation with Brain Aging. **J. Neurosci** v. 21, p. 4066-4073, 2001.

FOX, Edward J. Mechanism of action of mitoxantrone. **Neurology** v. 63, n. 12 Suppl 6, p. S15–S18 , 2004.

FRAU, J *et al.* Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis and multiple sclerosis in Sardinian patients: epidemiology and clinical features. **Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)** v. 19, n. 11, p. 1437–42 , 2013.

RISCHER, Josa M. *et al.* The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. **Brain** v. 132, n. 5, p. 1175–1189 , 2009.

FUJITA, Tetsuro *et al.* Potent immunosuppressants, 2-alkyl-2-aminopropane-1,3-diols. **Journal of Medicinal Chemistry** v. 39, n. 22, p. 4451–4459 , 1996.

FUSCO, C *et al.* HLA-DRB1*1501 and response to copolymer-1 therapy in relapsing-remitting multiple sclerosis. **Neurology** v. 57, n. 11, p. 1976–1979 , 2001.

GARCIA-ECHEVERRIA, C; SELLERS, W R. Drug discovery approaches targeting the PI3K/Akt pathway in cancer. **Oncogene** v. 27, n. 41, p. 5511–5526 , 2008.

GERWIEN, Hanna *et al.* Imaging matrix metalloproteinase activity in multiple sclerosis as a specific marker of leukocyte penetration of the blood-brain barrier. **Science translational medicine** v. 8, n. 364, 2016.

GIACOPPO, Sabrina *et al.* Target regulation of PI3K/Akt/mTOR pathway by cannabidiol in treatment of experimental multiple sclerosis. **Fitoterapia** v. 116, p. 77–84 , 2017.

GIGLI, Gianluigi *et al.* Innate immunity modulates autoimmunity: type 1 interferon-beta treatment in multiple sclerosis promotes growth and function of regulatory invariant natural killer T cells through dendritic cell maturation. **Immunology** v. 122, n. 3, p. 409–17 , 2007.

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

GRIGORIADIS, Nikolaos; HADJIGEORGIOU, Georgios M. Virus-mediated autoimmunity in Multiple Sclerosis. **Journal of Autoimmune Diseases** v. 3, p. 1 , 2006.

GRYTTEN, N; TORKILDSEN, Ø; MYHR, K-M. Time trends in the incidence and prevalence of multiple sclerosis in Norway during eight decades. **Acta neurologica Scandinavica** v. 132, n. 199, p. 29–36 , 2015.

GYLLENBERG, A *et al.* Variability in the CIITA gene interacts with HLA in multiple sclerosis. **Genes and Immunity** v. 15, n. 10, p. 162–167 , 2014.

HAAS, Juergen *et al.* Glatiramer acetate improves regulatory T-cell function by expansion of naive CD4+CD25+FOXP3+CD31+ T-cells in patients with multiple sclerosis. **Journal of Neuroimmunology** v. 216, n. 1–2, p. 113–117 , 2009.

HALBGEBAUER, Steffen *et al.* Detection of intrathecal immunoglobulin G synthesis by capillary isoelectric focusing immunoassay in oligoclonal band negative multiple sclerosis. **Journal of Neurology** v. 263, n. 5, p. 954–960, 2016.

HANDEL, A.E. *et al.* The role of thymic tolerance in CNS autoimmune disease. **Nat Rev Neurol** v. 12, p. 723-734. doi: 10.1038/s41582-018-0095-7. 2018.

HAUSER, Stephen L. *et al.* B-Cell Depletion with Rituximab in Relapsing–Remitting Multiple Sclerosis. **New England Journal of Medicine** v. 358, n. 7, p. 676–688 , 2008.

HAYER, Silvia *et al.* PI3Kgamma regulates cartilage damage in chronic inflammatory arthritis. **The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology** v. 23, n. 12, p. 4288–4298 , 2009.

HAYLOCK-JACOBS, Sarah *et al.* PI3K δ drives the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibiting effector T cell apoptosis and promoting Th17 differentiation. **Journal of Autoimmunity** v. 36, n. 3–4, p. 278–287 , 2011.

HEMMER, Bernhard *et al.* Immunopathogenesis and immunotherapy of multiple sclerosis. **Nat. Clin. Pract. Neurol.** v. 2, p. 201–211, 2006.

HERCULANO-HOUZEL S. The glia/neuron ratio: how it varies uniformly across brain structures and species and what that means for brain physiology and evolution. **Glia.** v. 9, p.1377-91, 2014.

HAWKINS, P. T. *et al.* Signalling through Class I PI3Ks in mammalian cells. **Biochem Soc Trans**, v. 34, p. 647-62, 2006.

HOLLENBACH, Jill A.; OKSENBERG, Jorge R. The immunogenetics of multiple sclerosis: A comprehensive review. **Journal of Autoimmunity**, 2015.

HOU, HuiqingHou. *et al.* Fingolimod ameliorates the development of experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibiting Akt–mTOR axis in mice. **International Immunopharmacology**, v.30, p.171-178, 2016.

HUANG, B. *et al.* Combined use of etanercept and MTX restores CD4+/CD8+ ratio and Tregs in spleen and thymus in collagen-induced arthritis. **Inflammation Research** v. 61, n. 11, p. 1229–1239 , 2012.

HUANG, Y M *et al.* Multiple sclerosis is associated with high levels of circulating dendritic cells secreting pro-inflammatory cytokines. **Journal of neuroimmunology** v. 99, n. 1, p. 82–90 , 1999.

HUANG, Zan. Link Prediction Based on Graph Topology: The Predictive Value of Generalized Clustering Coefficient. **Workshop on Link Analysis: Dynamics and Static of Large Networks (LinkKDD2006)** p. 1–31 , 2006.

IMRELL, Kerstin *et al.* HLA-DRB1*15 and cerebrospinal-fluid-specific oligoclonal immunoglobulin G bands lower age at attainment of important disease milestones in multiple sclerosis. **Journal of Neuroimmunology** v. 210, n. 1–2, p. 128–130 , 2009.

INGLESE, Matilde; PETRACCA, Maria. Therapeutic strategies in multiple sclerosis: A focus on neuroprotection and repair and relevance to schizophrenia. **Schizophrenia Research**. 2015

IWASAKI, Yukiko *et al.* Interleukin-27 in T cell immunity. **International Journal of Molecular Sciences**, 2015.

JAMES, Martha J. *et al.* Anergic T cells exert antigen-independent inhibition of cell-cell interactions via chemokine metabolism. **Blood** v. 102, n. 6, p. 2173–2179 , 2003.

JIANG, Z *et al.* Apoptosis and activation of Erk1/2 and Akt in astrocytes postischemia. **Neurochem Res** v. 28, n. 6, p. 831–837 , 2003.

KANDEL, E S; HAY, N. The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB. **Experimental cell research** v. 253, n. 1, p. 210–229 , 1999.

KANG, Y *et al.* Treg cell resistance to apoptosis in DNA vaccination for experimental autoimmune encephalomyelitis treatment. **PLoS One** v. 7, n. 11, 2012.

KAPPOS, Ludwig *et al.* Ocrelizumab in relapsing-remitting multiple sclerosis: A phase 2, randomised, placebo-controlled, multicentre trial. **The Lancet** v. 378, n. 9805, p. 1779–1787 , 2011.

KAWANOKUCHI, J *et al.* Interleukin-27 promotes inflammatory and neuroprotective responses in microglia. **Clin. Exp. Neuroimmunol.** v. 4, p. 36–45, 2013.

- KLOSE, Juliane *et al.* Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by interleukin-10 transduced neural stem/progenitor cells. **Journal of neuroinflammation** v. 10, n. 1, p. 117 , 2013.
- KOHN, A.P. *et al.* Cutting edge: CD4+CD25+ regulatory t cells suppress antigen-specific autoreactive immune responses and central nervous system inflammation during active experimental autoimmune encephalomyelitis. **J. Immunol** v.169, p. 4712–4716, 2002.
- KORN, Thomas *et al.* Modulation of effector cell functions in experimental autoimmune encephalomyelitis by leflunomide--mechanisms independent of pyrimidine depletion. **Journal of leukocyte biology** v. 76, n. 5, p. 950–60 , 2004.
- KORNEK, Barbara *et al.* Multiple sclerosis and chronic autoimmune encephalomyelitis: A comparative quantitative study of axonal injury in active, inactive, and remyelinated lesions. **American Journal of Pathology** v. 157, n. 1, p. 267–276, 2000.
- KRATZ A. L, BRALEY T. J, FOXEN-CRAFT E, SCOTT E, MURPHY J.F, MURPHY S.L. How Do Pain, Fatigue, Depressive, and Cognitive Symptoms Relate to Well-Being and Social and Physical Functioning in the Daily Lives of Individuals With Multiple Sclerosis? **Arch Phys Med Rehabil.** 2017 Jul 18.
- KRISHNAMOORTHY, Gurumoorthy *et al.* Spontaneous optico-spinal encephalomyelitis in a double-transgenic mouse model of autoimmune T cell/B cell cooperation. **Journal of Clinical Investigation** v. 116, n. 9, p. 2385–2392 , 2006.
- KURTZKE, J F. A reassessment of the distribution of multiple sclerosis. **Acta neurologica Scandinavica** v. 51, n. 2, p. 137–57 , 1975.
- KURTZKE, J F. A reassessment of the distribution of multiple sclerosis. Part one. **.Acta neurologica Scandinavica**, 1975
- KURTZKE, J. F. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: An expanded disability status scale (EDSS). **Neurology** v. 33, n. 11, p. 1444–1444 , 1983.

KURTZKE, J. F. Natural history and clinical outcome measures for multiple sclerosis studies. Why at the present time does EDSS scale remain a preferred outcome measure to evaluate disease evolution? **Neurol Sc** v. 21 n. 6 , p. 339-41.

KUWABARA, Taku *et al.* The Role of IL-17 and Related Cytokines in Inflammatory Autoimmune Diseases. **Mediators of Inflammation** v. 2017, p. 1–11 , 2017.

LANA-PEIXOTO, Marco Aurélio. Devic's neuromyelitis optica: A critical review. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**. 2008

LAOUAR, Yasmina *et al.* TGF-beta signaling in dendritic cells is a prerequisite for the control of autoimmune encephalomyelitis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** v. 105, n. 31, p. 10865–70 , 2008.

LARONI, Alice *et al.* Dysregulation of regulatory CD56bright NK cells/T cells interactions in multiple sclerosis. **Journal of Autoimmunity** v. 72, p. 8–18 , 2016.

LASSMANN, Hans. Multiple sclerosis: Lessons from molecular neuropathology **.Experimental Neurology**. 2014

LAWRENCE, Michael S. *et al.* Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types. **Nature** v. 505, n. 7484, p. 495–501 , 2014.

LENK, H.; MULLER, U.; TANNEBERGER, S. Mitoxantrone: Mechanism of action, antitumor activity, pharmacokinetics, efficacy in the treatment of solid tumors and lymphomas, and toxicity **.Anticancer Research**. 1987

LI, Jian *et al.* Negative regulation of IL-17 production by OX40/OX40L interaction. **Cellular Immunology** v. 253, n. 1–2, p. 31–37 , 2008.

LIMA, Isabel Vieira de Assis *et al.* PI3K γ deficiency enhances seizures severity and associated outcomes in a mouse model of convulsions induced by intrahippocampal injection of pilocarpine. **Experimental Neurology** v. 267, p. 123–134 , 2015.

LINCOLN, John A.; COOK, Stuart D. An overview of gene-epigenetic-environmental contributions to MS causation. **Journal of the Neurological Sciences** v. 286, n. 1–2, p. 54–57 , 2009.

LIU, S. Q, *et al.* Matrine promotes oligodendrocyte development in CNS autoimmunity

through the PI3K/Akt signaling pathway. **Life Sci** v. 80, p. 36-41, 2017.

LOURENCO, Pedro *et al.* Oligoclonal bands and cerebrospinal fluid markers in multiple sclerosis: associations with disease course and progression. **Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)** v. 19, n. 5, p. 577–84 , 2013.

LUBLIN, F D; REINGOLD, S C. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. **Neurology** v. 46, n. 4, p. 907–911 , 1996.

LUBLIN, Fred D. The incomplete nature of multiple sclerosis relapse resolution. **Journal of the Neurological Sciences** v. 256, n. SUPPL. 1 , 2007.

LUPIA, E *et al.* Ablation of phosphoinositide 3-kinase-gamma reduces the severity of acute pancreatitis. **American Journal of Pathology** v. 165, n. 6, p. 2003–2011 , 2004.

LYCKE, Jan. Monoclonal antibody therapies for the treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis: differentiating mechanisms and clinical outcomes. **Therapeutic advances in neurological disorders** v. 8, n. 6, p. 274–93 , 2015.

MAHAD, Don H.; TRAPP, Bruce D.; LASSMANN, Hans. Pathological mechanisms in progressive multiple sclerosis. **The Lancet Neurology** v. 14, n. 2, p. 183–193 , 2015.

MAIR, Iris *et al.*, PD-1 expression is upregulated on adapted T cells in experimental autoimmune encephalomyelitis but is not required to maintain a hyporesponsive state. **Eur. J. Immunol** v.49, p. 112–120, 2019.

MANNING, Brendan D.; TOKER, Alex. AKT/PKB Signaling: Navigating the Network .**Cell**. 2017

MARRIE, Ruth Ann *et al.* A systematic review of the incidence and prevalence of comorbidity in multiple sclerosis: Overview. **Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)** p. 263–281, 2015.

MARS, L.T. *et al.* Cutting edge: V alpha 14-j alpha 281 nkt cells naturally regulate experimental autoimmune encephalomyelitis in nonobese diabetic mice **J. Immunol.** v. 168, p. 6007–6011, 2002.

MARTINELLI, V. *et al.* Mitoxantrone: Benefits and risks in multiple sclerosis patients. **Neurological Sciences**. 2009.

MATEJUK, A. *et al.* Estrogen treatment induces a novel population of regulatory cells, which suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis. **J. Neurosci. Res** v. 77, p. 119–126, 2004.

MATLOUBIAN, Mehrdad *et al.* Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. **Nature** v. 427, n. 6972, p. 355–360, 2004.

MCALLISTER, L D; BEATTY, P G; ROSE, J. Allogeneic bone marrow transplant for chronic myelogenous leukemia in a patient with multiple sclerosis. **Bone Marrow Transplant** v. 19, n. 4, p. 395–397, 1997.

MCALPINE, D; COMPSTON, Alastair. McAlpine's Multiple Sclerosis. **McAlpine's Multiple Sclerosis**. 2005. p. 83–91.

MCGEACHY, M J. *et al.* Natural recovery and protection from autoimmune encephalomyelitis: Contribution of CD4+CD25+ regulatory cells within the central nervous system. **J. Immunol** v. 175, p. 3025–3032, 2005.

MEANEY, J. F *et al.* Association between trigeminal neuralgia and multiple sclerosis: role of magnetic resonance imaging. **Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry** v. 59, n. 3, p. 253–259, 1995.

MELLANBY, R. J *et al.* Role of regulatory T-cells in autoimmunity. **Clin. Sci. (Lond.)** v. 116, p. 639–649, 2009.

MELCON, M O *et al.* Argentine Patagonia: prevalence and clinical features of multiple sclerosis. **Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)** v. 14, n. 5, p. 656–662, 2008.

MENDES, Maria Fernanda *et al.* Depressão na esclerose múltipla forma remitente-recorrente. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria** v. 61, n. 3 A, p. 591–595, 2003.

MIRON, Veronique E *et al.* M2 microglia and macrophages drive oligodendrocyte differentiation during CNS remyelination. **Nature Neuroscience** v. 16, n. 9, p. 1211–1218, 2013.

MITSDOERFFER, Meike; KUCHROO, Vijay. How does interferon- β really work in multiple sclerosis? **Annals of Neurology** v. 65, n. 5, p. 487–488 , 2009.

MOHAJERI, Maryam; SADEGHIZADEH, Majid; JAVAN, Mohammad. Pertussis toxin promotes relapsing-remitting experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats. **Journal of Neuroimmunology** v. 289, p. 105–110 , 2015.

MOHARREGH-KHIABANI, D *et al.* Fumaric Acid and its esters: an emerging treatment for multiple sclerosis. **Current neuropharmacology** v. 7, n. 1, p. 60–64 , 2009.

MOREIRA, M. A. *et al.* Chemokines in the cerebrospinal fluid of patients with active and stable relapsing-remitting multiple sclerosis. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica ... [et al.]** v. 39, n. 4, p. 441–5 , 2006.

MOREIRA, M. A. *et al.* Aspectos históricos de la esclerosis múltiple. **Rev Neurol** v. 34, n. 4, p. 378–383 , 2002.

MOSSER, David M.; EDWARDS, Justin P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nature Reviews Immunology** v. 8, n. 12, p. 958–969 , 2008.

MRAD, May F. *et al.* Effect of vitamin D replacement on immunological biomarkers in patients with multiple sclerosis. **Clinical Immunology** v. 181, p. 9–15 , 2017.

MSIF. Atlas of MS 2013: Mapping Multiple Sclerosis Around the World. **Multiple Sclerosis International Federation** p. 1–28, 2013.

MÜNZEL, E. Jolanda; WILLIAMS, Anna. Promoting remyelination in multiple sclerosis-recent advances .**Drugs**. 2013.

NITULESCU, G. Mihai; MARGINA, Denisa *et al.* Akt inhibitors in cancer treatment: The long journey from drug discovery to clinical use (Review). **Int J Oncol** v. 48, p. 869-85, 2016.

OKKENHAUG, Klaus; GRAUPERA, Mariona; VANHAESEBROECK, Bart. Targeting PI3K in cancer: Impact on tumor cells, their protective stroma, angiogenesis, and immunotherapy .**Cancer Discovery**. 2016.

OKSENBERG, Jorge R; BARANZINI, Sergio E. Multiple sclerosis genetics - is the

glass half full, or half empty? **Nature reviews. Neurology** v. 6, n. 8, p. 429–37 , 2010.

ORCY, Rafael Bueno *et al.* Signalization of Akt/PKB in the placenta, skeletal muscle and adipose tissue of preeclampsia patients. **Gynecologic and Obstetric Investigation** v. 66, n. 4, p. 231–236 , 2008.

PALMER, A M. Teriflunomide, an inhibitor of dihydroorotate dehydrogenase for the potential oral treatment of multiple sclerosis. **Curr Opin Investig Drugs** v. 11, n. 11, p. 1313–1323 , 2010.

PATRIKIOS, Peter *et al.* Remyelination is extensive in a subset of multiple sclerosis patients. **Brain** v. 129, n. 12, p. 3165–3172 , 2006.

PAUGH, Steven W. *et al.* The immunosuppressant FTY720 is phosphorylated by sphingosine kinase type 2. **FEBS Letters** v. 554, n. 1–2, p. 189–193 , 2003.

PEÓN, Alberto N. *et al.* Helminth Products Potently Modulate Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Downregulating Neuroinflammation and Promoting a Suppressive Microenvironment. **Mediators of Inflammation** v. 2017 , 2017.

PEREIRA, Valéria Coelho Santa Rita *et al.* Clinical response to interferon beta and glatiramer acetate in multiple sclerosis patients: a Brazilian cohort. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria** v. 70, n. 10, p. 774–779 , 2012.

POLKOWSKI, K., POPIOŁKIEWICZ, J *et al.* Cytostatic and cytotoxic activity of synthetic genistein glycosides against human cancer cell lines. **Cancer Lett** v.8, p. 59-69, 2004.

POLMAN, Chris H. *et al.* Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 Revisions to the McDonald criteria. **Annals of Neurology** v. 69, n. 2, p. 292–302 , 2011.

PORMOHAMMAD A, AZIMI T, FALAH F, FAGHIHLOO E. Relationship of Human Herpes Virus 6 and Multiple Sclerosis: A Systematic Review and Meta-analysis. **J Cell Physiol.** 2017. doi: 10.1002/jcp.26000.

RACKE, Michael K.; HU, Wei; LOVETT-RACKE, Amy E. PTX cruiser: Driving autoimmunity via TLR4 .**Trends in Immunology.** 2005

RANSOHOFF, Richard M.; KIVISÄKK, Pia; KIDD, Grahame. Three or more routes for

leukocyte migration into the central nervous system. **Nature Reviews Immunology** v. 3, n. 7, p. 569–581 , 2003.

REIF, K. *et al.* Cutting Edge: Differential Roles for Phosphoinositide 3-Kinases, p110 and p110 , in Lymphocyte Chemotaxis and Homing. **The Journal of Immunology** v. 173, n. 4, p. 2236–2240 , 2004.

REIS, E. F; CASTRO, S. B *et al.* Lipophilic amino alcohols reduces carrageenan-induced paw edema and anti-OVA DTH in BALB/c mice. **Int Immunopharmacol.** V. 17, p. 727-32, 2013.

REIS, E. F., CELSO, OR JR *et al.* Synthesis and immunosuppressive activity of lipophilic amino alcohols and diamines. **Chem Biol Drug Des.** v. 72, p. 596-8, 2008.

RÍO, Jordi; COMABELLA, Manuel; MONTALBAN, Xavier. Multiple sclerosis: current treatment algorithms. **Current Opinion in Neurology** v. 24, n. 3, p. 230–237 , 2011.

RIVERS, T M; SPRUNT, D H; BERRY, G P. Observations on Attempts To Produce Acute Disseminated Encephalomyelitis in Monkeys. **The Journal of experimental medicine** v. 58, n. 1, p. 39–53 , 1933.

RODRIGUES, David Henrique *et al.* Absence of PI3K^{-/-} leads to increased leukocyte apoptosis and diminished severity of experimental autoimmune encephalomyelitis. **Journal of Neuroimmunology** v. 222, n. 1–2, p. 90–94, 2010.

ROLLA, S. *et al.* Th22 cells are expanded in multiple sclerosis and are resistant to ifn-beta. **J. Leukoc. Biol.** v. 96, p. 1155–1164, 2014.

RUBIN, Keith; GLAZER, Steven. The potential role of subclinical Bordetella Pertussis colonization in the etiology of multiple sclerosis. **Immunobiology** v. 221, n. 4, p. 512–515 , 2016.

SACRAMENTO, T.O. *et al.* Orofacial changes in patientes with multiple sclerosis treated in Brazil. **IJMMS**, Maryland, v.35, n.5, p. 139-143, mai. 2011.

SALEHI, Z. *et al.* Differential frequency of CD8+ T cell subsets in multiple sclerosis patients with various clinical patterns. **PLoS ONE** v. 11, n. 7 , 2016.

SAMOILOVA, E B; HORTON, J L; CHEN, Y. Acceleration of experimental

autoimmune encephalomyelitis in interleukin-10-deficient mice: roles of interleukin-10 in disease progression and recovery. **Cellular immunology** v. 188, n. 2, p. 118–124, 1998.

SAROUKOLAEI, Shahla Amri *et al.* The role of *Candida albicans* in the severity of multiple sclerosis. **Mycoses** v. 59, n. 11, p. 697–704 , 2016.

SATO, Fumitaka *et al.* “Microglial nodules” and “newly forming lesions” may be a Janus face of early MS lesions; implications from virus-induced demyelination, the Inside-Out model. **BMC Neurology** v. 15, n. 1, p. 219 , 2015.

SAXTON, Robert A.; SABATINI, David M. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease .**Cell**. 2017.

SAWCER, S.; HELLENTHAL, G. The major histocompatibility complex and multiple sclerosis: A smoking gun? **Brain** v. 134, p. 638–640. 2011.

SÉNÉCAL, Vincent *et al.* Production of IL-27 in multiple sclerosis lesions by astrocytes and myeloid cells: Modulation of local immune responses. **GLIA** v. 64, n. 4, p. 553–569 , 2016.

SHEREMATA, William A. *et al.* The role of alpha-4 integrin in the aetiology of multiple sclerosis: Current knowledge and therapeutic implications .**CNS Drugs**2005

SHIRANI, Afsaneh *et al.* Association between use of interferon Beta and progression of disability in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. **JAMA : the journal of the American Medical Association** v. 308, n. 3, p. 247–256 , 2012.

SILVA, Ana Martins *et al.* The role of HLA-DRB1 alleles on susceptibility and outcome of a Portuguese Multiple Sclerosis population. **Journal of the Neurological Sciences** v. 258, n. 1–2, p. 69–74 , 2007.

SOARES, Rubens Murilo Gibaile *et al.* Optical neuritis induced by different concentrations of myelin oligodendrocyte glycoprotein presents different profiles of the inflammatory process. **Autoimmunity** v. 46, n. 7, p. 480–485 , 2013.

SOFRONIEW, M. V. e VINTERS, H.V. Astrocytes: biology and pathology. **Acta Neuropathol.** v. 119, p. 7-35, 2010.

SORENSEN, Per S. *et al.* Safety and efficacy of ofatumumab in relapsing-remitting multiple sclerosis: A phase 2 study. **Neurology** v. 82, n. 7, p. 573–581 , 2014.

SOSPEDRA, Mireia; MARTIN, Roland. Immunology of Multiple Sclerosis. **Seminars in Neurology** v. 36, n. 2, p. 115–127 , 2016.

STAAL, Stephen P; HARTLEY, Janet W; ROWE, Wallace P. Isolation of transforming murine leukemia viruses from mice with a high incidence of spontaneous lymphoma (AKR mice/Akv-2 congenic/nonproducer cell line/pseudotype). **Microbiology** v. 74, n. 7, p. 3065–3067 , 1977.

TABARKIEWICZ, Jacek *et al.* The Role of IL-17 and Th17 Lymphocytes in Autoimmune Diseases .**Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**. 2015

TELESHOVA, N *et al.* Multiple sclerosis and optic neuritis: CCR5 and CXCR3 expressing T cells are augmented in blood and cerebrospinal fluid. **Journal of Neurology**. v. 249, p. 723–729.

THOMAS, Matt; OWEN, Charles. Inhibition of PI-3 kinase for treating respiratory disease: good idea or bad idea? .**Current Opinion in Pharmacology**. 2008.

THOMAS, Matthew *et al.* Essential role of phosphoinositide 3-kinase gamma in eosinophil chemotaxis within acute pulmonary inflammation. **Immunology** v. 126, n. 3, p. 413–422 , 2009.

THOUVENOT, E. *et al.* Vitamin D is associated with degree of disability in patients with fully ambulatory relapsing-remitting multiple sclerosis. **European Journal of Neurology** v. 22, n. 3, p. 564–569 , 2015.

TZARTOS, John S. *et al.* Interleukin-17 Production in Central Nervous System-Infiltrating T Cells and Glial Cells Is Associated with Active Disease in Multiple Sclerosis. **The American Journal of Pathology** v. 172, n. 1, p. 146–155 , 2008.

UI, Michio *et al.* Wortmannin as a unique probe for an intracellular signalling protein, phosphoinositide 3-kinase .**Trends in Biochemical Sciences**. 1995.

VAN HAMBURG, J *et al.* Th17 cells, but not th1 cells, from patients with early rheumatoid arthritis are potent inducers of matrix metalloproteinases and

proinflammatory cytokines upon synovial fibroblast interaction, including autocrine interleukin-17a production. **Arthritis Rheum.** v. 63, p. 73–83. 2011.

VAN KAER, Luc; WU, Lan; PAREKH, Vrajesh V. Natural killer T cells in multiple sclerosis and its animal model, experimental autoimmune encephalomyelitis. **Immunology.** 2015.

VILELA, Márcia Carvalho *et al.* Traffic of leukocytes in the central nervous system is associated with chemokine up-regulation in a severe model of herpes simplex encephalitis: An intravital microscopy study. **Neuroscience Letters** v. 445, n. 1, p. 18–22, 2008.

VOGEL, Daphne YS *et al.* Macrophages in inflammatory multiple sclerosis lesions have an intermediate activation status. **Journal of Neuroinflammation** v. 10, n. 1, p. 35, 2013.

VOLPE, Elisabetta; BATTISTINI, Luca; BORSELLINO, Giovanna. Advances in T helper 17 cell biology: Pathogenic role and potential therapy in multiple sclerosis. **Mediators of Inflammation.** 2015.

WAISMAN, Ari; JOHANN, Lisa. Antigen-presenting cell diversity for T cell reactivation in central nervous system autoimmunity. **Journal of Molecular Medicine**
doi:10.1007/s00109-018-1709-7

WATAD, Abdulla *et al.* Seasonality and autoimmune diseases: The contribution of the four seasons to the mosaic of autoimmunity. **Journal of Autoimmunity.** 2017.

WALKER, L. S.; ABBAS, Abbul. K. The enemy within: keeping self-reactive T cells at bay in the periphery. **Nat. Rev. Immunol.** v. 2, p. 11–19, 2002.

WEBB, Adam *et al.* Evidence for PI-3K-dependent migration of Th17-polarized cells in response to CCR2 and CCR6 agonists. **Journal of leukocyte biology** v. 84, p. 1202–1212, 2008.

WEBER, Martin S *et al.* Type II monocytes modulate T cell-mediated central nervous system autoimmune disease. **Nature Medicine** v. 13, n. 8, p. 935–943, 2007.

WEINER, Howard L. The challenge of multiple sclerosis: How do we cure a chronic heterogeneous disease? **Annals of Neurology.** 2009.

- WEKERLE, Hartmut. B cells in multiple sclerosis. **Autoimmunity** v. 50, n. 1, p. 57–60 , 2017.
- WENSKY, A. K. *et al.* IFN-gamma Determines Distinct Clinical Outcomes in Autoimmune Encephalomyelitis. **The Journal of Immunology** v. 174, n. 3, p. 1416–1423 , 2005.
- WHO. Atlas Multiple Sclerosis resources In The World 2008. **WHO Press** p. 56 , 2008.
- WU, Qi *et al.* Dimethyl Fumarate Selectively Reduces Memory T Cells and Shifts the Balance between Th1/Th17 and Th2 in Multiple Sclerosis Patients. **The Journal of Immunology** v. 198, n. 8, p. 3069–3080 , 2017.
- WYMANN, M P *et al.* Wortmannin inactivates phosphoinositide 3-kinase by covalent modification of Lys-802, a residue involved in the phosphate transfer reaction. **Molecular and Cellular Biology** v. 16, n. 4, p. 1722–1733 , 1996.
- XI, G *et al.* CD133 and DNA-PK regulate MDR1 via the PI3K- or Akt-NF- κ B pathway in multidrug-resistant glioblastoma cells in vitro. **Oncogene** n. February, p. 1–10 , 2015.
- XIANG, Sue D. *et al.* Pathogen recognition and development of particulate vaccines: Does size matter? **Methods** v. 40, n. 1, p. 1–9 , 2006.
- Xiao, J., Liu, W *et al.* Recombinant human PDCD5 (rhPDCD5) protein is protective in a mouse model of multiple sclerosis. **J Neuroinflammation** v.12 p.117, 2015.
- Xing, Y *et al.* T-cell tolerance: central and peripheral. **Cold Spring Harb. Perspect. Biol.** 4, 2012.
- YAMAZAKI, Takahiro; NAGATA, Kisaburo; KOBAYASHI, Yoshiro. Cytokine production by M-CSF- and GM-CSF-induced mouse bone marrow-derived macrophages upon coculturing with late apoptotic cells. **Cellular Immunology** v. 251, n. 2, p. 124–130 , 2008.
- YBARRA, Mariana Inés *et al.* Bipolar disorder and multiple sclerosis. **Arquivos de neuro-psiquiatria** v. 65, n. 4B, p. 1177–1180 , 2007.
- YONG, V. W. *et al.* Experimental models of neuroprotection relevant to multiple sclerosis. 2007.

- ZHAO, Y. *et al.* E3 ubiquitin ligase cbl-b regulates thymic-derived CD4+CD25+ regulatory T cell development by targeting Foxp3 for Ubiquitination. **J. Immunol.** v.19, p. 1639–1645, 2015.
- ZHANG, LIZHI *et al.* Activation of astrocytes and expression of inflammatory cytokines in rats with experimental autoimmune encephalomyelitis. **Exp Ther Med.** v16, p. 4401–4406, 2018.
- ZEINSTRA, E., *et al.* Reactive astrocytes in chronic active lesions of multiple sclerosis express co-stimulatory molecules B7-1 and B7-2. **J Neuroimmunol** v.135, p.166-71. 2003.
- ZHANG, Jianhong; DUNK, Caroline E.; LYE, Stephen J. Sphingosine signalling regulates decidual NK cell angiogenic phenotype and trophoblast migration. **Human Reproduction** v. 28, n. 11, p. 3026–3037 , 2013.
- ZHANG, Li *et al.* Traumatic Brain Injury-Induced Neuronal Apoptosis is Reduced Through Modulation of PI3K and Autophagy Pathways in Mouse by FTY720. **Cellular and Molecular Neurobiology** v. 36, n. 1, p. 131–142 , 2016.
- ZHANG, Li *et al.* FTY720 reduces migration and invasion of human glioblastoma cell lines via inhibiting the PI3K/AKT/mTOR/p70S6K signaling pathway. **Tumor Biology** v. 35, n. 11, p. 10707–10714 , 2014.
- ZHANG, Li *et al.* FTY720 reduces migration and invasion of human glioblastoma cell lines via inhibiting the PI3K/AKT/mTOR/p70S6K signaling pathway. **Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine** v. 35, n. 11, p. 10707–14 , 2014.
- ZHANG, Weizhi *et al.* B-adrenergic receptor-Pi3k signaling crosstalk in mouse heart: Elucidation of immediate downstream signaling cascades. **PLoS ONE** v. 6, n. 10 , 2011.
- ZHANG, Xingmin *et al.* IL-10 is involved in the suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by CD25+CD4+ regulatory T cells. **International Immunology** v. 16, n. 2, p. 249–256 , 2004.