

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Luan Crístian da Silva

**EFEITO DO DERIVADO ANTRAQUINÔNICO 1-METOXI-4-((2-
HIDROXITETRADECIL)AMINO)-ANTRACENO-9,10-DIONA
(MTA), ANÁLOGO A MITOXANTRONA, NA MODULAÇÃO DA
RESPOSTA IMUNE EM MODELO DE ENCEFALOMIELITE
AUTOIMUNE EXPERIMENTAL**

JUIZ DE FORA

2015

LUAN CRISTIAN DA SILVA

EFEITO DO DERIVADO ANTRAQUINÔNICO 1-METOXI-4-((2-HIDROXITETRADECIL)AMINO)-ANTRACENO-9,10-DIONA (MTA), ANÁLOGO A MITOXANTRONA, NA MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE EM MODELO DE ENCEFALOMIELEITE AUTOIMUNE EXPERIMENTAL

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas na área de Imunologia e DIP.

Orientadora: Prof^a. Dra. Ana Paula Ferreira

JUIZ DE FORA

2015

da Silva, Luan Cristian.

EFEITO DO DERIVADO ANTRAQUINÔNICO 1-METOXI-4-((2-HIDROXITETRADECIL)AMINO)-ANTRACENO-9,10-DIONA (MTA), ANÁLOGO A MITOXANTRONA, NA MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE EM MODELO DE ENCEFALOMIELEITE AUTOIMUNE EXPERIMENTAL / Luan Cristian da Silva. -- 2015.

88 p.

Orientadora: Ana Paula Ferreira

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2015.

1. EAE. 2. Mitoxantrona. 3. Cardiotoxicidade. I. Ferreira, Ana Paula, orient. II. Título.

“A persistência é o menor caminho do êxito.”
Charles Chaplin

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (PGCBIO) por me possibilitarem alcançar esse objetivo.

É com muita satisfação que expresso aqui o mais profundo agradecimento a todos aqueles que de alguma forma tornaram a realização deste trabalho possível.

Aos meus pais, Wilton e Andreia, e à minha irmã Rayanne, pelo apoio a minha formação e por compartilharem comigo o sonho de realização dessa etapa.

À minha família, meu sincero agradecimento pela força e apoio em todos os momentos.

Em especial, à querida Professora Ana Paula Ferreira, pela confiança, ensinamento, paciência e por ser tão dedicada sempre com seus alunos.

Aos meus colegas e funcionários do IMUNOCET, com os quais tive o prazer em conviver, meu muito obrigado pelo apoio e pelos momentos de descontração que sempre surgiam em meio a longos experimentos e fases difíceis que enfrentamos.

Aos “Amigos da EAE”, Caio, Sandra, Alyria e Marcilene, por toda colaboração, incentivo e aprendizado.

Às alunas Renata, Fabiana e Rhaíssa, pela dedicação e disposição, sempre contribuindo para a realização do trabalho.

Ao amigo Erick pelos conselhos e por toda a ajuda fornecida.

Aos sempre amigos da Biodelirante, pelos 7 anos de história e companheirismo nos momentos de alegria e tristeza. Em especial à amiga Ana Gualberto pelo apoio não só na vida profissional, mas também na pessoal.

Ao professor Mauro Almeida e toda sua equipe do Departamento de Química pela síntese dos análogos e todo apoio fornecido.

Aos professores membros da banca por aceitarem o convite e pelas contribuições ao trabalho.

Aos amigos formados no Colégio Apogeu que, sem dúvidas nenhuma, também contribuíram para meu crescimento profissional e pessoal nesse período.

RESUMO

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 Mitoxantrona (MIT) é um agente usado para o tratamento da EM, entretanto, a cardiotoxicidade é um dos efeitos adversos do tratamento acumulativo. O presente estudo investigou o efeito do novo derivado antraquinônico, 1-Metoxi-4-((2-hidroxitetradecil)amino)-antraceno-9,10-diona, denominado MTA, em modelo de EAE. Camundongos C57BL/6 foram imunizados com o peptídeo da Glicoproteína Mielínica de Oligodendrócitos (MOG₃₅₋₅₅) em adjuvante completo de Freund, suplementado com *Mycobacterium tuberculosis* H37RA e tratados com 1mg/Kg de MIT ou MTA do dia 14 ao dia 20 pós-imunização. Os efeitos tóxicos provenientes dos tratamentos com a MIT e o MTA, após 7 dias de tratamento em camundongos C57BL/6 imunizados, foram analisados a partir de curvas de sobrevivência, massa corporal e dosagem sérica da proteína CK-MB. No 21º dia após a imunização, as medulas espinhais foram removidas e submetidas a análises como dosagem de citocinas pró-inflamatórias IFN- γ , IL-17, IL-6, regulatórias, IL-10 e TGF- β e quimiocinas CCL5 e CCL20 através de ELISA. Foi feita a fenotipagem celular através da expressão dos marcadores CD4, CD8, CD19, CD11b, CD11c e F4/80 por citometria de fluxo e avaliação da presença de infiltrados inflamatórios e desmielinização em amostras de tecido. O tratamento com MTA reduziu o escore clínico da doença em camundongos C57BL/6 imunizados com o MOG₃₅₋₅₅, o que foi associado com a redução da desmielinização e de células pró-inflamatórias, secreção das citocinas IL-17, IFN- γ , IL-6 e aumento de IL-10 e TGF- β na medula espinhal, de forma similar à MIT. Porém, o tratamento com MIT reduziu a capacidade de sobrevivência, massa corporal dos animais e ainda elevou a secreção da proteína CK-MB no soro, sugerindo estresse muscular cardíaco durante o período de tratamento, o que não foi observado no grupo MTA. Os resultados sugerem um importante papel do MTA na modulação da resposta imune envolvida na EM. A atenuação da inflamação e consequentemente a redução do escore clínico envolvendo a redução de

citocinas pró- inflamatórias, indicam esse composto como um tratamento alternativo para doenças autoimunes no sistema nervoso central.

Palavras-chave: EAE- mitoxantrona- cardiotoxicidade

ABSTRACT

Multiple sclerosis (MS) is an autoimmune demyelinating inflammatory disease that affects the central nervous system (CNS). The experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) is an animal model for the study of MS. Mitoxantrone (MIT) is an agent used for treatment of MS, however, the cardiotoxicity is a cumulative adverse effects of treatment. This study investigated the effect of the new derivative anthraquinone, 1-methoxy-4 - ((2-hydroxytetradecyl) amino) anthracene-9,10-dione, called MTA in EAE model. C57BL/6 mice were immunized with the peptide of myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG₃₅₋₅₅) in complete Freund's adjuvant supplemented with *Mycobacterium tuberculosis* H37RA and treated with 1 mg/kg of MIT or MTA the day 14 to day 20 post-immunization. The toxic effects arising from treatment with MTA and MIT after 7 days of treatment in C57BL/6 mice immunized were analyzed using survival curves, body weight and serum protein CK-MB. At day 21 after immunization, the spinal cords were removed and subjected to analysis such as determination of pro-inflammatory cytokines IFN- γ , IL-17, IL-6 and regulatory cytokines IL-10 and TGF- β and CCL5, CCL20 chemokines using ELISA, cellular phenotype through expression of markers CD4, CD8, CD19, CD11b, CD11c, F4/80 by flow cytometry and the presence of inflammatory infiltrates and demyelination by histopathology. Treatment with MTA reduced the clinical score of the disease in C57BL /6 mice immunized with MOG₃₅₋₅₅, which was associated with the reduction of demyelination, presence of pro-inflammatory cells, release of cytokines IL-17, IFN- γ , IL-6 and increased of IL-10 and TGF- β in the spinal cord, as well as the MIT. However, treatment with MIT reduced survivability, the body weight and further increased the production of CK-MB in serum protein, suggesting cardiac muscle stress during the treatment, which was not observed in the MTA group. The results suggest an important role of MTA in modulating the immune response involved in MS. The attenuation of inflammation and thereby reduce the clinical score involving the reduction of pro-inflammatory cytokines indicate this compound as an alternative treatment for autoimmune diseases in the central nervous system.

Keywords: EAE- mitoxantrone- cardiotoxicity

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1- Distribuição mundial da prevalência de EM [Federação Internacional de Esclerose Múltipla	16
Figura 2- Ativação de células T CD4+ mielino-específicas na periferia e SNC .	20
Figura 3- Padrões clínicos da Esclerose Múltipla	22
Figura 4- Estágios de diferenciação de células TCD4+	27
Figura 5- Ativação de células TCD8+ mielino-reativas através da apresentação antigênica por APCs via expressão de MHC de classe I no cérebro após indução da EAE.....	28
Figura 6- Estágios de diferenciação de células imunes inatas (ILCs)	30
Figura 7- Estrutura química da mitoxantrona.....	35
Figura 8- Síntese dos análogos da mitoxantrona	41
Figura 9- Avaliação dos efeitos tóxicos dos tratamentos com MIT e MTA após 7 dias de tratamento.....	48
Figura 10- Avaliação dos efeitos tóxicos dos tratamentos com MIT e MTA no 21º dpi	49
Figura 11- Escore clínico da EAE.....	51
Figura 12- Avaliação Histopatológica da medula espinhal de camundongos imunizados ou não com 100 µg de peptídeo MOG ₃₅₋₅₅	53
Figura 13- Perfil celular na medula espinhal. Porcentagem e o número de células expressando CD4, CD8, CD19, CD11c, CD11b e F4/80 na medula espinhal.....	55
Figura 14- Perfil celular na medula espinhal. Número de células T CD4+ expressando IFN-γ, IL-17, IL-10 e FoxP3 na medula espinhal.....	57
Figura 15- Avaliação das citocinas pró- inflamatórias na medula espinhal no 21º dpi	59
Figura 16- Avaliação das citocinas regulatórias na medula espinhal no 21º dpi	60
Figura 17- Avaliação da produção de quimiocinas CCL5 e CCL20 no sobrenadante de homogenato de medula espinhal.....	62

Tabela 1- Fenótipos clínicos dos modelos de EAE	23
Tabela 2- Escala de incapacidade neurológica.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

HBV - “Hepatite B Vírus” - vírus da hepatite B

MBP - “Myelin Basic Protein” - Proteína Básica da Mielina

APC - “Antigen-presenting Cell” – Célula Apresentadora de Antígeno

MHC - “Major Histocompatibility Complex”- Complexo de Histocompatibilidade Principal

HLA - “Human Leukocyte Antigen” – Antígeno Leucocitário Humano

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

CTLA-4- “Cytotoxic T-lymphocyte-Associated Protein 4”- Antígeno Citotóxico Associado ao Linfócito T 4

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

MOG – “Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein” – Glicoproteína Mielínica de Oligodendrócitos

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

NO – “Nitric Oxide”- Óxido Nítrico

CFA – “Complete Freund's Adjuvant”- Adjuvante Completo de Freund

VLA-4- “ Very Late Antigen-4” – Antígeno Muito Tardio 4

LFA-1- “Lymphocyte Function-Associated Antigen 1” – Antígeno Associado à Função Linfocítica

TLR- 4- “Toll-like Receptor-4”- Receptor Semelhante a Toll- 4

PLP- “Proteolipidic Protein” – Proteína Proteolipídica

MAG- “Myelin-Associated Glycoprotein” – Glicoproteína Associada à Mielina

TCR- “T Cell Receptor”- Receptor de Células T

BCR- “B Cell Receptor” – Receptor de Células B

ADCC- “Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity” – Citotoxicidade Celular Dependente de Anticorpos

ILCs- “Innate lymphoid cells”- Células Linfoides Inatas

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Aspectos gerais da Esclerose Múltipla	15
1.2 Aspectos gerais da Encefalomielite Autoimune Experimental	22
1.3 Aspectos imunológicos da EM e EAE	25
1.4 O tratamento da EM	32
1.4.1 A mitoxantrona no tratamento da EM	35
2 OBJETIVOS	38
3 MATERIAL E MÉTODOS	40
3.1 Síntese dos análogos da mitoxantrona	40
3.2 Avaliação do derivado MTA no modelo <i>in vivo</i> de EAE	42
3.2.1 Animais.....	42
3.2.2 Indução da EAE	42
3.2.3 Tratamento com mitoxantrona e análogo MTA.....	42
3.2.4 Avaliação dos efeitos tóxicos da MIT e análogo MTA	43
3.2.5 Avaliação clínica	43
3.2.6 Obtenção de órgãos e células.....	44
3.2.7 Análise Histopatológica.....	44
3.2.8 Quantificação de citocinas e quimiocinas por ELISA.....	45
3.2.9 Isolamento de células mononucleares da medula espinhal.....	45
3.2.10 Avaliação fenotípica das células da medula espinhal.....	46
3.2.11 Análise estatística	46
4 RESULTADOS	47
4.1 Avaliação dos efeitos tóxicos da mitoxantrona e análogo	47
4.2 Avaliação do curso clínico da EAE	50

4.3 Avaliação histopatológica da medula espinhal	52
4.4 Avaliação do perfil celular da medula espinhal	54
4.5 Detecção da produção intracelular de IFN-γ, IL-17, IL-10 e FoxP3 em linfócitos TCD4+	56
4.6 Análise da produção de citocinas pró- inflamatórias (IFN-γ, IL-17 e IL-6) e citocinas regulatórias (IL-10 e TGF-β) na medula espinhal	58
4.7 Avaliação de quimiocinas na medula espinhal	61
5 DISCUSSÃO	63
6 CONCLUSÃO	71
REFERÊNCIAS	72

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais da Esclerose Múltipla

A Esclerose Múltipla (EM) é uma doença inflamatória crônica desmielinizante que afeta o Sistema Nervoso Central (SNC). É caracterizada pela degeneração e disfunção neuronal, podendo resultar em quadros de incapacidades física e cognitiva (revisado por SOSPEDRA e MARTIN, 2005; PATRIKIOS et al., 2006).

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 20.

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 recentes 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).

Em 2008, a Organização Mundial da Saúde (ONU) 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.

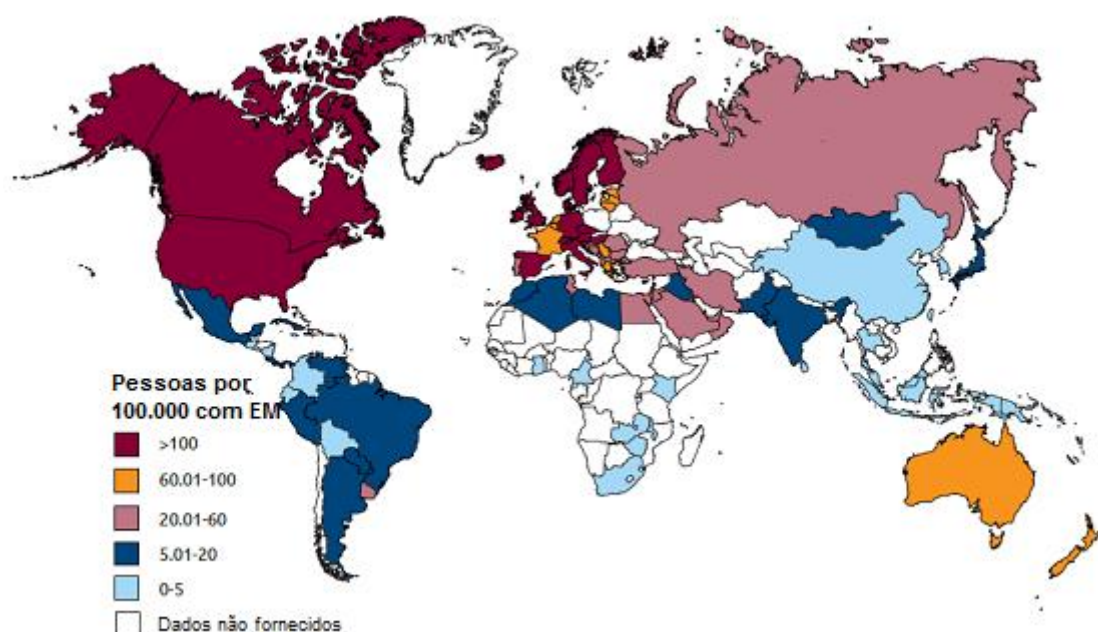


Figura 1- Distribuição mundial da prevalência de EM [Federação Internacional de Esclerose Múltipla (FIMS, 2013)]

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, 2008).

Acredita-se que existam contribuições ambientais e genéticas para a patogênese da EM. No primeiro caso, a diferença geográfica (latitude) é considerada um dos fatores de susceptibilidade. 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 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, dieta alimentar e fumo (revisado por LINCOLN e COOK, 2009).

Atualmente, muitos trabalhos têm destacado a grande relevância da vitamina D para a EM. Thouvernot (2014) verificou em seu trabalho que pacientes com EM que apresentaram deficiência em vitamina D estavam associados às formas mais graves 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 está 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 pólos do planeta, tendem a apresentar maiores taxas de prevalência da doença provavelmente por possuírem populações com níveis de produção de vitamina D mais baixos.

Recentemente foi proposto que as infecções virais, como aquelas causadas pelo vírus Epstein-Barr podem estar envolvidas no início da patogênese da EM. Fujinami e Oldstone (1985) já haviam verificado uma semelhança estrutural entre peptídeos do vírus da hepatite B (HBV, *do inglês*

Hepatite B Vírus) com a proteína básica da mielina (MBP, *do inglês* Myelin Basic Protein) e concluíram que a infecção por VHB, associada a outros fatores, poderia desencadear a EM, por ativação de linfócitos T que respondem ao peptídeo do VHB e também à MBP. Nesse caso, após a infecção, os vírus ativam células apresentadoras de antígenos (APCs, *do inglês* Antigen-presenting Cells), e por conterem sequências protéicas similares as dos antígenos da mielina desencadeiam respostas imunológicas contra o vírus, que resultam em reações contra os próprios tecidos, sendo este evento conhecido como “mimetismo molecular” (GRIGORIADIS, 2006, BRETTSCHEIDER et al., 2009). Outros patógenos, como micobactérias, também são associados com a patogênese da EM, uma vez que os lipídios presentes nos bacilos são considerados Padrões Moleculares Associados à Patógenos (PAMPs, *do inglês* Pathogen-Associated Molecular Pattern), os quais são reconhecidos por TLR2 (*do inglês*, Toll-like Receptor-2) e TLR4 que induzem uma resposta inflamatória envolvendo as citocinas TNF- α (*do inglês*, Tumor necrosis factor alpha) e IL-6, IL-1 β e IL-12. A função principal dessas moléculas é mediar a resposta imune não apenas contra patógenos, mas também contra tumores, porém as mesmas também são relacionadas à autoimunidade e doenças inflamatórias crônicas. A habilidade de agonistas de TLRs em ativar a resposta imune pode estar então, relacionada à autoimunidade induzida por infecções (revisado por GOLDENBERG et al., 2015).

Com relação ao fator genético, os estudos mostram que a prevalência de EM é maior em indivíduos que possuem relação genética com outros pacientes de EM, sugerindo, portanto, predisposição genética. Alguns genes de susceptibilidade já foram relacionados com a doença (revisado por SOSPEDRA E MARTIN, 2005).

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 HLA-DR e HLA-DQ, em particular o haplótipo HLA-DR15 em caucasianos. O HLA-DR15 tem sido associado aos membros das famílias do Fator Transformador do 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. Entretanto, ainda existem poucas informações com relação ao risco genético conferido pelos alelos HLA de classe I (WEINER et. al., 2009).

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+ periféricas com reatividade à mielina. Essas células atravessam a barreira hematoencefálica (BHE) em direção ao SNC, auxiliadas por um aumento na permeabilidade vascular no SNC 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 à estas células T CD4+ no SNC, reativando estas células e levando à produção e liberação de mediadores inflamatórios tais como, espécies reativas de oxigênio (ROS, *do inglês* Reactive Oxygen Species), óxido nítrico (NO, *do inglês* Nitric Oxide) e prostaglandina E2 (PGE2), culminando com lesão ou destruição da bainha de mielina (RANSOHOFF, et al. 2003). A figura 2 resume todo este processo (Goverman, 2009).

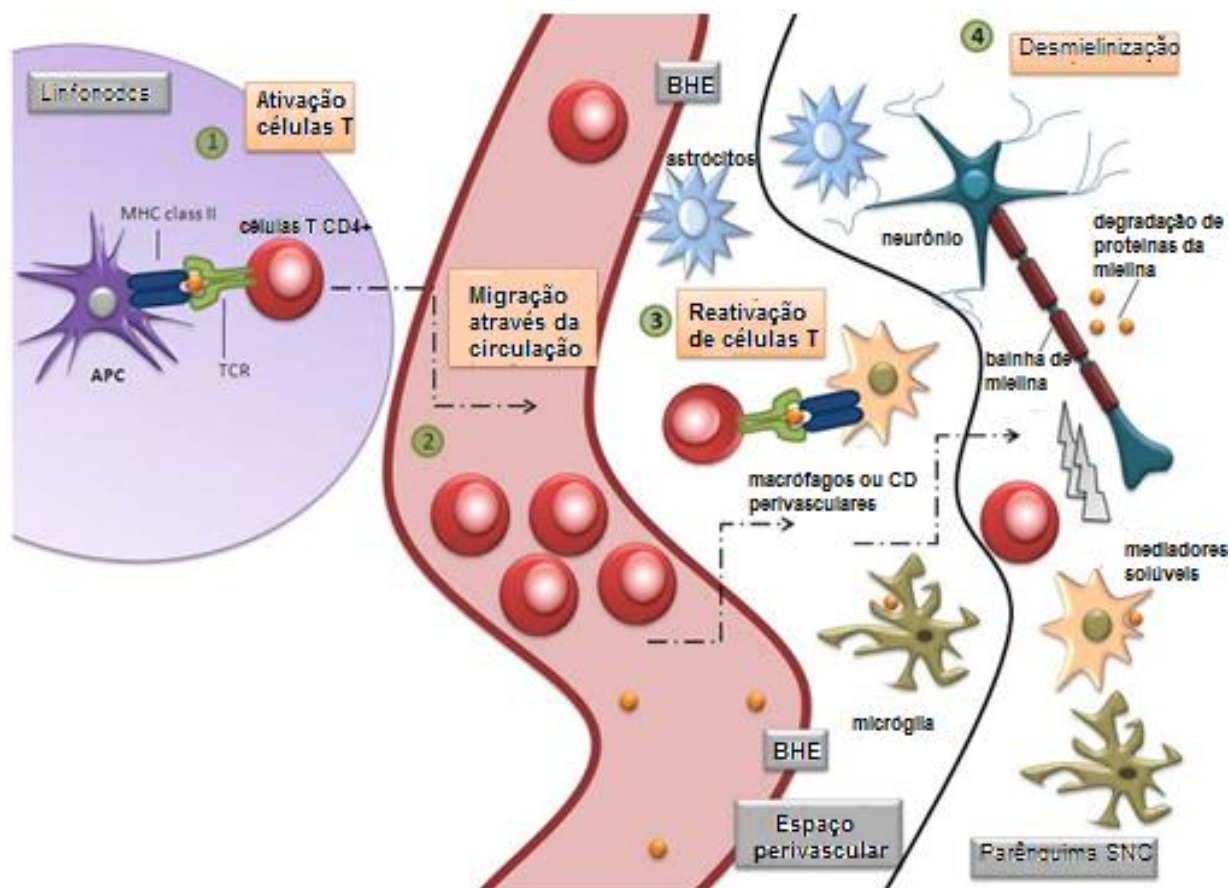


Figura 2- Ativação de células T CD4+ mielino-específicas na periferia e SNC (adaptada de Goverman, 2009).

Os sintomas mais comuns que têm sido descritos para a EM são fraqueza muscular, parestesias, deficiências visuais e/ou auditivas, alterações na coordenação motora e no controle dos movimentos finos, alterações urinárias e/ou sexuais, vertigens e/ou desequilíbrios, dores faciais, no tronco e/ou nas extremidades, disartria e/ou disfagia, entre outros (HAFLER et. al., 2004). 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 com o número e a gravidade dos surtos nos primeiros anos da doença, sendo que o diagnóstico e o tratamento precoce são ainda imprescindíveis (BALSIMELLI et.al., 2007).

É possível distinguir basicamente quatro formas clínicas da doença: no estágio inicial, a maioria dos pacientes, cerca de 85%, apresenta 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, cerca de 80%, evolui para a forma Secundária-Progressiva (SP), que após a remissão dos surtos, apresentam leve progressão da doença. Aproximadamente 10% dos pacientes apresentam a EM 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; revisado por SOSPEDRA e MARTIN, 2005; LUBLIN et. al., 2007; GOVERMAN, 2009).

Em 2007, Lublin apresentou estes padrões clínicos da doença em um gráfico, o qual foi obtido pela medida de escore clínico segundo a Escala Expandida do Estado de Incapacidade, 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 foi associado a um prognóstico ruim da doença.

As variadas formas clínicas observadas no curso da EM podem ser explicadas pela desmielinização, graus de inflamação, remielinização e neurodegeneração (revisado por PETERSON e FUJINAMI, 2007). Foi demonstrado que a presença de infiltrados inflamatórios que estão associados à degradação da mielina, presente nos oligodendrócitos e nos axônios, interfere diretamente na condução nervosa (BASSO et. al, 2008).

Lesões desmielinizantes no SNC não são exclusivas da EM, podendo ser observadas em outros quadros patológicos que afetam o SNC. Devido a isso, foi criado um critério de diagnóstico mais específico para a doença. Atualmente, os Critérios de McDonald propostos em 2010 são mundialmente utilizados no diagnóstico da EM (POHLMAN et. al., 2011). Tais critérios são baseados fundamentalmente no quadro clínico e nas imagens da Ressonância Magnética, podendo-se obter o diagnóstico de EM já na primeira manifestação da doença, desde que haja lesões desmielinizantes em estágios diferentes de evolução. Recentemente, a busca de auto-anticorpos contra a mielina também tem sido uma forma de diagnóstico para a EM. Lima e colaboradores (2008) identificaram a presença de anticorpos anti-mielina

através da técnica de imunofluorescência indireta em amostras de medula espinhal de pacientes com EM.

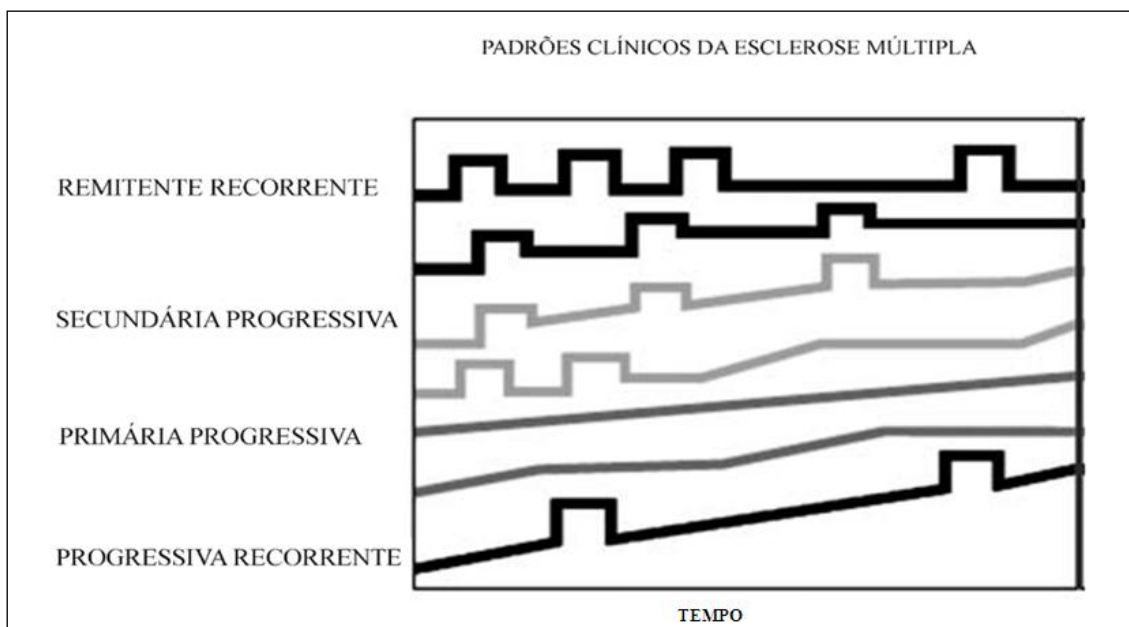


Figura 3- Padrões clínicos da Esclerose Múltipla. A inclinação do gráfico para direita indica piora do escore clínico (Adaptada de Lublin, 2007).

1.2 Aspectos gerais da Encefalomielite Autoimune Experimental

Devido à inacessibilidade ao SNC do paciente, o estudo da EM em humanos é restrito à utilização de constituintes do sangue periférico, fluido cerebrospinal (FCE) e tecido *post-mortem*. 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).

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 foram induzidos recebendo injeções de extrato de cérebros de coelhos e desenvolveram sinais clínicos relacionados ao SNC, apresentando reações inflamatórias acompanhadas de desmielinização perivascular no mesencéfalo, medula e cerebelo.

Atualmente, existem vários modelos de EAE, apresentando variações nas 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).

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).

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

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 (revisado por RACKE et. al., 2005).

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* 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).

Os antígenos da mielina mais comumente utilizados compreendem o MOG, MBP, proteína proteolipídica (PLP, *do inglês* Proteolipidic Protein) e glicoproteína associada à mielina (MAG, *do inglês* Myelin-Associated Glycoprotein) (PÖLLINGER et al. 2009).

A EAE pode também ser induzida por transferência adotiva de linfócitos T CD4+ autorreativos injetados por via intravenosa em animais susceptíveis. Esse modelo, diferentemente do modelo de imunização ativa, permite avaliar de forma independente do adjuvante que contém a micobactéria a função das células transferidas. Assim, a EAE desenvolve-se mais rapidamente e de forma mais homogênea, o que permite o estudo da fase efetora independentemente da fase de indução (WEKERLE et. al., 1994).

Além dos modelos de indução descritos acima, alguns outros tipos de modelos podem ser utilizados para o desenvolvimento da EAE, sendo que esses apresentam como vantagens a indução do modelo de forma mais

“natural” e, além disso, maior semelhança com o desenvolvimento da doença humana. Os mais interessantes exemplos dessa forma de imunização incluem os modelos de animais transgênicos para o Receptor de Células T (TCR, *do inglês* T Cell Receptor). Nesses animais, o TCR reconhece de forma específica auto-antígenos encontrados no cérebro, assim como o MOG, utilizando a molécula de MHC de classe II (BETTELLI et. al., 2003). Alguns trabalhos foram desenvolvidos a partir do cruzamento de camundongos C57BL/6 transgênicos para o TCR e receptor de células B (BCR, *do inglês* B Cell Receptor). Esses camundongos apresentam uma forma de EAE espontânea similar à Neuromielite óptica relacionada à EM (KRISHNAMOORTHY et. al., 2006; BETTELLI et. al., 2006).

Further e colaboradores (2009) descreveram um modelo de EAE espontânea em camundongos SJL/J que apresenta TCR MOG-específico e que clinicamente desenvolve o fenótipo remitente-recorrente. Em adição a isso, esse modelo desenvolve um recrutamento de células B endógenas que coopera com a população de células T autorreativas para a promoção da patogênese da EAE.

Dessa forma, os modelos experimentais mostram-se necessários para o estudo do desenvolvimento de patologias e possíveis terapias.

1.3 Aspectos Imunológicos da EM e EAE

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).

Estudos iniciais em EM eram restritos a análises da composição celular das lesões encontradas no cérebro e células infiltradas no fluido cérebro-espinhal (FCE) analisadas a partir de modelos de EAE. A partir desses estudos, foi verificada a maior participação de células T CD4+ na resposta imune desenvolvida na EAE e EM (revisado por COMPSTON e COLES, 2002; revisado por McFARLAND e MARTIN, 2007). Porém, atualmente sabe-se que a patogenia envolvida na doença é bem mais complexa, e que vários tipos celulares contribuem para o processo patológico, mesmo que de forma indireta (Figura 4). A EM, por muitos anos, foi considerada uma doença mediada por células T auxiliares do tipo 1 (Th1) e por citocinas produzidas por essas células, como por exemplo, o interferon-gama (IFN- γ) (MARCONDES et al., 2005; revisado por SOSPEDRA e MARTIN, 2005; WENSKY et. al., 2005).

Os linfócitos T helper 17 (Th17), produtores de IL-17 têm sido diretamente relacionados com o desenvolvimento da EAE (MURPHY et al., 2010; KANG et al., 2010;). A polarização de linfócitos Th17 ocorre na presença da Interleucina-6 (IL-6) e do 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 conseqüentemente dos linfócitos Th17 (KROENKE, 2008; QUINTANA, 2009).

A citocina IL-17 tem sido caracterizada como uma molécula pró-inflamatória que estimula células epiteliais, endoteliais e fibroblastos a produzirem outras citocinas e quimiocinas como, por exemplo, IL-6, proteínas inflamatórias de macrófagos, fatores estimulatórios de granulócitos e proteínas quimioatraentes de monócitos (PARK et al., 2005). A migração inicial de células Th17 para o SNC parece estar relacionada com o receptor de quimiocina CCR6, constitutivamente expresso por células Th17, que encontra seu ligante CCL20 em células epiteliais do plexo coróide e regula a entrada destes linfócitos no SNC (REBOLDI, 2009).

Imler e Petro (2008), ao realizar a administração de resveratrol em camundongos com EAE, identificaram uma população de células Th17 que

expressava IL-10, tais células foram denominadas pelos autores nesse trabalho como células Th17 reguladoras como uma forma de diferenciação das células Th17 até então conhecidas como patogênicas no modelo de EAE e em outros modelos de doenças inflamatórias por expressarem as citocinas pró-inflamatórias IL-17 e IL-22. Neste caso, a IL-10 produzida pelas células Th17 foi responsável por auxiliar a regulação do processo inflamatório da EAE, diminuindo os sinais clínicos da doença. (IMLER Jr; PETRO, 2008; revisto por LOUTEN; BONIFACE; MALEFYT, 2009).

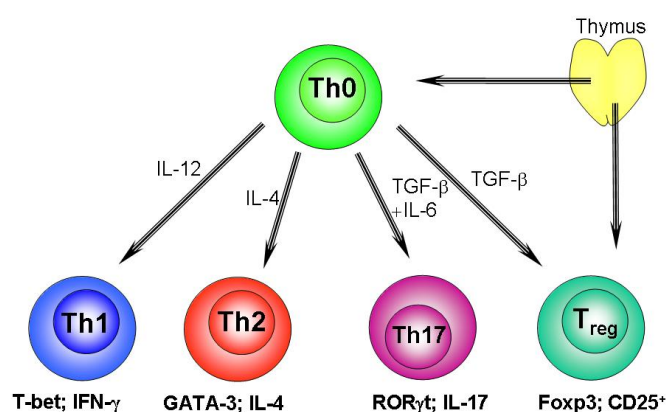


Figura 4- Estágios de diferenciação de células TCD4+ (adaptado de Oh et. al., 2009)

As células T CD8+ autorreativas também estão envolvidas na patologia da EM. Tal fato pode ser verificado a partir de estudos terapêuticos em pacientes com EM, nos quais as células T CD4+ foram depletadas. O que se esperava era uma melhora no quadro clínico dos pacientes pela falta das funções efetoras dessas células, entretanto não foi o verificado (CRAWFORD, 2004, revisado por STEINMAN, 2013) (Figura 5). Adicionalmente, Crawford identificou em seus trabalhos uma alta frequência de populações CD8+ reconhecendo proteínas mielínicas em lesões de pacientes com EM. Babbe (2000) também reportou a expansão clonal de células T CD8+ em lesões de tecido cerebral de pacientes com EM.

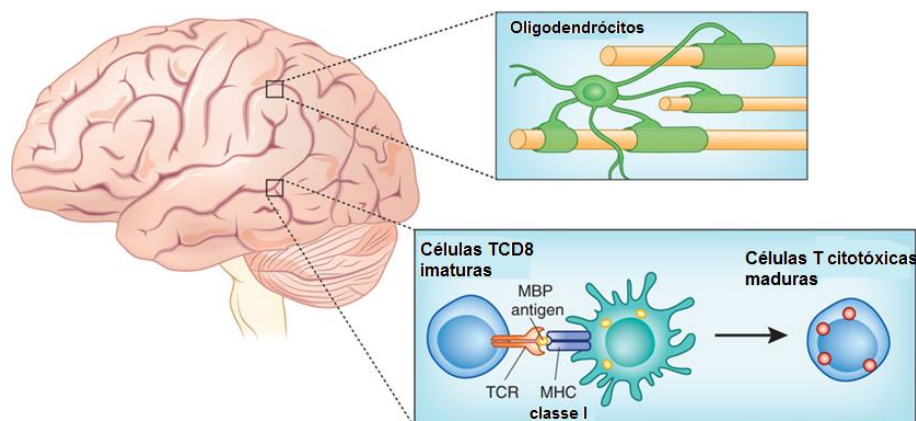


Figura 5- Ativação de células TCD8+ mielino-reativas através da apresentação antigênica por APCs via expressão de MHC de classe I no cérebro após indução da EAE (adaptado de Steinman, 2013).

Johnson e colaboradores (2014) estudando um modelo murino de interrupção da BHE, que pode ser induzida através da infecção de um vírus relacionado à encefalomielite murina de Theiler, que é conhecida como uma variação da EAE, observaram que a infecção por esse vírus resultou em um grande aumento na permeabilidade vascular da BHE. O significativo aumento na permeabilidade vascular levou os animais à morte, o que foi denominado pelos autores no trabalho como Síndrome Fatal Induzida (SFI). A SFI foi posteriormente relacionada à ação de células TCD8+ específicas ao vírus utilizado. A liberação de perforinas por essas células ativadas culminaram com a perda da organização linear da BHE, através da destruição de proteínas de junção celular como a claudina-5 e ocludina.

As células B também apresentam importância no desenvolvimento da patogênese da EM, visto que as mesmas, quando se tornam ativadas, diferenciam-se em células B de memória ou plasmócitos, os quais são especializados na produção de anticorpos antígeno-específicos, os quais podem apresentar-se autorreativos à mielina contribuindo assim para o processo inflamatório.

Já foi demonstrado que a injeção de auto-anticorpos MOG-específicos foi capaz de amplificar a ação de células T, aumentando a gravidade e duração dos sinais clínicos, além de induzir a desmielinização em grande escala. Os anticorpos autorreativos podem causar aumento na ação de linfócitos T e desmielinização através da opsonização da mielina por tais

anticorpos levando ao aumento na taxa de fagocitose da mielina, seu processamento e posterior apresentação e ativação de linfócitos T com reatividade à mielina por células da imunidade inata como macrófagos, que são APCs. A ativação do sistema complemento pela via clássica, onde a ligação de anticorpos a antígenos específicos inicia a ativação de proteínas plasmáticas pode culminar na destruição de oligodendrócitos produtores de mielina. As células B não apresentam capacidade de migração através da BHE intacta, porém esta, uma vez apresentando interrupções, pode permitir a entrada dessas células, anticorpos e moléculas do complemento no SNC (CHALLA, et. al. 2013).

Além da importância de todas as células envolvidas na imunidade adaptativa no desenvolvimento da EM, sabe-se da participação de componentes da imunidade inata, tais como células dendríticas (DCs, *do inglês* Dendritic cells), macrófagos, mastócitos, células *natural killer* (NK) e fatores humorais como o sistema complemento. Estas células e fatores apresentam variadas funções que vão desde o reconhecimento não-específico de estruturas moleculares não-próprias através dos TLRs, à produção de moléculas como óxido nítrico, citocinas e quimiocinas, culminando com a ativação de respostas imunes adaptativas antígeno-específicas (CHANVILLARD, 2013 e MILLS, 2011).

Estudos recentes têm revelado a importante participação de macrófagos e micróglias na patogênese e progressão da EAE. Essas células apesar de atuarem no processo de remielinização no SNC, também funcionam como potentes fagócitos, sendo produtoras de citocinas pró-inflamatórias que são essenciais para a fase indutora da doença. Já é conhecido que durante a fase inicial da EAE, os macrófagos e micróglias são classicamente ativados (M1), as quais exercem efeitos patogênicos da EAE através da produção das citocinas pró-inflamatórias IFN- γ , TNF- α . Durante a fase de recuperação da doença, essas células são menos ativadas ou classicamente ativadas (M2) que expressam altos níveis de citocinas anti-inflamatórias como a IL-10, que atua na resolução da inflamação no SNC e reparo tecidual. As subpopulações de macrófagos coexistem e apresentam propriedades plásticas no SNC e sistema imune periférico durante o progresso da doença. Assim, a polarização de macrófagos e micróglias para o

perfil M2, através de intervenções moleculares, poderia ser uma potencial terapia para o tratamento da EAE/ EM (RAWJI, et. al. 2013; revisado por JIANG, et. al. 2014).

Nos últimos 5 anos, células linfoides inatas (ILCs, *do inglês* Innate lymphoid cells), que pertencem à uma nova família de linfócitos inatos, que não apresentam rearranjo de receptores de reconhecimento de antígenos, tal como ocorre durante o processo de maturação dos linfócitos T e B, mas que apresentam fenótipos e funções características de células da imunidade adaptativa, estão sendo investigadas no desenvolvimento da patogênese da EAE e EM (Figura 6). Já é conhecido que tais células dependem do fator de transcrição inibidor de ligação ao DNA (Id2), que causa a inibição da expressão do TCR levando ao desenvolvimento das ILCs em precursores linfoides. O fator de transcrição ROR- γ t também já foi mostrado ser necessário para o desenvolvimento de tais células (MAIR e BECHER, 2014).

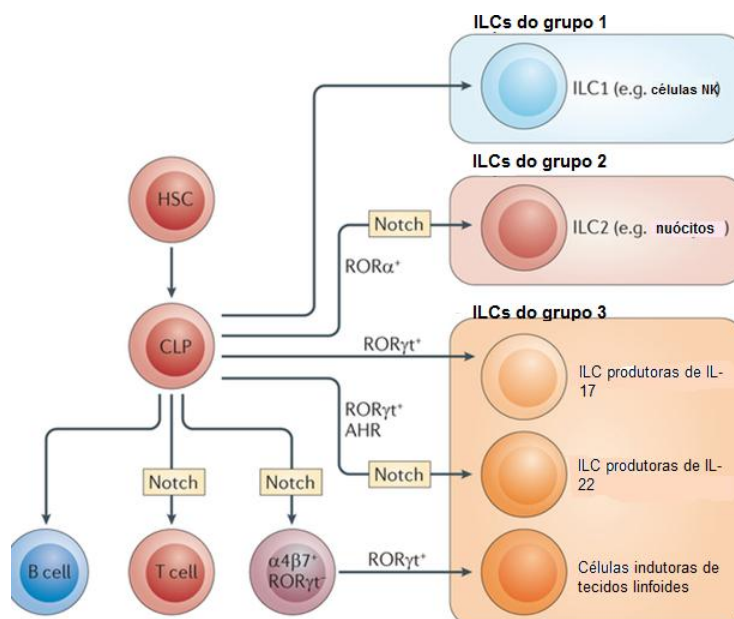


Figura 6- Estágios de diferenciação de células imunes inatas (ILCs) (adaptado de Mair, et. al. 2014).

As células NK são hoje caracterizadas como células linfoides inatas pertencentes ao grupo 1, pois, além de causarem apoptose de células infectadas por bactérias intracelulares ou vírus através da liberação de perforinas e granzimas, podem produzir a citocina pró-inflamatória IFN- γ . ILCs do grupo 2, também conhecidos como nuócitos ou células auxiliares naturais

foram descobertas como células inatas produtoras de IL-5 e IL-13. Já as ILCs do grupo 3 apresentam papel na formação de tecidos linfoides secundários em embriões em desenvolvimento e ainda podem ser produtoras da citocina IL-17, que possui papel importante no desenvolvimento da EAE e EM (MAIR, 2014).

Mair e Becher (2014) detectaram a presença de ILCs em tecidos do SNC de camundongos C57BL/6 com EAE apresentando produção de IL-17 e expressão de seu receptor. Nesse trabalho, os autores discutem a importância das ILCs em auxiliar o desenvolvimento do curso clínico da EAE.

Além das ILCs, outras populações de células são classificadas como linfócitos do sistema imune inato, como por exemplo, as células $T\gamma\delta$ e as células NKTi.

As células $T\gamma\delta$ possuem um processo de amadurecimento no timo e são originadas a partir de uma célula progenitora do fígado fetal. Tais células já foram identificadas no fluido cérebro-espinhal e em lesões do SNC de pacientes com EM. Porém, os estudos ainda encontram-se contraditórios quanto ao papel dessas células na doença. Blink e colaboradores (2014) identificaram 2 subpopulações de células $T\gamma\delta$ no SNC com perfis distintos de produção de citocinas. A subpopulação $V\gamma 4^+$ pode produzir citocinas pró-inflamatórias como a IL-17 e correspondem de 15 a 20% das células do SNC produtoras de IL-17. Já a subpopulação $V\gamma 1^+$ por possuir ligantes para CCR5 é importante para a promoção de células T regulatórias.

As células NKT invariantes (NKTi) são um conjunto de linfócitos T que reconhecem antígenos glicolipídicos apresentados pela proteína CD1d relacionada ao MHC de classe I. A ativação dessas células resulta na rápida produção de citocinas e consequentemente ativação de outras células do sistema imune. As células NKTi apresentam certa recombinação dos receptores antigênicos, porém sua diversidade é limitada. O fator de transcrição comum a essas células é o Kruppel-Like (PLZF), porém são reconhecidos subpopulações de células NKTi que se diferem quanto ao perfil de citocinas produzido pelas mesmas. As células NKTi *like* Th1 podem produzir a citocina pró-inflamatória IFN- γ , as células NKTi *like* Th2 podem produzir citocinas como a IL-5, IL-10 e IL-13, enquanto que as NKTi *like* Th17 são produtoras de IL-17 (PAREKH, et al. 2013)

Oh e colaboradores (2009) identificaram células NKTi produtoras de IL-4 e IL-10 que foram capazes de inibir a resposta imune de células Th1 sem inibir a resposta Th17 em modelo de EAE induzido em camundongos C57BL/6.

Com base nesses resultados, pode-se notar que o desenvolvimento da patologia envolvida no modelo de EAE, assim como na EM é complexo, com a participação de numerosas células já descritas do sistema imune. Assim sendo, o estudo de formas terapêuticas que visam um melhor conhecimento e a aplicação na modulação da resposta imune inflamatória envolvida na patogênese da EM e EAE é cada vez mais necessário.

1.4 O Tratamento da EM

O tratamento da EM atualmente envolve os chamados agentes modificadores da doença, aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA) e são classificados em imunomoduladores ou imunossupressores, administrados de acordo com a fase e a progressão da doença (FOX, 2004).

Entre os agentes terapêuticos que estão sendo testados ou já aprovados pelo FDA para o tratamento da EM podemos citar: o interferon beta (IFN- β), o acetato de glatirâmer, o natalizumab, o fingolimod, o daclizumab e a mitoxantrona (SORENSEN et al., 1999; NEUHAUS; ARCHELOS; HARTUNG, 2003; JONES; COLES, 2010).

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 EMA (*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 fingolimod (Gilenya) e o natalizumab (Tysabri) são terapêuticas de segunda linha (revisado por EMA, 2011). Apesar da mitoxantrona (Novantrone) estar associada a efeitos adversos graves como leucemia

aguda, aumento do risco de infecções e insuficiência cardíaca congestiva, a mesma é utilizada como tratamento de terceira linha, em doentes com EM RR (HARTUNG, et al. 2002; 2011)

Segundo trabalho de Hartung em 2012, nenhuma forma terapêutica demonstrou ser significativamente eficaz no tratamento das formas progressivas de EM (RÍO, et al. 2011).

Apesar de ser utilizado como primeira linha na terapêutica da EM, o mecanismo de ação responsável pelo efeito benéfico do IFN- β não foi até o presente momento completamente esclarecido (AXTELL et al., 2010). Yen, Kong e Ganea (2010) abordam em seus estudos a capacidade do IFN- β em influenciar a migração de células dendríticas para o linfonodo e também para o sítio inflamatório. Outros estudos também demonstraram a capacidade do IFN- β em inibir a diferenciação de Th17 e alterar o balanço entre células Th1 e Th2 (GUO; CHANG; CHENG, 2008; MARKAR et al., 2008; MARTIN-SAAVEDRA et al., 2008). O tratamento com IFN- β pode levar a reações no local de aplicação (65% - 78%), sintomas de gripe (45% - 57%), insônia (18% - 21%), dores abdominais, problemas de coordenação e impotência (4% - 20%). O custo mensal do tratamento varia de R\$ 3.200,00 a R\$ 6.000,00 (CHIAO; MEYER, 2009).

Outra terapia de primeira linha para a EM é o acetato de glatirâmer (AG), o qual é composto pela sequência de aminoácidos tirosina, lisina, alanina e tirosina. Estudo realizado por Neuhaus, Archelos e Hartung (2003) demonstrou que o acetato de glatirâmer atua polarizando a diferenciação de células T CD4+ para o perfil Th2. Kim e colaboradores (2004) demonstraram que monócitos isolados de pacientes tratados com acetato de glatirâmer produzem uma maior quantidade de IL-10 e baixa quantidade da citocina pró-inflamatória IL-12. O tratamento com AG pode levar a reações no local de aplicação (30%), sintomas de gripe (10%), dores abdominais (14% - 20%), infecções (25% - 30%), taquicardia e palpitação (4% - 20%). O custo mensal do tratamento varia de R\$ 2.200,00 a R\$ 6.000,00 (CHIAO; MEYER, 2009; BOSTER, 2011).

O natalizumab corresponde a uma das terapias de segunda linha para a EM. Consiste em um anticorpo monoclonal da subclasse IgG4 que impede a migração de células através da BHE por se ligar à integrina alfa 4 beta 1

(VLA-4) presente em linfócitos. A ligação do natalizumab em VLA-4 impede sua interação com seu ligante a molécula de adesão VCAM-1, expressa pelo endotélio vascular (ELICES et al., 1990). O tratamento com natalizumab pode levar a sintomas de gripe (10% - 25%), dores abdominais (8% - 28%), infecções (30%) e depressão (4% - 8%). O custo mensal do tratamento varia de R\$ 6.000,00 a R\$ 7.200,00 (CHIAO; MEYER, 2009; O'DAY et al., 2011).

O fingolimod também faz parte das terapias de segunda linha para a EM. É um agonista do receptor esfingosina-1-fosfato que está presente em linfócitos e regula a saída dos linfócitos ativadas dos órgãos linfoides secundários. A intensa estimulação do receptor esfingosina promove a internalização deste receptor e conseqüentemente, as células ficam privadas dos sinais de migração (SAWICKA et al., 2005). O tratamento com fingolimod pode levar a sintomas graves como falha cardíaca e infecções graves. O custo mensal do tratamento varia de R\$ 7.000,00 a R\$ 9.200,00 (O'DAY et al., 2011).

O daclizumab é um anticorpo monoclonal da subclasse IgG1 humanizado, o qual se liga a cadeia α do receptor de IL-2 (BIELEKOVA et al., 2006). A ação do daclizumab no controle de células T está relacionada à expansão e sobrevivência das células NK. Estas células NK exerceriam um efeito imunomodulador sobre as células T por meio de um contato entre as duas células.

Bielekova e colaboradores (2006) mostraram que células mononucleares do sangue periférico de pacientes quando tratadas com daclizumab atuam promovendo a expansão e sobrevivência de células NK, e estas por sua vez, seriam responsáveis pela morte da célula T ativada. Pacientes com EM tratados com daclizumab apresentam uma correlação significativa entre células NK e declínio de linfócitos T CD4 e linfócitos T CD8. A administração do daclizumab atua então reforçando a citotoxicidade de células NK sobre células T ativadas (BIELEKOVA et al., 2006). O tratamento com daclizumab pode levar a sintomas graves como falha cardíaca e sangramentos. O custo mensal do tratamento varia de R\$ 5.000,00 a R\$ 7.000,00 (O'DAY et al., 2011).

Além desses tratamentos utilizados na prevenção de surtos e progressão da doença, existem aqueles administrados durante a exacerbação

(surto) da doença. Entre esses, os glicocorticoides constituem a primeira linha de tratamento. Entre os mecanismos de ação dos glicocorticoides estão a inibição da proliferação de linfócitos T, supressão da produção e secreção de citocinas, restauração da barreira hematoencefálica e alteração da transmissão axonal. Além disso, os mesmos podem reduzir a expressão de moléculas de adesão na superfície das células mononucleares do sangue e LCR dos pacientes com EM (PACHNER, et. al. 1997; WEINSTOCK-GUTTMA, et. al. 1996; ELOVAARA, et. al. 1998).

A metilprednisolona intravenosa (MPIV) constitui, atualmente, a droga de primeira escolha para o tratamento dos surtos. Até este momento, a despeito de alguns resultados positivos nesses estudos, a conduta recomendada é a administração intravenosa da metilprednisolona para o tratamento dos surtos de EM, na dose de 1 g/dia, durante três a cinco dias. Alguns efeitos colaterais após a utilização de glicocorticoides são: arterial, intolerância à glicose, obesidade, osteoporose, necrose óssea asséptica, catarata, irritabilidade, alterações do humor e insônia (MILLER, et. al. 1967).

1.4.1 A mitoxantrona (MIT) no tratamento da EM

A MIT (Novantrone) (Figura 7) foi desenvolvida nos anos de 1970 como agente antineoplásico, sendo derivado da família das antracenedionas (SCOTT; FIGGITT, 2004) que são quimicamente análogas às antraciclinas que incluem a doxarrubicina e a daunorrubicina (MORRISSEY; LE PAGE; EDAN, 2005).

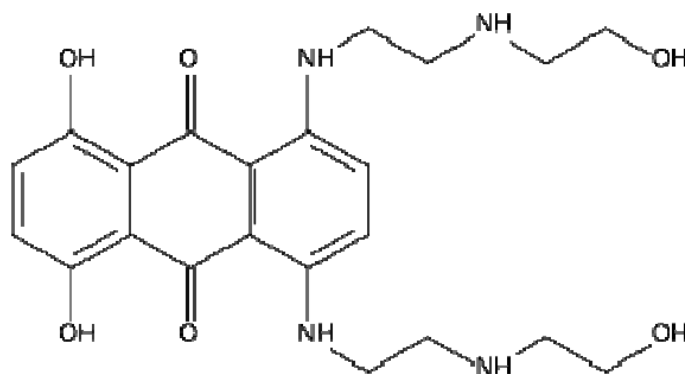


Figura 7- Estrutura química da mitoxantrona (adaptado de BARASCH, et. al. 1999)

Este agente intercala-se ao DNA inibindo sua replicação e impedindo também a síntese de RNA (PELFREY et al., 2006), pois interage com a enzima topoisomerase II responsável pela quebra das cadeias do DNA (NEUHAUS; KIESEIER; HARTUNG, 2004; CALABRESI; CHABNER e GOODMAN; GILMAN, 2005). Devido a sua capacidade de se intercalar com o DNA, a MIT é utilizada para a inibição da proliferação de células cancerosas no tratamento de câncer de mama, linfomas não-Hodgkin, câncer de próstata e certos tipos de linfomas (FISHER; PATTERSON, 1991; AN; MORRIS, 2012).

A FDA aprovou, em 2002, a utilização de 12mg/m² de MIT, administrado por via i.v., de três em três meses, para o tratamento de EM dos tipos SP, PS e RR progressiva, por apresentar eficácia comprovada em estudos (HARTUNG, et al. 2002; KRAPF, et al. 2005).

Os efeitos observados com a utilização da MIT em pacientes com EM são relacionados à inibição da proliferação de linfócitos T e B, da produção de anticorpos pelas células B e da destruição axonal mediada pelos macrófagos (NEUHAUS; KIESEIER; HARTUNG, 2004).

A farmacocinética desta droga vem sendo determinada em estudos clínicos usando infusão intravenosa (FOX, 2004). Sua biotransformação ocorre em três fases, apresentando três meias-vidas ($t_{1/2}$) sucessivas: 6-12 min. (rápida), 1-3 h (intermediária) e 23-215 h (longa-terminal) (MORRISSEY; LE PAGE; EDAN, 2005). Exibe distribuição inicial rápida e eliminação relativamente lenta dos compartimentos teciduais profundos, sendo o volume de distribuição grande. Elevadas concentrações de MIT são encontradas na tireóide, no fígado e no coração após a administração. Sua eliminação do corpo é feita principalmente pela excreção biliar, correspondendo a depuração plasmática renal por somente 10% da eliminação (FOX, 2004).

Apesar de ser bem tolerada, em altas doses a MIT pode provocar efeitos secundários como mielossupressão caracterizada por leucopenia e neutropenia (6% - 50%), com efeito mínimo sobre as plaquetas e eritrócitos. A granulocitopenia pode resultar em leves a severas infecções, incluindo infecções no trato urinário (7%), pneumonia (9%), bacteremia/sepsis (34%) e infecções fúngicas (9% - 15%). Ocasionalmente, o paciente em tratamento com a MIT podem apresentar náuseas e vômito (31% - 72%),

alopecia e estomatite (7% - 29%). Entretanto, a cardiotoxicidade (5% - 18%) é o efeito mais grave atribuído ao uso de MIT induzindo cardiomiopatias, como taquicardia, arritmia e insuficiência cardíaca congestiva sintomática (PERICOT; MONTALBAN, 2003). O aumento do risco de cardiotoxicidade está associado com o aumento cumulativo das doses de MIT, assim como, com a pré-disposição a doenças cardiovasculares (MORRISSEY; LE PAGE; EDAN, 2005).

Embora todos os fármacos acima apresentem resultados promissores no tratamento da EM, eles são ineficazes na cura do paciente em fase evolutiva da doença. Além disso, estes fármacos apresentam um problema fundamental que é sua atuação não seletiva nas células do sistema imune, o que leva aos efeitos colaterais graves em diversos tecidos supracitados (revisado por JONES e COLES, 2010).

Portanto, no presente trabalho, foi proposto o estudo do efeito de um análogo da MIT na resposta imune, onde foram extraídos os grupos hidroxila nas posições 5 e 8 dos anéis aromáticos, os quais têm sido relacionados aos processos de citotoxicidade desencadeados pelo tratamento com a MIT (KAPUSCINSKI, et.al. 1986; FISHER, et. al. 1991; DREWINKO, et. al. 1983). Dessa forma, o trabalho torna-se relevante, pois tais modificações estruturais podem favorecer a melhor aplicação clínica do análogo em relação à MIT, visando um potencial medicamento para o tratamento da EM.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do derivado antraquinônico 1-Metoxi-4-((2-hidroxitetradecil)amino)-antraceno-9,10-diona (MTA), análogo da mitoxantrona (MIT), na modulação da resposta imune, utilizando o modelo de encefalomielite autoimune experimental.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos tóxicos causados pelo tratamento *in vivo* com MIT e o análogo MTA, através de curvas de sobrevivência, massa corporal e dosagem da proteína CK-MB;
- Avaliar a evolução do quadro de sintomas da EAE, através do escore clínico dos animais;
- Avaliar o infiltrado celular na medula espinhal, através da histopatologia;
- Avaliar a expressão dos marcadores celulares CD4, CD8, CD19, CD11c, CD11b e F4/80 em células da medula espinhal, através de citometria de fluxo;
- Quantificar os níveis de citocinas (IL-17, IFN- γ , IL-6, IL-10 e TGF- β) e quimiocinas (CCL5 e CCL20) em homogenato de medula espinhal, através de ELISA.

- Quantificar a produção de citocinas intracitoplasmáticas (IL-17, IFN- γ , IL-10) e o fator de transcrição FoxP3 em células da medula espinhal, através de citometria de fluxo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Síntese dos análogos da MIT

Os análogos foram sintetizados no Departamento de Química da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) e gentilmente cedidos para estudo pelo grupo de pesquisa coordenado pelo Prof. Dr. Mauro Vieira de Almeida. As reações envolvidas na síntese dos análogos partiram do composto 1,4-antraceno-9,10-diona. A MIT foi cedida pela Quiral Química do Brasil S.A.

Os derivados da 1,4-antraceno-9,10-diona foram preparados por dois protocolos de síntese, que conduzem a compostos mono-substituídos e di-substituídos simétricos (Figura 8). (CORREA, et al. 2013)

O primeiro método foi relacionado com a preparação dos compostos **3-8** e consistiu em uma síntese de dois passos (ZAGOTTO, et al. 2000).

A preparação da leucoquinizarina intermediária **2** (9,10-di-hidroxi-2,3-dihidroantraceno-1,4-diona) foi conseguida pelo tratamento de 1,4-antraceno-9,10-diona **1** com uma solução aquosa de hidróxido de sódio e hidrossulfito de sódio. O intermediário **2** foi em seguida tratado com aminoálcool em etanol sob atmosfera de azoto, fornecendo os compostos mono-substituídos **3-8** com 39-58% de rendimento.

Para preparar compostos simetricamente substituídos, a 1,4-antraceno-9,10-diona **1** foi primeiro desnaturada e depois submetida a uma reação de substituição nucleofílica aromática com aminoálcoois lipofílicos (1-aminododecan-2-ol ou 1-aminotetradecan-2-ol) em DMSO, fornecendo o compostos simetricamente di-substituídos **10** e **12** e dois compostos mono-substituidos **11** e **13** com 14-26% de rendimento.

Todos os compostos foram purificados por cristalização ou por meio de cromatografia sobre gel de sílica e totalmente caracterizados por espectrometria de massa de alta resolução, de infravermelhos e espectroscopia NMR ^1H e ^{13}C .

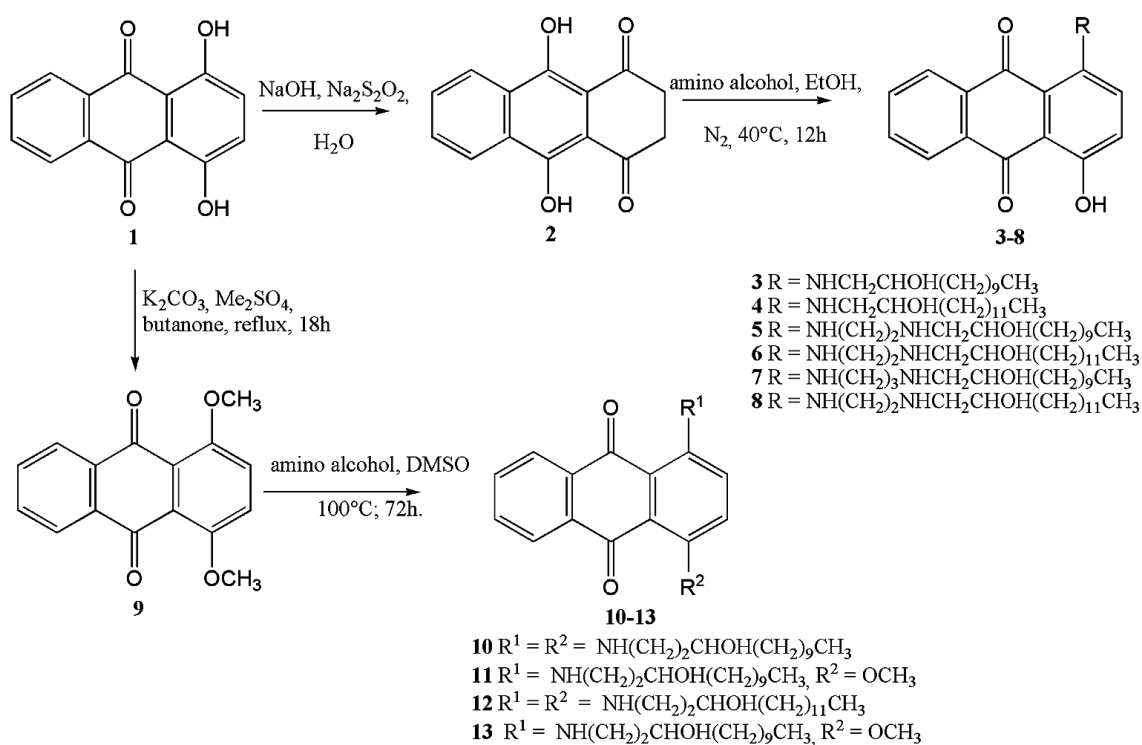


Figura 8– Síntese dos análogos da MIT (Correa, et al. 2013).

Estes análogos foram inicialmente avaliados a partir de testes *in vitro* utilizando a linhagem de macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS e IFN- γ , onde foram analisados parâmetros como, por exemplo, citotoxicidade, produção de NO e citocinas (CORRÊA, et. al. 2013).

Baseado nesses resultados foi escolhido o análogo **13**, denominado MTA, para a etapa de testes *in vivo*, pois tal composto não apresentou citotoxicidade de macrófagos (100% de viabilidade celular nas concentrações do composto de 0,5 e 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 96% na de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Além disso, foi capaz de inibir em 62,5% a produção de NO, a de TNF- α em 33,1% e a de IL-1 β em 74,3% na concentração de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

3.2 Avaliação do derivado MTA no modelo *in vivo* de EAE

3.2.1 Animais

Camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 de 6-8 semanas de idade foram obtidas a partir do Centro de Biologia da Reprodução (CBR) da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) e mantidas em gaiolas com micro-isolador em estantes ventiladas e dieta *ad libitum* no Laboratório de Imunologia. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os princípios do Código Brasileiro para a Utilização de Animais de Laboratório. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFJF (Protocolo número 062/2012).

3.2.2 Indução da EAE

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 (o peptídeo MOG₃₅₋₅₅ foi sintetizado pela professora Dra. Maria Aparecida Juliano do Departamento de Biofísica da Universidade Federal de São Paulo) emulsificado 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).

3.2.3 Tratamento com MIT e análogo MTA

Os camundongos foram divididos em 4 grupos experimentais: (a) controle, o qual não foi induzido e nem tratado (n=17); (b) EAE, induzido e não-tratado (n=17); (c) MIT, induzido e tratado com MIT (n=17); (d) MTA, induzido e tratado com o análogo MTA (n=17). O tratamento foi iniciado no 14º dia após a indução da EAE através de injeções intraperitoneais e estendeu-se até o 21º dia após a indução, considerando-se o dia da indução como dia 0. A MIT e o análogo MTA foram diluídos em PBS com 1% de

DMSO na concentração inicial de 5mg/mL. As injeções i.p. foram feitas na concentração de 1mg/kg em 100µl, (PIAO et. al, 2007).

3.2.4 Avaliação dos efeitos tóxicos da MIT e análogo MTA

Para a avaliação dos efeitos tóxicos provenientes do tratamento da MIT e do análogo MTA, camundongos C57BL/6, que não foram induzidos para a EAE foram divididos em cinco grupos (n=6): (I) controle, tratados com PBS; (II) 1mg/kg MTA, tratados com 1mg/kg de MTA; (III) 5mg/kg MTA, tratados com 5mg/kg de MTA; (IV) MIT 1mg/kg, tratados com 1mg/kg de MIT; e (V) 5mg/kg MIT, tratados com 5mg/kg de MIT. Os tratamentos foram dados i.p. durante 7 dias consecutivos (VELDHOEN, et. al. 2006; SAMOILOVA, et. al. 1998). Os camundongos foram pesados diariamente e analisados quanto à sobrevivência aos tratamentos.

Ainda para avaliação dos efeitos tóxicos causados pelo tratamento da MIT e também do derivado MTA, camundongos C57BL/6 foram induzidos a EAE utilizando o peptídeo MOG₃₅₋₅₅ e tratados com a MIT e o MTA na dose de 1mg/kg durante 7 dias, do 14 ao 20º dia pós-indução. No 21º dia pós-indução os animais foram eutanasiados e o sangue foi coletado através de punção cardíaca. O sangue foi centrifugado e o soro foi coletado para a dosagem da proteína CK-MB. A dosagem da CK- MB foi realizada de acordo com os procedimentos recomendados pelo fabricante (AQT90 FLEX CKMB Test kit; X- Lab solutions).

3.2.5 Avaliação clínica

Os camundongos foram avaliados com relação à incapacidade neurológica através da escala apresentada na tabela 2, conforme adaptada por De Paula e colaboradores (2008). A avaliação foi realizada diariamente, desde o dia da indução (dia 0) até o dia da eutanásia (21º dia após imunização).

Tabela 2- Escala de incapacidade neurológica

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

3.2.6 Obtenção de órgãos e células

Após 21 dias da indução da EAE, os camundongos foram eutanasiados por dose letal de Xilazina (10 mg/Kg) e Ketamina (150 mg/Kg). As medulas espinhais foram coletadas para dosagem de citocinas, quimiocinas, avaliação do perfil celular e análise histopatológica.

3.2.7 Análise histopatológica

No 21º dia após a indução da EAE os animais foram eutanasiados e as medula foram fixadas por perfusão em formalina tamponada (PBS 10%). Cortes transversais da medula a níveis cervical, torácico e lombar foram processados para inclusão em parafina. Cortes de 8 µm e 10 µm 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. Os cortes foram examinados em microscópio Olympus

BX51 através de uma câmera e documentados em software para aquisição digital das imagens.

3.2.8 Quantificação de citocinas e quimiocinas por ELISA

Para a avaliação dos níveis de citocinas e quimiocinas, as medulas congeladas 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 10.000 rpm por 15 minutos a 4°C e os sobrenadantes foram coletados e congelados a -70°C . As concentrações de IL-17, IFN- γ , IL-6, IL-10, TGF- β , CCL20 e CCL5 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).

3.2.9 Isolamento de células mononucleares da medula espinhal

Vinte e um dias após a infecção, os grupos de camundongos ($n = 8$) foram eutanasiados sob anestesia (ip) e perfundidos através do ventrículo esquerdo, com solução salina tampão fosfatada (PBS). Medulas espinhais foram maceradas e filtradas usando filtro celular de $70\ \mu\text{M}$ (BD Biosciences, Bedford, EUA) em meio RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, EUA) com 10% de soro fetal bovino (FBS) (Gibco, Grand Island, EUA). Células da medula espinhal foram incubadas em meio RPMI contendo 2 mg de colagenase D (Roche, Mannheim, Alemanha) a 37°C durante 45 min. As células mononucleares da medula espinhal foram recolhidas após centrifugação em gradiente de densidade de Percoll (PIAO, et. al., 2007) e lavadas com tampão de marcação (PBS, 1% de FBS, 0,1% de azida de sódio). O sedimento celular

foi suspenso em solução de ACK, centrifugado a 3500 rpm durante 5 min e suspenso em tampão de marcação para avaliação fenotípica utilizando citometria de fluxo.

3.2.10 Avaliação fenotípica das células da medula espinhal

Células da medula espinhal foram incubadas com anticorpos anti-CD3-PerCP, anti-CD4-PE, anti-CD8-FITC, anti-CD19-FITC, anti-CD11b-PE, anti-CD11c-FITC (BD Biosciences PharMingen, San Diego, EUA) e anti-F4/80 (PERCP). Depois de 30 min a 4° C, as células foram lavadas e analisadas utilizando citometro de fluxo FACScalibur e software CellQuest (Becton Dickinson, San Diego, EUA).

3.2.11 Análise estatística

A significância das diferenças entre os grupos foi analisada através do teste t de Student ou ANOVA de uma ou duas vias (GraphPad Prism 5.00), quando apropriado. As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação dos efeitos tóxicos da MIT e análogo

Após a realização do tratamento de camundongos C57BL/6 com a MIT e o análogo MTA nas doses de 1mg/kg e 5 mg/kg durante 7 dias, pode-se verificar que o nível médio dos pesos e a sobrevivência dos camundongos não foram alterados após o tratamento com MTA, em ambas as concentrações testadas (Fig. 9C, E e F). Porém, o tratamento com a MIT na dose de 5 mg/kg gerou efeitos tóxicos nos camundongos, reduzindo drasticamente o peso (Fig. 9F) e a capacidade de sobrevivência (Fig. 9B). Os camundongos do grupo controle apresentaram aumento de peso, sem alteração na sobrevivência (Figura 9A e C).

O estresse causado no tecido muscular cardíaco proveniente dos tratamentos MIT e MTA em camundongos C57BL/6 induzidos para a EAE foi analisado através da dosagem da proteína creatina-kinase fração MB (CK-MB). A figura 7 mostra que o tratamento com a MIT na dose de 1mg/kg durante 7 dias foi capaz de gerar o aumento na produção de CK-MB com relação aos grupos controle, EAE e MTA. Já o tratamento com MTA, também na dose de 1mg/kg, foi capaz de manter a produção de CK-MB em níveis próximos ao controle (Fig. 10).

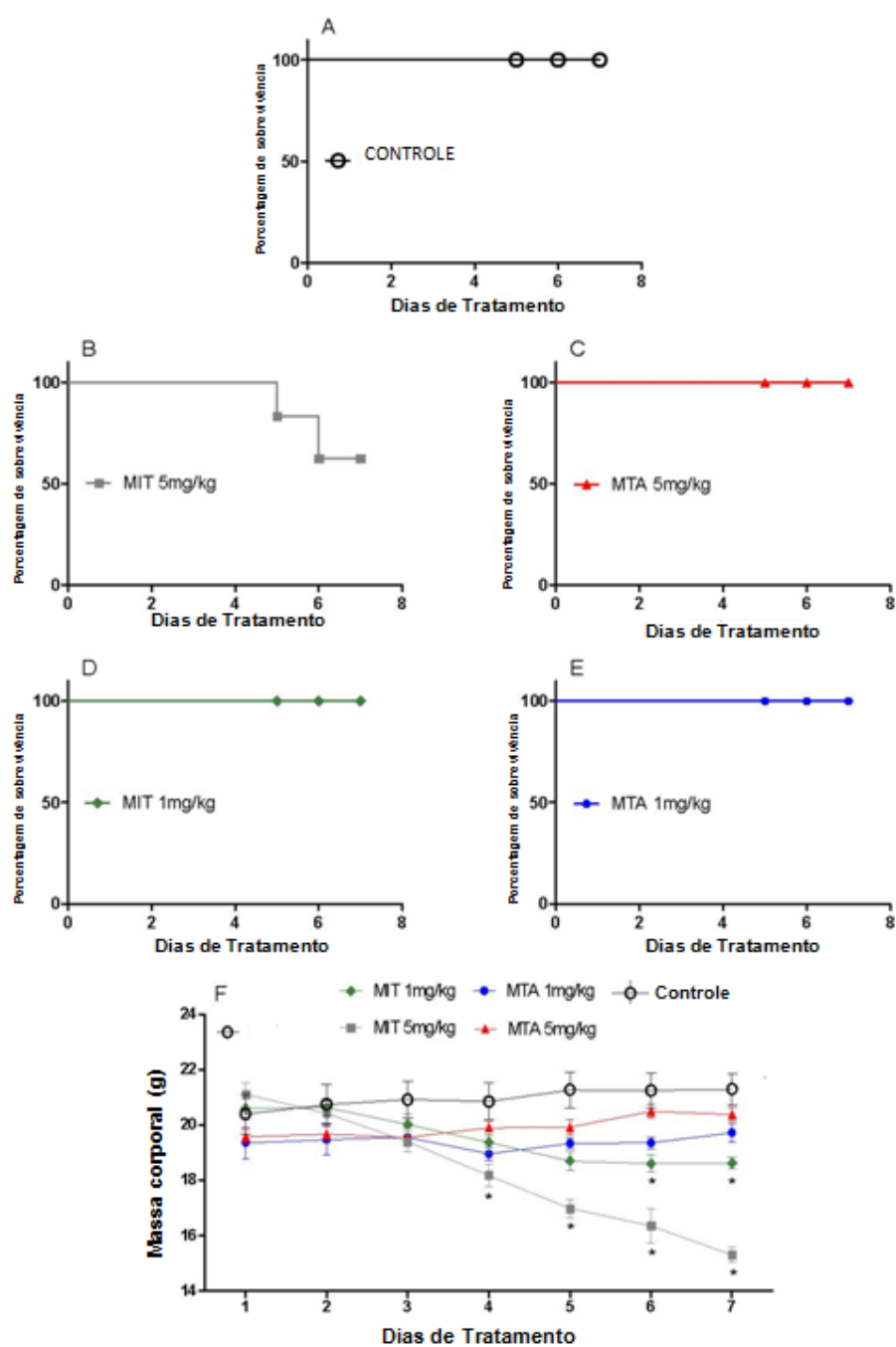


Figura 9- Avaliação dos efeitos tóxicos dos tratamentos com MIT e MTA após 7 dias de tratamento. Grupos de camundongos foram tratados ou não com 1 mg/kg ou 5 mg/kg de MTA ou MIT durante 7 dias. Percentagem de sobrevivência (A-E) dos camundongos tratados ou não com o MIT ou MTA, (F) média de massa corporal dos camundongos tratados ou não com o MIT ou MTA. Cada ponto representa a média aritmética \pm SEM. * $p < 0,05$ versus controle. Teste ANOVA de duas vias.

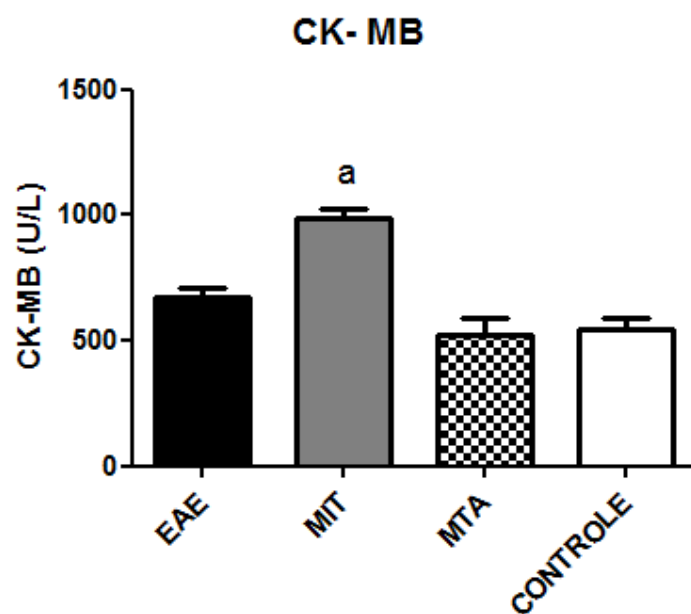


Figura- 10. Avaliação dos efeitos tóxicos dos tratamentos com MIT e MTA no 21° dpi através da dosagem de CK-MB. O soro foi coletado para a determinação da concentração da proteína CK-MB. Cada barra representa a média aritmética \pm SEM. a = $p < 0,05$ quando comparado o grupo EAE *versus* o grupo MIT; b = $p < 0,05$ quando comparado o grupo EAE *versus* o grupo MTA, c = $p < 0,05$ quando comparado o grupo EAE *versus* o grupo controle. Teste ANOVA de duas vias.

4.2. Avaliação do curso clínico da EAE

Após a realização de testes *in vitro* e toxicidade *in vivo*, buscou-se avaliar o curso clínico da EAE em animais tratados com o derivado antraquinônico selecionado, MTA.

A evolução do quadro clínico da EAE é determinada através dos pontos atribuídos aos sinais clínicos apresentados na tabela 2.

A Fig. 11 mostra que os camundongos imunizados apresentaram sinais de EAE como fraqueza/paralisia da cauda e dos membros, que se tornou aparente em torno de 9-11 dias após a imunização. O grupo EAE, o qual recebeu nenhum tratamento, atingiu o pico no dia 19, com uma pontuação clínica elevada. Os sinais clínicos da doença nos grupos tratados (MIT e MTA) mostraram um pico menor no dia 16-17 após a imunização mantendo o escore clínico mais baixo. A partir do dia 18, os grupos tratados mostraram diferenças acentuadas na pontuação clínica ($p < 0,05$) em comparação com o grupo de EAE (Fig. 11).

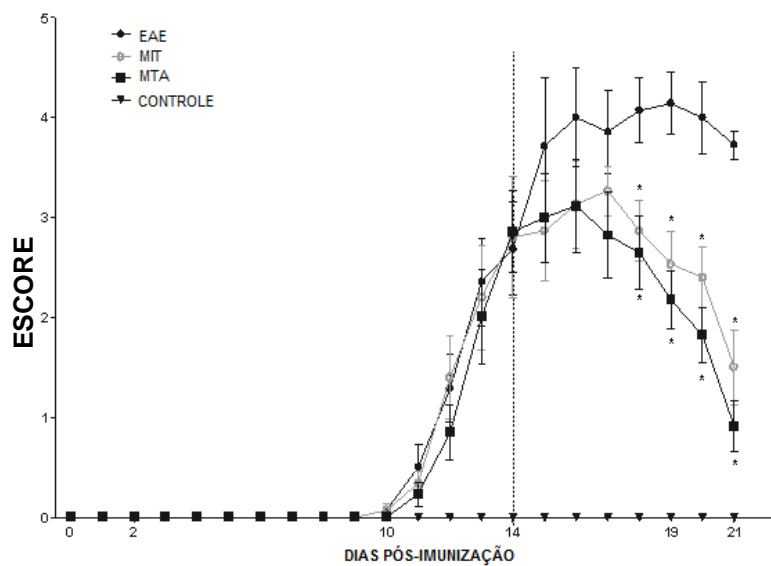


Figura 11- Escore clínico da EAE. Os animais foram monitorados diariamente para os sinais clínicos da EAE após imunização com 100 µg de peptídeo MOG 35-55. Os camundongos foram tratados (n = 17 por grupo) ou não (n = 17 por grupo) com 1mg/kg de MIT ou MTA durante 7 dias. Cada ponto representa a média aritmética ± SEM. * = p<0,05 quando comparados os animais tratados (MIT e MTA) versus animais não tratados (EAE). Teste ANOVA de duas vias. A linha pontilhada indica o dia do início do tratamento.

4.3 Avaliação histopatológica da medula espinhal

A avaliação do infiltrado inflamatório e desmielinização da medula espinhal (Fig. 12) foram realizadas no 21º dia pós-imunização. A figura 8 mostra os cortes de medula corados com Hematoxilina-Eosina (HE) para avaliação da presença de infiltrados inflamatórios e com Luxol-*Fast Blue* (LFB) para a avaliação da desmielinização. Os camundongos do grupo EAE apresentaram infiltrados de células inflamatórias nos sítios das leptomeninges, quando comparado ao controle negativo. O tratamento com MTA reduziu a inflamação e desmielinização, quando comparado com o grupo de EAE. Infiltrados de células inflamatórias foram associados à vacuolização e degeneração secundária do parênquima, consistente com desmielinização. O grupo MIT também reduziu a infiltração celular e desmielinização, quando comparado com o grupo de EAE (Fig. 12).

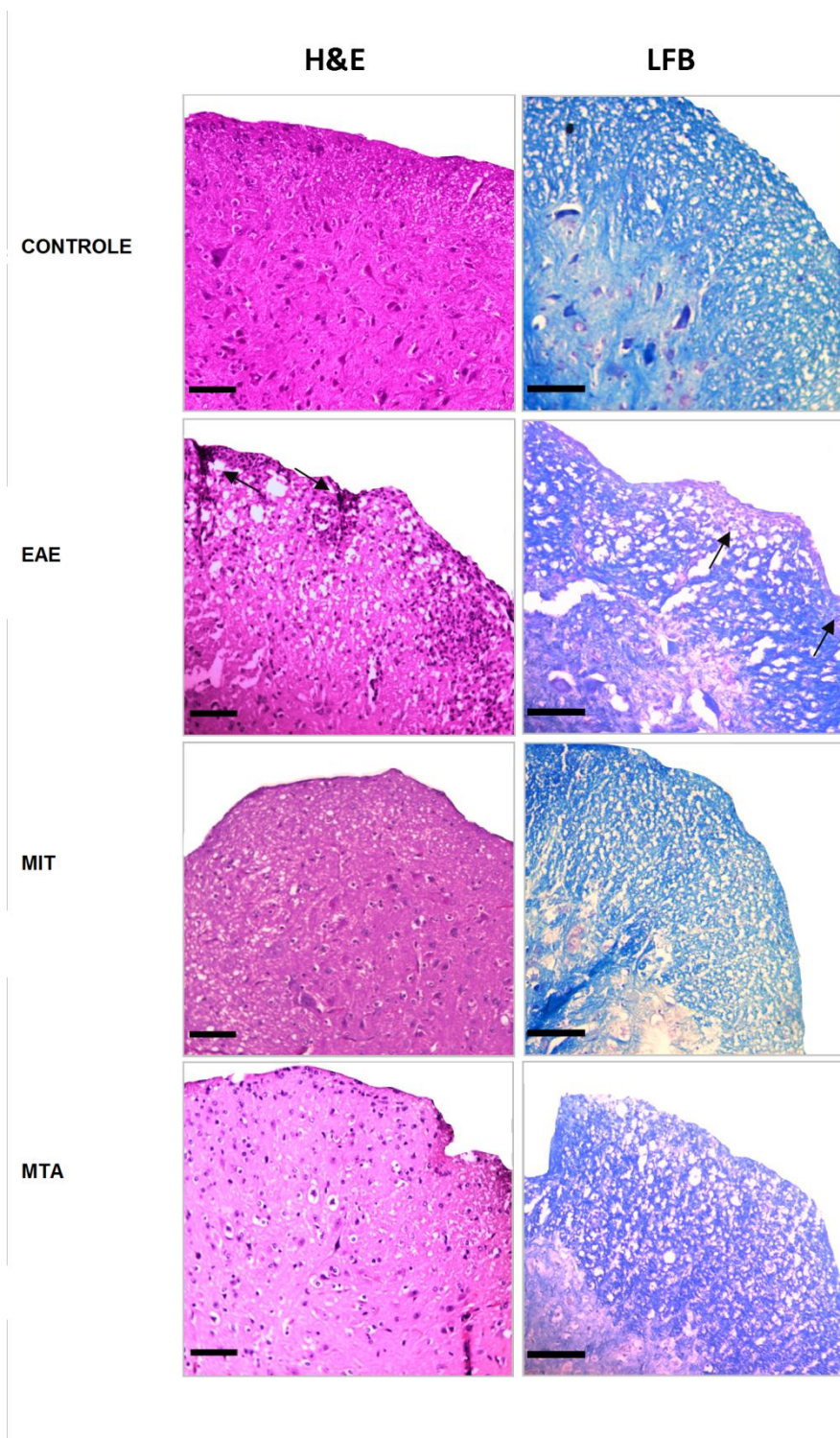


Figura 12 – Avaliação histopatológica da medula espinhal de camundongos imunizados ou não com 100 µg de peptídeo MOG 35-55. Os camundongos foram tratados (n = 4 por grupo) ou não (n = 4 por grupo) com 1mg/kg de MIT ou MTA durante 7 dias. Cortes representativos dos grupos examinados, corados com Hematoxilina e Eosina (H&E), para análise do infiltrado de células, ou Luxol Fast-Blue (LFB), para análise da desmielinização. Aumento Original: objetiva de 20X. Setas indicam os infiltrados celulares. Barra 50 µm.

4.4 Análise do perfil celular na medula espinhal

Foi realizada a análise do perfil das células da medula espinhal no 21º dia pós-imunização, onde foram avaliados a porcentagem de expressão e o número de células expressando os marcadores CD4, CD8, CD19, CD11c, CD11b e F4/80. O número total de células mononucleares isoladas da medula espinhal obtido foi de 3×10^5 para o grupo controle, 18×10^5 para a EAE, 8×10^5 para a MIT e 17×10^5 para a MTA. A figura 13A apresenta os resultados referentes à porcentagem total de eventos para cada marcação, sendo que o grupo EAE apresentou maior percentual de expressão de todos os marcadores em relação ao grupo controle, exceto CD11c. Além disso, o análogo MTA foi capaz de reduzir a expressão de CD4, CD19, CD11c, CD11b, porém aumentou a de F4/80. Em contrapartida, o tratamento com MIT mostrou um aumento na expressão de CD19 e CD11c. A figura 10B apresenta o número de células expressando tais marcadores na medula espinhal. Pode-se verificar que o grupo EAE apresentou um número significativamente maior de células expressando todos os marcadores em relação ao grupo controle. O tratamento com o MTA, assim como a MIT foi capaz de reduzir o número de células expressando os marcadores analisados CD4, CD8, CD19, CD11c, CD11b, mas o MTA aumentou o número de células F4/80+.

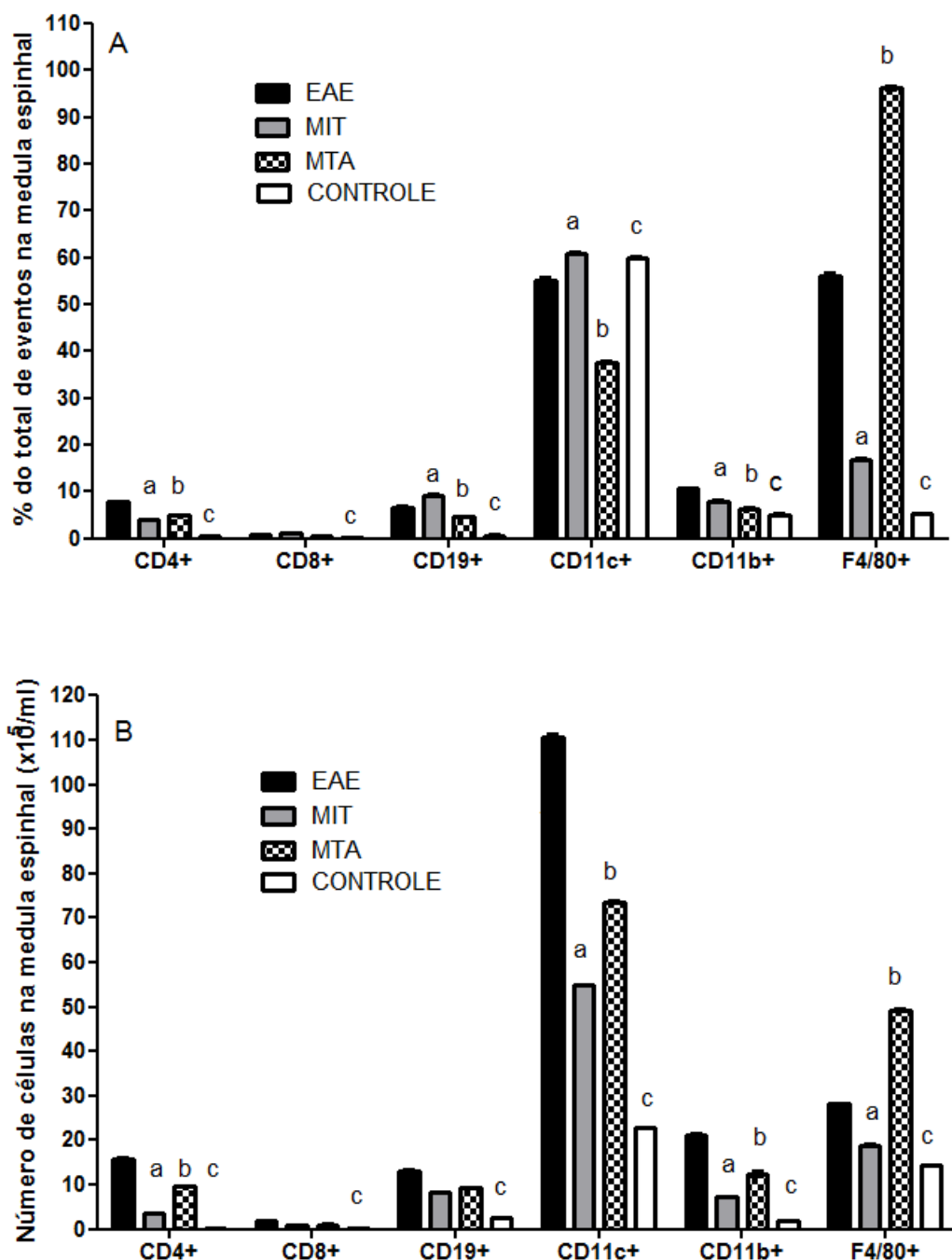


Figura 13- Perfil celular na medula espinhal. Porcentagem (A) e o número de células expressando (B) CD4, CD8, CD19, CD11c, CD11b e F4/80 na medula espinhal foram determinados por citometria de fluxo (n= 8/ grupo) no dia 21 pós-imunização com MOG 35 - 55. As barras representam a média aritmética \pm SEM. a = $p < 0,05$ quando comparado o grupo EAE versus o grupo MIT; b = $p < 0,05$ quando comparado o grupo EAE versus o grupo MTA, c = $p < 0,05$ quando comparado o grupo EAE versus o grupo controle. Teste ANOVA de uma via.

4.5 Detecção da produção intracelular de IFN- γ , IL-17, IL-10 e FoxP3 em linfócitos TCD4+

A figura 14 apresenta a avaliação de células TCD4+ expressando IFN- γ (A), IL-17 (B), IL-10 (C) e FoxP3 (D). O grupo EAE apresentou maior número de células TCD4 expressando todos os marcadores com relação ao grupo controle. O grupo MIT apresentou aumento significativo no número de células TCD4 produtoras de IFN- γ , IL-17, IL-10 e FoxP3 com relação ao grupo controle, EAE e MTA. Já o grupo MTA reduziu o número de células TCD4 produtoras de IL-17, IL-10 e FoxP3 com relação aos grupos EAE e MIT.

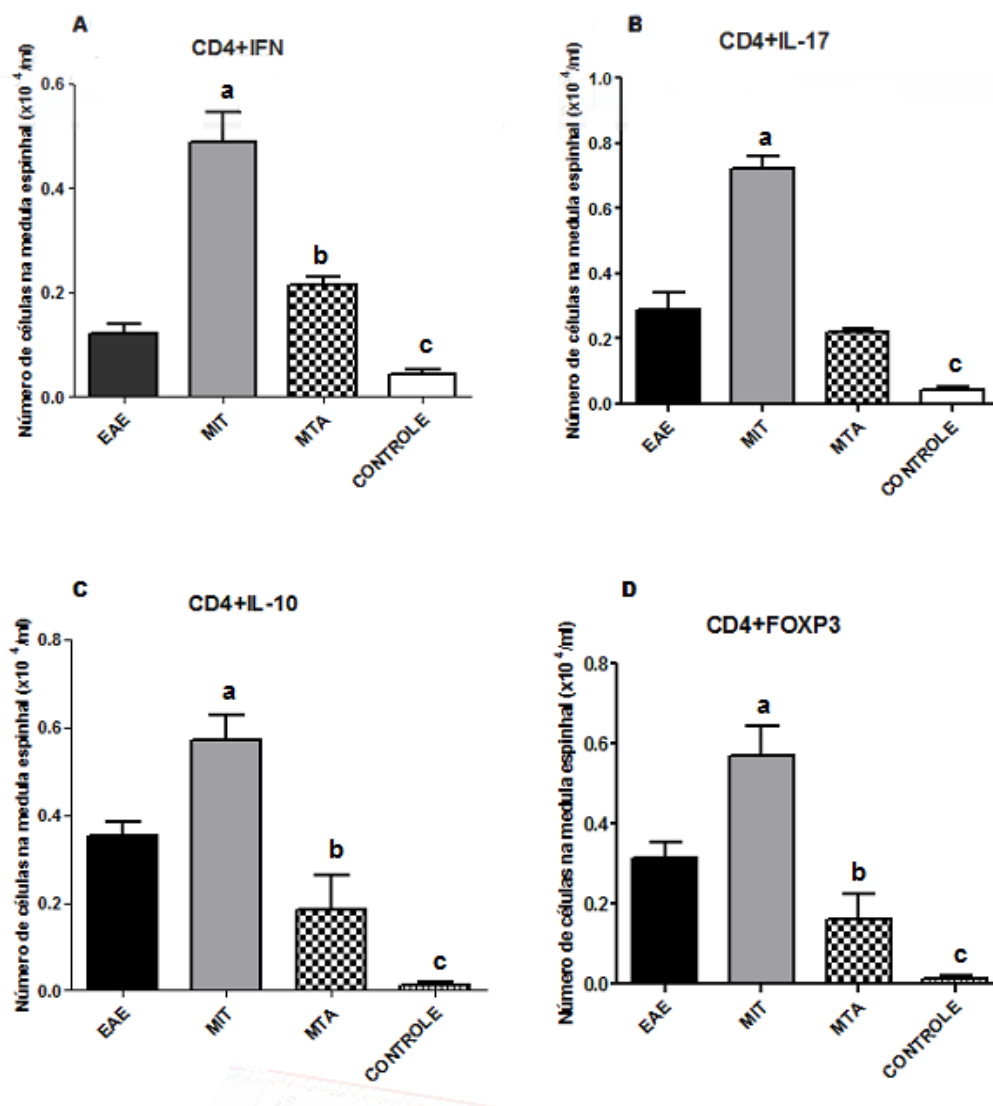


Figura 14- Perfil celular na medula espinhal. Número de células T CD4+ expressando IFN- γ (A), IL-17 (B), IL-10 (C) e FoxP3 (D) na medula espinhal foram determinados por citometria de fluxo (n= 8/ grupo) no dia 21 pós-imunização com MOG₃₅₋₅₅. As barras representam a média aritmética \pm SEM. a = p<0,05 quando comparado o grupo EAE versus o grupo MIT; b = p<0,05 quando comparado o grupo EAE versus o grupo MTA, c = p< 0,05 quando comparado o grupo EAE versus o grupo controle. Teste ANOVA de uma via.

4.6 Análise da produção de citocinas pró- inflamatórias (IFN- γ , IL-17 e IL-6) e citocinas regulatórias (IL-10 e TGF- β) na medula espinhal

Os níveis de IFN- γ , IL-17, IL-6, IL-10 e TGF- β foram quantificados em sobrenadantes de homogenato de medula espinhal no dia 21 pós-imunização. O grupo EAE mostrou um aumento dos níveis de IL-17, IFN- γ e IL-6 (Fig. 15), quando comparado com o grupo controle ($p < 0,05$). O grupo MTA mostrou níveis mais baixos de IL-17, IFN- γ e IL-6 (Fig. 15) em comparação com o grupo EAE ($p < 0,05$). A IL-17 e IFN- γ foram diminuídas significativamente nos camundongos tratados com o MIT (Fig. 15) em comparação com o grupo EAE. Além disso, o grupo EAE mostrou níveis reduzidos de IL-10 e TGF- β , que foram elevadas nos tratamentos com MTA e MIT, semelhante ao do grupo controle (Fig.16).

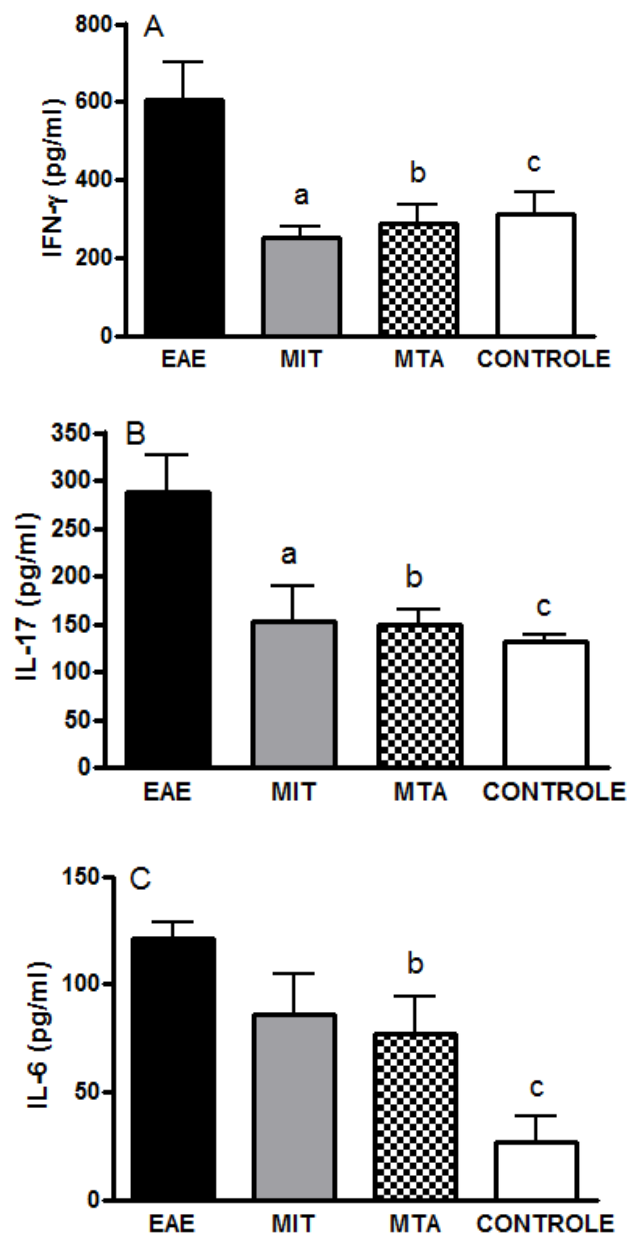


Figura 15- Avaliação das citocinas pró- inflamatórias na medula espinhal no 21^o dpi. Os sobrenadantes do homogenato foram recolhidos para a determinação da concentração de IFN- γ (A), a IL-17 (B), IL-6 (C). Cada barra representa a média aritmética \pm SEM. a = $p < 0,05$ quando comparado o grupo EAE *versus* o grupo MIT; b = $p < 0,05$ quando comparado o grupo EAE *versus* o grupo MTA, c = $p < 0,05$ quando comparado o grupo EAE *versus* o grupo controle. Teste t de Student.

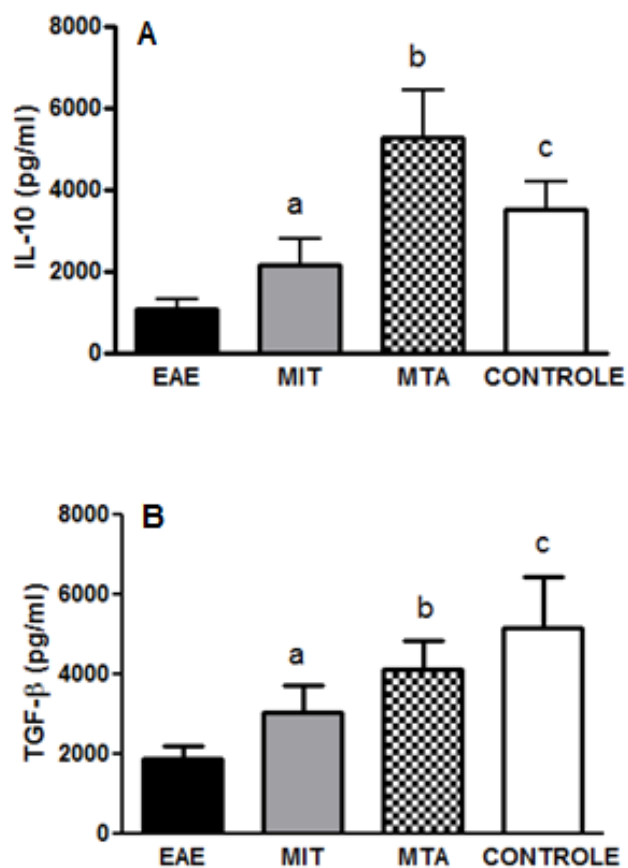


Figura 16- Avaliação das citocinas regulatórias na medula espinhal no 21^o dpi. Os sobrenadantes do homogenato foram recolhidos para a determinação da concentração de IL-10 (A) e TGF- β (B). Cada barra representa a média aritmética \pm SEM. a = $p < 0,05$ quando comparado EAE *versus* MIT; b = $p < 0,05$ quando comparado EAE *versus* MTA; c = $p < 0,05$ quando comparado EAE *versus* controle. Teste t de Student.

4.7 Avaliação de quimiocinas na medula espinhal

Os níveis das quimiocinas CCL5 e CCL20 em sobrenadantes de homogenato de medula espinhal foram avaliados no dia 21 pós-imunização (Fig. 17A e B). O grupo EAE apresentou níveis elevados das quimiocinas quando comparado ao grupo controle não-imunizado ($p < 0,05$). O grupo tratado com MTA mostrou níveis significativamente mais baixos de ambas quimiocinas ($p < 0,05$) em comparação ao grupo de EAE. O tratamento com MIT diminuiu apenas a CCL5 (Fig. 17A).

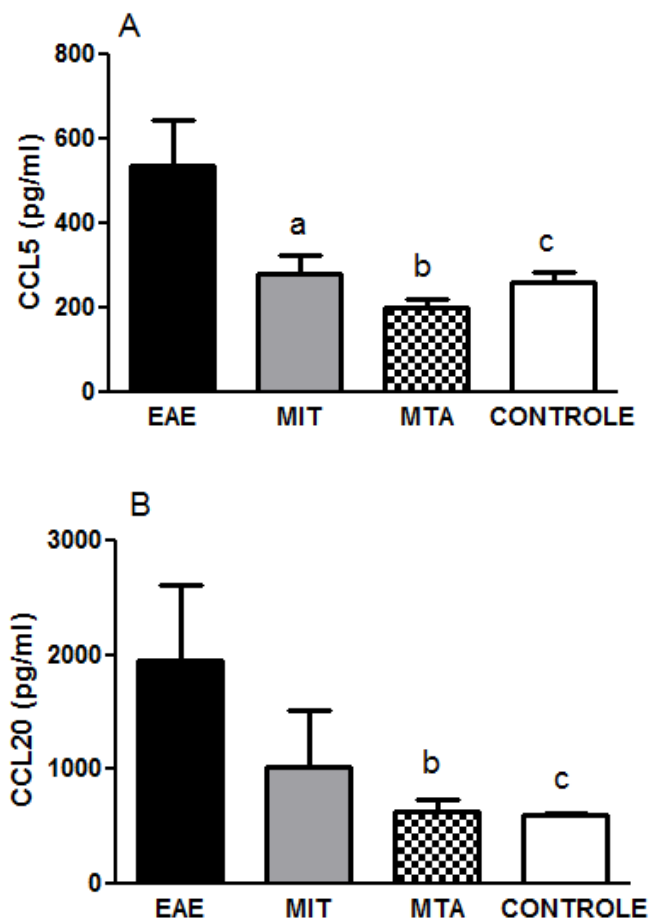


Figura 17- Avaliação da produção de quimiocinas CCL5 (A) e CCL20 (B) no sobrenadante de homogenato de medula espinhal. Os camundongos foram imunizados com 100 µg de peptídeo MOG 35-55 e tratados (n = 5 por grupo) ou não-tratados (n = 5 por grupo) com 1mg/kg de MIT ou MTA no 21º dia pós-imunização. Cada barra representa a média aritmética ± SEM. a = p <0,05 quando comparado EAE versus MIT; b = p<0,05 quando comparado EAE versus MTA; c = p < 0,05 quando comparado EAE versus controle. Teste t de Student.

5 DISCUSSÃO

A EAE é o modelo animal de doença desmielinizante mais utilizado para o estudo da EM (DENIC et al., 2011). É caracterizada por apresentar uma resposta imune mediada predominantemente por células T CD4 contra as proteínas da mielina, induzida, portanto, pela administração concomitante de antígenos da mielina com CFA ou por transferência adotiva de células T reativas contra antígenos da mielina (revisado por STROMNES e GOVERMAN, 2006).

A mitoxantrona (MIT) é recomendada como um fármaco de primeira linha para pacientes com estágios mais graves de EM e como terceira linha em pacientes com EM na forma remitente-remitente (FOX; NEUHAUS, 2006). Acredita-se que os efeitos de citotoxicidade não-específicos em macrófagos e linfócitos seja o principal mecanismo responsável pelos efeitos clínicos da MIT em pacientes com EM (NEUHAUS et. al., 2006; PIAO et. al., 2007). Esta citotoxicidade parece estar relacionada com a presença de grupos hidroxila 5,8 no anel aromático da estrutura química da MIT. Diferentes estudos relacionam a influência desses grupos para a cardiotoxicidade induzida pela MIT (DREWINKO, 1983; KRAPCHO, 1994)

Estudos mostram que efeitos adversos como no caso, a cardiotoxicidade gerada pelo uso de antracenedionas, por exemplo, a MIT, é considerada dose-dependente e irreversível podendo resultar na redução da Fração de Ejeção Ventricular (FEV) e Insuficiência Cardíaca Congestiva. O risco da cardiotoxicidade induzida por MIT em pacientes com EM aumenta com doses cumulativas superiores a $100\text{mg}/\text{m}^2$ de área de superfície corporal, porém, ainda de forma desconhecida, pacientes já desenvolveram a cardiotoxicidade antes de atingirem as doses cumulativas de $100\text{mg}/\text{m}^2$ de área de superfície corporal (COHEN, 2004).

O presente trabalho demonstrou que o tratamento com MIT na dose de $5\text{mg}/\text{kg}$ durante 7 dias reduziu a capacidade de sobrevivência em camundongos C57BL/6, além de reduzir significativamente a massa corporal dos mesmos. O tratamento com o novo derivado antraquinônico MTA, na

dose de 5mg/kg, manteve a capacidade de sobrevivência dos animais e também a massa corporal dos mesmos após os 7 dias de tratamento. O tratamento dos animais com a MIT e o MTA, nas doses de 1mg/kg durante 7 dias, não foi capaz de reduzir a capacidade de sobrevivência dos animais, porém o tratamento com 1mg/kg de MIT, a partir do 5º dia, gerou redução na massa corporal dos animais tratados.

A fração MB da creatinofosfoquinase (CK-MB) por muito tempo tem sido considerada um marcador para o diagnóstico de eventos e lesões cardiovasculares, por exemplo, o Infarto Agudo do Miocárdio (IAM) (ANDERSON, 2007). Nesse trabalho, o tratamento com MIT gerou o aumento na produção da CK-MB no soro de camundongos C57BL/6, enquanto que o tratamento com o derivado MTA manteve os níveis da CK-MB próximos ao controle. Tais resultados corroboram com a hipótese de que o tratamento com MIT leva a efeitos adversos, como a cardiotoxicidade, e os mesmos são dose-dependentes, o que não ocorreu no tratamento com o MTA.

O tratamento com o derivado antraquinônico MTA foi capaz de reduzir de forma significativa os sinais clínicos da EAE induzida por MOG em camundongos C57BL/6. Além disso, a presença de infiltrados inflamatórios na medula espinhal foi reduzida nos animais tratados com o MTA, de forma similar à MIT.

A desmielinização na EAE, tal como na EM, é um resultado das lesões inflamatórias na substância branca que conduzem a problemas clínicos (LASSMANN, 2014). Pode-se notar que o tratamento com MTA reduziu a presença de infiltrados inflamatórios e desmielinização na medula espinhal, sugerindo uma relação com a inibição do agravamento dos sinais clínicos.

A menor presença de sinais clínicos da EAE durante o tratamento com o MTA parece estar associada à menor presença de células inflamatórias no SNC. Como foi demonstrado, tal tratamento foi capaz de reduzir a presença de células CD4+, CD11c+ e CD11b+ em comparação ao grupo EAE. Porém, o tratamento com o derivado MTA aumentou de forma significativa o número de células que expressam o marcador F4/80.

As APCs responsáveis pela reativação de células T no SNC ainda não foram completamente identificadas. Células Dendríticas (DCs), macrófagos infiltrantes, células B e micróglia residente do SNC podem expressar a

molécula MHC de classe II e moléculas co-estimulatórias que estão envolvidas na iniciação e progressão da EAE (GOVERMAN, 2009). As DCs também conhecidas como APCs profissionais podem induzir a resposta imune.

Wlodarczyk (2014) identificou em seu trabalho uma população de células CD11c+ em lesões de desmielinização. Em tal modelo, essas células se apresentaram como potentes APCs auxiliando na resposta proliferativa de linfócitos T. Em estudos *ex vivo* o autor demonstrou que as células CD11c+ localizadas no SNC, que incluem DCs e micróglia residente do SNC, expressavam níveis similares de MHC de classe II e moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86. Ainda nesse trabalho, o autor demonstra que as células CD11c+ foram fortes indutoras da produção de citocinas pró-inflamatórias de perfis Th1 e Th17.

A alta ativação da micróglia no SNC, ocasionada por doenças degenerativas como a EAE, associada à intensa produção de Óxido Nítrico (NO) que pode ser produto de tal ativação, pode levar a um processo denominado microgliose. Um dos fatores que indicam a ocorrência da microgliose é a alta expressão da molécula CD11b. Na EAE e EM, a alta expressão de CD11b já foi correlacionada à ativação exacerbada da micróglia (ROCK, et. al. 2004).

No presente trabalho, a gravidade dos sinais clínicos observada em camundongos C57BL/6 com EAE induzida com MOG pode estar relacionada ao aumento no número de APCs CD11c+ no SNC que atuam na apresentação de antígenos mielínicos e reativação de células T e B mielino-específicas e ainda ao processo de microgliose com a ativação da micróglia residente no SNC, culminando na exacerbação do processo inflamatório e desmielinização observados em tais animais.

O tratamento com o derivado MTA foi capaz de reduzir a expressão de CD11b e CD11c o que pode ter sido a causa da redução do processo inflamatório e também do número de células TCD4 e células B CD19+ na medula espinhal, de forma similar à MIT.

Com relação ao número total de células mononucleares isoladas na medula espinhal no 21º dia após a indução da EAE, foi demonstrado nesse trabalho que o grupo EAE apresentou aumento significativo de células no

SNC em relação ao controle. O grupo MTA apresentou pequena redução de células quando comparado ao grupo EAE. Já no grupo MIT, o número foi significativamente reduzido, aproximando-se ao encontrado no grupo controle.

O mecanismo de ação da MIT em reduzir os sinais clínicos observados na EAE e EM já vem sendo estudado há algum tempo. A MIT apresenta a capacidade de ultrapassar a BHE atingindo e interagindo com células do SNC. A redução da proliferação de linfócitos e macrófagos promovida pela MIT é originada pela intercalação da mesma nas fitas de DNA induzindo a inibição da enzima topoisomerase II, que é uma enzima de reparo do DNA, e ainda promovendo a geração de radicais livres (FOX, 2004; SMITH, 1983).

Além disso, trabalhos mostram que a MIT reduz a apresentação antigênica por estimular a morte celular por apoptose nas células envolvidas na apresentação. Dessa forma, a mesma poderia inibir a secreção de citocinas relacionadas à patogênese da EM e EAE (CORNA, et. al. 2004).

Logo, a significativa redução de células mononucleares na medula espinhal em camundongos tratados com MIT observada nesse estudo pode ser explicada pela ação apoptótica do tratamento em células como macrófagos, linfócitos, células dendríticas, reduzindo assim o processo de desmielinização no SNC.

O tratamento com o derivado MTA não apresentou significativa redução no número de células mononucleares no SNC com relação ao grupo EAE, porém o mesmo foi capaz de reduzir o processo de desmielinização de forma semelhante à MIT. Baseando-se nesses resultados, supõe-se o derivado estimule uma alteração no fenótipo celular na medula espinhal, diminuindo o número de células pró-inflamatórias e aumentando o número de células regulatórias.

Liu e colaboradores (2015) demonstram em recente trabalho que o tratamento com Fasudil, um inibidor da enzima Rho-kinase (ROCK) que atua na regulação da migração, proliferação e sobrevivência celular, em células mononucleares encefalitogênicas *in vitro* e posteriormente transferidas adotivamente para camundongos EAE foi capaz de reduzir a expressão de

TLR4 e a produção de citocinas pró-inflamatórias na medula espinhal. O tratamento com Fasudil reduziu a expressão de iNOS e produção de NO, gerando aumento na expressão de Arg-1, modulando a polarização de macrófagos de perfil M1 (classicamente ativados), que são ativados na presença da citocina IL-12 e são produtores de IFN- γ , TNF- α , NO, para o perfil M2 (alternativamente ativados), que são ativados na presença de IL-4, IL-13 e IL-10 e são produtores de IL-4, IL-13, TGF- β e IL-10.

Porcheray e colaboradores (2005) discutem a co-existência de macrófagos classicamente ativados (M1) e alternativamente ativados (M2) durante o desenvolvimento do curso da EAE. Porém, macrófagos M1 são mais predominantes na fase inicial da doença, enquanto que os macrófagos M2 são predominantes nas fases mais tardias da doença contribuindo para a redução do processo inflamatório, secreção de citocinas regulatórias, estimulando o remodelamento tecidual.

Ainda existem dificuldades na diferenciação da micróglia residente no SNC e macrófagos periféricos infiltrantes devido ao compartilhamento do fenótipo F4/80+/ CD11b+. Entretanto, alguns autores sugerem que em estágios iniciais de condições inflamatórias, a micróglia residente no SNC expressa baixos níveis de CD45, CCR1, CCR5, mas altos de TGF- β , enquanto macrófagos infiltrantes periféricos expressam altos níveis de CD45, CCR1, CCR5 e baixos de TGF- β (BUTOVSKY, et. al. 2014).

Nesse trabalho, o derivado MTA aumentou a expressão e o número de células expressando o marcador F4/80 na medula espinhal no 21^o dpi, o que sugere um aumento no número de macrófagos no SNC. Estes macrófagos provavelmente apresentam o fenótipo M2 e também auxiliam na redução do processo inflamatório no SNC, elevando a produção de citocinas regulatórias como a IL-10 e o TGF- β , após o tratamento com o MTA.

A análise do número de células TCD4 expressando IFN- γ , IL-17, IL-10 e FoxP3 revelou que o grupo MIT apresentou aumento no número de células T CD4 expressando todos estes marcadores. Porém, esse resultado não seria compatível com aqueles observados na melhora dos sinais clínicos e a histopatologia dos animais tratados com MIT. Dessa forma, uma provável

explicação para esse fato é a inibição da secreção celular durante o tratamento com a MIT. De acordo com essa hipótese, as células TCD4 encefalitogênicas realizariam a produção de tais citocinas, porém não conseguiriam realizar a secreção das mesmas.

Com relação à secreção de citocinas pró-inflamatórias IFN- γ e IL-17 em homogenato da medula espinhal de camundongos EAE tratados com MIT, pode-se observar uma redução na secreção de tais citocinas, o que seria compatível com a hipótese da inibição da secreção das mesmas induzida pela MIT. O mesmo é notado com a citocina IL-10 que teve aumento na produção pelas células TCD4, porém sua secreção não foi aumentada significativamente. Assim, o mecanismo que pode estar envolvido na melhora de sinais clínicos no modelo de EAE após o tratamento com MIT é a imunossupressão celular através da apoptose e conseqüentemente a inibição da secreção de citocinas no SNC.

O tratamento com o derivado antraquinônico MTA reduziu a produção das citocinas pró-inflamatórias IFN- γ e IL-17 pelas células TCD4 e também a sua secreção, diferentemente da MIT. A redução do processo inflamatório e desmielinização após o tratamento com o derivado pode ser também justificado por esse efeito. Já o número de células TCD4 expressando a IL-10 e também o marcador de células T regulatórias FoxP3 durante esse tratamento foi menor.

As citocinas IL-17 e IFN- γ desempenham papéis importantes na indução e na gravidade da EAE e EM (HU, 2011; ROSTAMI, 2013). Além disso, a deficiência de IL-17 ou a utilização de anticorpos de bloqueio da mesma impediram o desenvolvimento e/ou a redução da gravidade da EAE (KLOSE, 2013). Já foi também demonstrado que o IFN- γ está envolvido na indução e na gravidade da EAE (ROSTAMI, 2013; LEES, 2008). Portanto, com base nos resultados aqui apresentados, os efeitos do MTA parecem ter influenciado a produção e secreção dessas citocinas, visto que o tratamento levou a uma diminuição da inflamação e redução de sinais de EAE.

Além da secreção das citocinas IFN- γ , IL-17, IL-10, foi analisada ainda a secreção da citocina pró-inflamatória IL-6 e da citocina TGF- β . Como foi observado, o derivado MTA foi capaz de reduzir significativamente a secreção da citocina IL-6 e aumentar a de TGF- β na medula espinhal.

A citocina IL-6 é conhecida por estar envolvida na inflamação do SNC e patologia de EAE, diretamente através da ativação da micróglia e astrócitos (GIRALT, 2013) ou indiretamente, promovendo a diferenciação e a expansão das células Th17 (VELDHOEN, 2006). No presente trabalho o tratamento com o MTA diminuiu os níveis de IL-6, o que pode ter afetado a produção de IL-17, observada nos resultados.

O tratamento com MTA aumentou os níveis de TGF- β e IL-10, as quais poderiam ter contribuído para a redução dos sinais clínicos da EAE.

As citocinas TGF- β e IL-10 têm sido implicadas na regulação de doenças autoimunes. Camundongos com deficiência em IL-10 desenvolvem uma EAE grave e são 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, 2013). Além disso, camundongos transgênicos 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). Corroborando com essa hipótese, já foi verificado que quando as células T CD4+ “naives” são estimuladas na presença de TGF- β , as células T CD4+ Foxp3+, não produtoras de IL-17, são induzidas e o aumento na produção de TGF- β está associado à diminuição dos sinais clínicos da EAE (HUSS, 2011; FARIAS, 2013).

Como se pode perceber, o tratamento com o MTA não parece minimizar os sinais clínicos da doença através da ação de células T, já que a produção das citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias intracitoplasmáticas por células TCD4+ esteve reduzida após tal tratamento. O aumento na expressão do marcador F4/80 em células da medula espinhal

dos camundongos com EAE sugere que células da imunidade inata, como os macrófagos e micróglia atuam no controle do agravamento dos sinais clínicos da doença.

A migração de leucócitos para o SNC é orquestrada por quimiocinas, que são citocinas que apresentam potencial quimiotático atuando no recrutamento de leucócitos para sítios inflamatórios funcionando assim como mediadoras ou reguladoras da inflamação (MORIGUCHI, 2013). Foi demonstrado que o bloqueio do receptor da quimiocina CCL20 inibiu o desenvolvimento de EAE, devido à migração reduzida de células T CD4+ autorreativas (LISTON, 2009). Além disso, um derivado antraquinônico já demonstrou potencial em reduzir a expressão de quimiocinas e reduzir o agravamento dos sinais clínicos da EAE (ALVES, 2012). Os baixos níveis de CCL5 e CCL20 evidenciados na medula espinhal no presente trabalho, com o tratamento com MTA, podem estar relacionados com o recrutamento reduzido de células mielino-reativas produtoras de IFN- γ e IL-17. Já é conhecido que as células Th17 ao produzirem a quimiocina CCL20 pode promover o recrutamento de outras células Th17 que expressem o ligante CCR6 para a CCL20 (YAMAZAKI, 2008). Tal fato poderia explicar a redução do infiltrado inflamatório celular e a desmielinização menor no grupo tratado com MTA, causando, portanto, uma melhoria nos sinais clínicos.

A migração de células T, células B e células imunes inatas para o SNC estão sendo relacionados com o desenvolvimento, progressão e agravamento da EAE (MENEZES, 2007; BERARD, 2010). Além disso, tratamentos que reduzem a infiltração destas células proporcionam melhora do escore clínico da doença (VILLARES, 2009; NIKODEMOVA, 2010).

6 CONCLUSÃO

O tratamento com MTA mostrou ser eficaz na melhora dos sintomas clínicos de EAE, a qual parece estar associada com níveis mais baixos de CCL5, CCL20, IFN- γ , IL-17 e IL-6, e ainda com a reversão da diminuição de IL-10 e TGF- β na medula espinhal. Além disso, estudos clínicos devem ser também realizados para uma melhor avaliação dos efeitos do derivado MTA, já que este derivado pode ser um potencial medicamento para a terapia da EM.

REFERÊNCIAS

ALVES, C.C., CASTRO, S.B., COSTA, C.F. 2012. Anthraquinone derivative O,O'-bis-(3'-iodopropyl)-1,4-dihydroxyanthraquinone modulates immune response and improves experimental autoimmune encephalomyelitis. **International Immunopharmacology**, **14**: 127-132.

ALVES-LEON, S. V. 2008. Multiple sclerosis outcome and morbi-mortality of a Brazilian cohort patients. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, São Paulo, **66**: 671-677.

AN, G., MORRIS, M. E. 2012. A physiologically based pharmacokinetic model of mitoxantrone in mice and scale-up to humans: a semi-mechanistic model incorporating DNA and protein binding. **The AAPS Journal**, Arlington, **14**: 352-364.

ANDERSON, J.L., ADAMS, C.D., ANTMAN, E.M., BRIDGES, C.R., CALIFF, R.M., CASEY, J. 2007. Guidelines for the management of patients with unstable angina/non ST-elevation myocardial infarction: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Revise the 2002 Guidelines for the Management of Patients With Unstable Angina/Non ST-Elevation Myocardial Infarction): developed in collaboration with the American College of Emergency Physicians, the Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, and the Society of Thoracic Surgeons: endorsed by the American Association of Cardiovascular and Pulmonary Rehabilitation and the Society for Academic Emergency Medicine. **Circulation**. **116**(7): 148-304

ARRUDA, W. O., SCOLA, R. H., TEIVE, H. A. 2001. Multiple sclerosis: report on 200 cases from Curitiba, Southern Brazil and comparison with other Brazilian series. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria, São Paulo, 59**: 165-170.

BABBE, H., ROERS, A., WAISMAN, A., LASSMANN, H., GOEBELS, N., HOHLFELD, R., FRIESE, M., SCHRODER, R., DECKERT, M., SCHMIDT, S., RAVID, R., RAJEWSKY, K. 2000. Clonal expansions of CD8(+) T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction. **The Journal of Experimental Medicine, 192**: 393-404.

BALSIMELLI, S., MENDES, M.F., BERTOLUCCI, P.H., TILBERY, C.P. 2007. Attention impairment associated with relapsing-remitting multiple sclerosis patients with mild incapacity. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria. 65(2A)**: 262-7.

BASSO, A.S., FRENKEL, D., QUINTANA, F.J., COSTA-PINTO, F.A., PETROVIC-STOJKOVIC, S., PUCKETT, L., MONSONEGO, A., BAR-SHIR, A., ENGEL, Y., GOZIN, M., WEINER, H.L. 2008. Reversal of axonal loss and disability in a mouse model of progressive multiple sclerosis. **Journal of Clinical Investigation, 118(4)**:1532-43.

BERARD, J. L., WOLAK, K., FOURNIER, S., DAVID, S. 2010. Characterization of relapsing-remitting and chronic forms of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice. **Glia, 58**: 434-445.

BETTELLI, E., BAETEN, D., JAGER, A., SOBEL, R.A., KUCHROO, V.K. 2006. Myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific T and B cells cooperate to induce a Devic-like disease in mice. **Journal of Clinical Investigation, 116**: 2393-2402.

BETTELLI, E., PAGANY, M., WEINER, H.L., LININGTON, C., SOBEL, R.A., KUCHROO, V.K. 2003. Myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific T cell receptor transgenic mice develop spontaneous autoimmune optic neuritis. **The Journal of Experimental Medicine**, **197**:1073-1081.

BLINK, S. E., CALDIS, M. W., GOINGS, G. E., HARP, C. T., MALISSEN, B., PRINZ, I., XU, D., MILLER, S. D. 2014. γ δ T Cell Subsets Play Opposing Roles in Regulating Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. **Cellular Immunology**, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellimm.2014.04.013>.

BRETTSCHEIDER, J., TUMANI, H., KIECHLE, U., MUCHE, R., RICHARDS, G., LEHMENSIEK, V., LUDOLPH, A.C., OTTO, M. 2009. IgG antibodies against measles, rubella, and varicella zoster virus predict conversion to multiple sclerosis in clinically isolated syndrome. **PLoS One**. **5**: 4-11.

BUTOVSKY, O., JEDRYCHOWSKI, M. P., MOORE, C.S., CIALIC, R., LANSER, A.J., GABRIELY, G. 2014. Identification of a unique TGF-beta-dependent molecular and functional signature in microglia. **Nature Neuroscience**; **17**:131–43.

CALABRESI, P., CHABNER, B. A. 2005. Quimioterapia das doenças neoplásicas. GOODMAN & GILMAN. **As bases farmacológicas da terapêutica**. McGraw Hil. 10° ed. Rio de Janeiro, p. 1035-98.

CALLEGARO, D., GOLDBAUM, M., MORAIS, L. 2001. The prevalence of multiple sclerosis in the city of São Paulo, Brazil, 1997. **Acta Neurologica Scandinavica**, **104**: 208–13.

CASTRO, S.B.R., JUNIOR, C.O.R., ALVES, C.C.S. 2012. Immunomodulatory effects and improved prognosis of experimental autoimmune encephalomyelitis after O-tetradecanoyl-genistein treatment. **International Immunopharmacology**, **12**: 465-470.

CHALLA, D.K., BUSSMEYER, U., KHAN, T., MONTOYO, H.P., BANSAL, P., OBER, R.J., WARD, E.S. 2013. Autoantibody depletion ameliorates disease in murine experimental autoimmune encephalomyelitis. **MAbs**. **5(5)**: 655-9.

CHANVILLARD, C., JACOLIK, R. F., INFANTE-DUARTE, C., NAYAK, R. C. 2013. The role of natural killer cells in multiple sclerosis and their therapeutic implications. **Frontiers in immunology**, **4 (63)**: 1-9.

COHEN, B.A., MIKOL, D.D. 2004. Mitoxantrone treatment of multiple sclerosis: safety considerations. **Neurology**. **63**: S28–32

COMPSTON, A., COLES, A. 2002. Multiple sclerosis. **Lancet**, **359**:1221-1231.
CORNA, G., SANTAMBROGIO, P., MINOTTI, G., CAIRO, G.J. 2004. Doxorubicin paradoxically protects cardiomyocytes against iron-mediated toxicity: role of reactive oxygen species and ferritin. **Biology Chemistry** **279**: 13738-13745.

CORREA, T.A., ALVES, C.C.S., CASTRO, S.B.R., OLIVEIRA, E. E., FRANCO, L.S., FERREIRA, A.P., ALMEIDA, M.V. 2013. Synthesis of 1,4-Anthracene-9,10-dione Derivatives and Their Regulation of Nitric Oxide, IL-1b and TNF-a in Activated RAW264.7 Cells. **Chemical Biology & Drug Design**, **82 (4)**: 463–467.

CRAWFORD, M.P., YAN, S.X., ORTEGA, S.B., MEHTA, R.S., HEWITT, R.E., PRICE, D.A., STASTNY, P., DOUEK, D.C., KOUP, R.A., RACKE, M.K., KARANDIKAR, N.J. 2004. High prevalence of autoreactive, neuroantigen-specific CD8+ T cells in multiple sclerosis revealed by novel flow cytometric assay. **Blood**, **103**: 4222-4231.

CRISTIANO, E., PATRUCCO, L., ROJAS, J.I. 2009. Prevalence of multiple sclerosis in Buenos Aires, Argentina using the capture-recapture method. **European Journal of Neurology**. **16**:183–87.

DE PAULA, M. L. 2008. Genistein down-modulates pro-inflammatory cytokines and reverses clinical signs of experimental autoimmune encephalomyelitis. **International Immunopharmacology**, **8**: 1291-1297.

DENIC, A.; JOHNSON, A.J.; BIEBER, A.J.; WARRINGTON, A.E.; RODRIGUEZ, M.; PIRKO, I. 2011. The relevance of animal models in multiple sclerosis research. **Pathophysiology**, **18(1)**: 21–29.

DREWINKO, B., YANG, L.Y., BARLOGIE, B., TRUJILLO, J.M. 1983. Comparative cytotoxicity of bisantrene, mitoxantrone, ametantrone, dihydroxyanthracenedione, dihydroxyanthra-cenedione diacetate, and doxorubicin on human cells in vitro. **Cancer Research**, **43**: 2648-2653.

ELOVAARA, I., LALLA, M., SPARE, E., LEHTIMAKI, T., DASTIDAR, P. 1998. Methylprednisolone reduces adhesion molecules in blood and cerebrospinal fluid in patients with MS. **Neurology**, **51**:1703- 1708.

ERCOLINI, A.M., MILLER, S.D. 2009. The role of infections in autoimmune disease. **Clinical & Experimental Immunology**, **155**: 1-15.

EVANS, C., BELAND, S.G., KULAGA, S., WOLFSON, C., KINGWELL, E., MARRIOTT, J., KOCH, M., MAKHANI, N., MORROW, S., FISK, J., DYKEMAN, J., JETTÉ, N., PRINGSHEIM, T., MARRIE, R.A. 2013. Incidence and prevalence of multiple sclerosis in the Americas: a systematic review. **Neuroepidemiology**, **40(3)**: 195-210.

European Medicines Agency. Gilenya [Internet]. 2011 Mar 30 [updated 2014 Mar 20; cited 2014 Mar 20]. Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR__Summary_for_the_public/human/002202/WC500104530.pdf

European Medicines Agency. Tysabri [Internet]. 2011 May [updated 2014 Mar 20; cited 2014 Mar 20]. Available from:

[http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000603/human_med_001119.jsp &mid=WC0b01ac058001d124](http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000603/human_med_001119.jsp&mid=WC0b01ac058001d124)

FARIAS, A.S., SPAGNOL, G.S., BORDEAUX-REGO, P. 2013. Vitamin D3 induces IDO+ tolerogenic DCs and enhances Treg, reducing the severity of EAE. **CNS Neurosciences & Therapeutics**, **19**: 269-277.

FISHER, G. R., PATTERSON, L. H. 1991. DNA strand breakage by peroxidase-activated mitoxantrone. **The Journal of pharmacy and pharmacology**, **43**: 65-68.

FOX, E. J. 2004. Mechanism of action of mitoxantrone. **Neurology**, **63**: S15–S18.

FOX, E. J. 2006. Management of worsening multiple sclerosis with mitoxantrone: a review. **Clinical Therapeutics**, **28**: 461–474.

FUJINAMI, R.S., OLDSTONE, M.B. 1985. Amino acid homology between the encephalitogenic site of myelin basic protein and virus: mechanism for autoimmunity. **Science**, **230** (4729): 1043-1045.

GIRALT, M., RAMOS, R., QUINTANA, A. 2013. Induction of atypical EAE mediated by transgenic production of IL-6 in astrocytes in the absence of systemic IL-6. **Glia**, **61**: 587-600.

GOLDENBERG, T., RIBEIRO, F. M. 2015. Mycobacterium and autoimmunity. **Lupus**, **24**(4-5):374-81.

GRIGORIADIS, N., HADJIGEORGIOU, G.M. 2006. Virus-mediated autoimmunity in Multiple Sclerosis. **Journal of Autoimmune Diseases**, **19**(3): 1.

HADER, W.J. 1982. Prevalence of multiple sclerosis in Saskatoon. **Canadian Medical Association Journal**. 127:295–97.

HAFLER, D.A. 2004. Multiple sclerosis. **Journal of Clinical Investigation**, **113(6)**: 788-94.

HARTUNG, H. P.; GONSETTE, R.; KÖNIG, N.; KWIECINSKI, H.; GUSEO, A.; MORRISSEY, S.P. 2002. Mitoxantrone in progressive multiple sclerosis: a placebo-controlled, double-blind, randomised, multicentre trial. **Lancet**, **360**: 2018–25.

HARTUNG, H- PETER.; VERMERSCH, P.; OLSSON, T. 2011. Principles of a new treatment algorithm in multiple sclerosis. **Expert Review of Neurotherapeutics**, **11(3)**: 351–62.

HU, Y., SHEN, F., CRELLIN, N.K., OUYANG, W. 2011. The IL-17 pathway as a major therapeutic target in autoimmune diseases. **Annals of the New York Academy of Sciences**, **1217**: 60–76.

HUSS, D. J., WINGER, D.R.C., COX, G.M. 2011. TGF- β signaling via Smad4 drives IL-10 production in effector Th1 cells and reduces T-cell trafficking in EAE. **European Journal of Immunology**, **41**: 2987-2996.

IMLER, J.R., PETRO, T. M. 2008. Decreased severity of experimental autoimmune encephalomyelitis during resveratrol administration is associated with increased IL-17⁺IL-10⁺ T cells, CD4⁻ IFN- γ ⁺ cells, and decreased macrophage IL-6 expression. **International Immunopharmacology**, **9**: 134–143.

JONES, J. L.; COLES, A. 2010. New treatment strategies in multiple sclerosis. **Experimental Neurology**, **225**: 34-39.

JOHNSON, H. L; WILLENBRING, R.C., JIN, F., MANHART, W.A., LAFRANCE, S.S., PIRKO, I., JOHNSON, A. J. 2014. Perform competent CD8 Tcells are sufficient to cause immune-mediated blood-brain barrier disruption. **PlosOne**. 9 (10).

KAPUSCINSKI, J., DARZYNKIEWICZ, Z. 1986. Relationship between the pharmacological activity of antitumor drugs Ametantrone and mitoxantrone (Novatrone) and their ability to condense nucleic acids. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, **83**: 6302-6306.

KLOSE, J., SCHMIDT, N.O., MELMS, A. 2013. Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by interleukin-10 transduced neural stem/progenitor cells. **Journal of Neuroinflammation**, **10**: 117.

KOCH-HENRIKSEN, N., SORENSEN, P.S. 2010. The changing demographic pattern of multiple sclerosis epidemiology. **Lancet Neurology**, **9**: 520–32.

KRAPCHO, A.P., PETRY, M.E., GETAHUN, Z. 1994. 6,9-Bis[(aminoalkyl)amino]benzo[g]isoquinoline-5,10-diones. A novel class of chromophore-modified antitumor anthracene-9,10-diones: synthesis and antitumor evaluations. **Journal of Medical Chemistry**, **37**: 828-837.

KRAPF, H.; MORRISSEY, S.; ZENKER, O.; ZWINGERS, T.; GONSETTE, R.; HARTUNG, H. 2005. Effect of mitoxantrone on MRI in progressive MS: results of the MIMS trial. **Neurology**, **65(5)**: 690–5.

KRISHNAMOORTHY, G., SAXENA, A., MARS, L.T., DOMINGUES, H.S., MENTELE, R., BEN-NUN, A., LASSMANN, H., DORNMAIR, K., KURSCHUS, F.C., LIBLAU, R and WEKERLE, H. 2009. Myelin-specific T cells also recognize neuronal autoantigen in a transgenic mouse model of multiple sclerosis. **Nature Medicine**, **15**: 626-632.

KRISHNAMOORTHY, G., LASSMANN, H., WEKERLE, H., HOLZ, A. 2006. Spontaneous optico-spinal encephalomyelitis in a double-transgenic mouse model of autoimmune T cell/B cell cooperation. **Journal of Clinical Investigation**, **116**: 2385-2392.

KROENKE, M.A.; CARLSON, T.J.; ANDJELKOVIC, A.V.; SEGAL, B.M. 2008. IL-12- and IL-23-mediated T cells induce distinct types of EAE based on histology, CNS chemokine profile, and response to cytokine inhibition. **The Journal of Experimental Medicine**, **205 (7)**: 1535-1541.

KURTZKE, J.F. 1975^a. A reassessment of the distribution of multiple sclerosis. Part two. **Acta Neurologica Scandinavica**, **51**:137–57.

KURTZKE, J.F. 1975^b. A reassessment of the distribution of multiple sclerosis. Part one. **Acta Neurologica Scandinavica**, **51**:110–36.

KURTZKE, J.F. 2000. Epidemiology of multiple sclerosis. Does this really point toward an etiology? **Lectio Doctoralis. Neurological Sciences**, **21**:383–403.

LA MANTIA, L.; VACCHI, L.; DI PIETRANTONJ, C.; EBERS, G.; ROVARIS, M.; FREDRIKSON, S.; FILIPPINI, G. 2012. Interferon beta for secondary progressive multiple sclerosis. **Cochrane Database System Reviews**. 2012; DOI: 10.1002/14651858.CD005181.

LANA-PEIXOTO, M. A. 2008. Devic's neuromyelitis optica: a critical review. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, **66**: 120-138.

LANG, H.L., JACOBSEN, H., IKEMIZU, S., ANDERSSON, C., HARLOS, K., MADSEN, L., HJORTH, P., SONDERGAARD, L., SVEJGAARD, A., WUCHERPFENNIG, K., STUART, D.I., BELL, J.I., JONES, E.Y., FUGGER, L. 2002. A functional and structural basis for TCR cross-reactivity in multiple sclerosis. **Nature Immunology**, **3(10)**: 940–943.

LASSMANN, A. 2014. Pathology of multiple sclerosis and related inflammatory demyelinating diseases. **Handbook of Clinical Neurology**, **122**: 15-58.

LEES, J.R., GOLUMBEK, P.T., SIM, J., DORSEY, D., RUSSELL, J. H. 2008. Regional CNS responses to IFN- γ determine lesion localization patterns

during EAE pathogenesis. **The Journal of Experimental Medicine**, **205**: 2633–2642.

LIMA, E., GUIMARÃES, J., PEREIRA, A., BODAS, A., DELGADO, L., SÁ, M.J. 2008. Determinação de anticorpos anti-mielina na Esclerose Múltipla. **Arquivos Médicos. Porto**. **22**: 4-5.

LINCOLN, J. A.; COOK, S. D. 2009. An overview of gene-epigenetic-environmental contributions to MS causation. **Journal of the Neurological Sciences**, **286**: 54-57.

LININGTON, C., BRADL, M., LASSMANN, H., BRUNNER, C., VASS, K. 1988. Augmentation of demyelination in rat acute allergic encephalomyelitis by circulating mouse monoclonal antibodies directed against a myelin/oligodendrocyte glycoprotein. **American Journal of Pathology** **130**: 443-454.

LISTON, A., KOHLER, R.E., TOWNLEY, S. 2009. Inhibition of CCR6 function reduces the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis via effects on the priming phase of the immune response. **The Journal of Immunology**, **182**: 3121-3130.

LIU, C., GUO, S., YU, J., LI, Y., ZHANG, H., FENG, L., YUAN, H., YANG, W., FENG, Q., XIAO, B., MA, C. 2015. Fasudil mediates cell therapy of EAE by immuno-modulating encephalomyelitic T cells and macrophages. **European Journal of Immunology**. **5**: 142–152.

LOUTEN, J., BONIFACE, K.; MALEFYT, R.W. 2009. Development and function of TH17 cells in health and disease. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, **123**, 1004-11.

LUBLIN, F.D. 2007. The incomplete nature of multiple sclerosis relapse resolution. **Journal of the Neurological Sciences**, **15**: 256 Suppl 1:S14-8.

LUBLIN, F.D., REINGOLD, S.C. 1996. 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**. **46(4)**: 907-11.

MAIR, F., BECHER, B. 2014. Thy1+ Sca1+ innate lymphoid cells infiltrate the CNS during autoimmune inflammation, but do not contribute to disease development. **European Journal of Immunology**. **44**: 37–45.

MCFARLAND, H.F., MARTIN, R. 2007. Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity. **Nature Immunology**. **8(9)**: 913-9.

MELCON, M., GOLD, L., CARRA, A. 2008. Argentine Patagonia: prevalence and clinical features of multiple sclerosis. **Multiple Sclerosis**, **14**: 656–62.

MENEZES, J.S., ELZEN, P.V., THORNES, J. 2007. A public T cell clonotype within a heterogeneous autoreactive repertoire is dominant in driving EAE. **Journal of Clinical Investigation**, **117**: 2176–2185.

MILLER, J.H.D., VAS, C.J., NORONHA, M.J., LIVERSEDGE, L.A., RAWSON, M.D. 1967. Long-term treatment of multiple sclerosis with corticotrophin. **Lancet**, **2**:429-31.

MILLS, K. H. 2011. TLR-dependent T cell activation in autoimmunity. **Nature Reviews Immunology**, **11(12)**: 807-22.

MORIGUCHI, K., MIYAMOTO, K., TANAKA, N., YOSHIE, O., KUSUNOKI, S. 2013. The importance of CCR4 and CCR6 in experimental autoimmune encephalomyelitis. **Journal of Neuroimmunology**, **257**: 53-58.

MORLEY, J.O., FURLONG, P.J. 2006. Synthesis and calculated properties of some 1,4-bis(amino)anthracene-9,10-diones. **Organic Biomolecular Chemistry**, **4**: 4005-4014.

MORRISSEY, S. P., LE PAGE, E., EDAN, G. 2005. Mitoxantrone in the treatment of multiple sclerosis. **The International Multiple Sclerosis Journal**, Worthing, **12**: p. 74-87.

NEUHAUS, O., KIESEIER, B. C., HARTUNG, H. P. 2004. Mechanisms of mitoxantrone in multiple sclerosis: what is known? **Journal of the Neurological Sciences**, **223**: 25-27.

NEUHAUS, O., KIESEIER, B.C., HARTUNG, H.P. 2006. Therapeutic role of mitoxantrone in multiple sclerosis. **Pharmacology & Therapeutics**, **109**: 198–209.

NEUHAUS, O.; ARCHELOS, J. J.; HARTUNG, H. P. 2003. Immunomodulation in multiple sclerosis: from immunosuppression to neuroprotection. **TRENDS in Pharmacological Sciences**, **24**: 131-138.

NIKODEMOVA, M., LEE, J., FABRY, Z., DUNCAN, I. D. 2010. Minocycline attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis in rats by reducing T cell infiltration into the spinal cord. **Journal of Neuroimmunology**, **219**: 33-37.

OH, S.J., CHUNG, D.H. 2011. Invariant NKT cells producing IL-4 or IL-10, but not IFN-gamma, inhibit the Th1 response in experimental autoimmune encephalomyelitis, whereas none of these cells inhibits the Th17 response. **Journal of Immunology** **186(12)**: 6815-21

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). 2008. Atlas Múltiplas Sclerose. Recursos in the World. **World Health Organization**, p 1-54.

PACHNER, A.R. 1997. Immunosuppressive therapy. Targeting the autoantigen in neurologic disease. **Advances in Neuroimmunology**, **4**:3- 10.

PAREKH, V.V., WU, L., OLIVARES-VILLAGÓMEZ, D., WILSON, K.T., VAN KAER, L. 2013. Activated invariant NKT cells control central nervous system autoimmunity in a mechanism that involves myeloid-derived suppressor cells. **Journal of Immunology**. **1**;190(5):1948-60.

PARK, H. et al. 2005. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. **Nature Immunology**, **6**: 1133-1141.

PATRIKIOS, P., STADELMANN, C., KUTZELNIGG, A., RAUSCHKA, H., SCHMIDBAUER, M., LAURSEN, H., SORENSEN, P.S., BRÜCK, W., LUCCHINETTI, C., LASSMANN, H. 2006. Remyelination is extensive in a subset of multiple sclerosis patients. **Brain**, **129** (Pt 12): 3165-72.

PELFREY, C. M. 2006. Immunological studies of mitoxantrone in primary progressive MS. **Journal of Neuroimmunology**, **175**: 192-199.

PERICOT, I.; MONTALBAN, X. 2003. Mitoxantrona. **Neurología**, **18**: 318-323.

PETERSON, L.K., FUJINAMI, R.S. 2007. Inflammation, demyelination, neurodegeneration and neuroprotection in the pathogenesis of multiple sclerosis. **Journal of Neuroimmunology**, **184(1-2)**:37-44.

PIAO, W. H. 2007. Therapeutic effect of anthracene-based anticancer agent ethonafide in an animal model of multiple sclerosis. **Journal of Immunology**, Bethesda, **179**: 7415-7423.

PÖLLINGER, B., KRISHNAMOORTHY, G., BERER, K., LASSMANN, H., BÖSL, M.R., DUNN, M., DOMINGUES, H.S., HOLZ, A., KURSCHUS, F.C. e WEKERLE, H. 2009. Spontaneous relapsing-remitting EAE in the SJL/J mouse: MOG-reactive transgenic T cells recruit endogenous MOG-specific B cells. **Journal of Experimental Medicine**, **206**: 1303-1316.

PUGLIATTI, M., SOTGIU, S., SOLINAS, G., CASTIGLIA, P., ROSATI, G. 2001. Multiple sclerosis prevalence among Sardinians: further evidence against the latitude gradient theory. **Neurological Sciences**, **22**:163–65.

QUINTANA, F. J.; WEINER, H. L. 2009. Environmental control of Th17 differentiation. **European Journal of Immunology, Weinheim**, **39**: 655-657.

RACKE, M.K., HU, W., LOVETT- RACKE, A. E. 2005. PTX Cruiser: Driving Autoimmunity via TLR4. **Trends Immunology**, **26 (2)**: 289-291.

RANSOHOFF, R.M., KIVISÄKK, P., KIDD, G. 2003. Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. **Nature Reviews Immunology**, **3(7)**: 569-81.

RAWJI, K.S., YONG, V.W. 2013. The benefits and detriments of macrophages/microglia in models of multiple sclerosis. **Clinical and Developmental Immunology**: 948-976.

REBOLDI, A. et al. 2009. C-C chemokine receptor 6–regulated entry of TH-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE. **Nature Immunology**, **10**: 514-523.

RÍO, J.; COMABELLA, M.; MONTALBAN, X. 2011. Multiple sclerosis: current treatment algorithms. **Current Opinion in Neurology**, **24(3)**: 230–7.

RIVERS, T.M., SPRUNT, D.H., BERRY, G.P. 1933. Observations on attempts to produce acute disseminated encephalomyelitis in monkeys. **The Journal of Experimental Medicine**, **58**: 39-53.

ROCK, R.B., GEKKER, G., HU, S., SHENG, W.S., CHEERAN, M., LOKENSGARD, J.R., PETERSON, P.K. 2004. Role of microglia in central nervous system infections. **Clin Microbiol Rev.** 17:942–964.

ROSTAMI, A., CIRICI, B. 2013. Role of Th17 cells in the pathogenesis of CNS inflammatory demyelination. **Journal of Neurological Sciences**, **333**: 76-87.

SAMOILOVA, E.B., HORTON, J.L., CHEN, Y. 1998. Acceleration of experimental autoimmune encephalomyelitis in interleukin-10- deficient mice: roles of interleukin-10 in disease progression and recovery. **Cellular Immunology**, **188**: 118-124.

SCOTT, L. J., FIGGITT, D. P. 2004. Mitoxantrone: a review of its use in multiple sclerosis. **CNS Drugs**, **18**: 379-396.

SMITH, I.E. 1983. Mitoxantrone (novantrone): a review of experimental and early clinical studies. **Cancer Treatment Review**; **10**: 103-115.

SORENSEN, T. L. et al. 1999. Expression of specific chemokines and chemokines receptors in the central nervous system of multiple sclerosis patients. **Journal of Clinical Investigation**, **103**: 807–815.

STEINMAN, L. 2013. A Tip leads cytotoxic T cells to the crime scene in neuroinflammation. **Nature Immunology**, **14**: 196-197.

SOSPEDRA, M.; MARTIN, R. 2005. Immunology of multiple sclerosis. **Annual Review of Immunology, Palo Alto**, **23**: 683-747.

THOUVERNOT, E., ORSINI, M., DAURES, J., CAMU, W. 2014. Vitamin D is associated with degree of disability in patients with fully ambulatory relapsing-remitting multiple sclerosis. **European Journal Neuroimmunology**.

VELDHOEN, M., HOCKING, R. J., ATKINS, C.J., LOCKSLEY, R. M., STOCKINGER, B. 2006. TGF beta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. **Immunity**, **24**: 179–189.

VILLARES, R., CADENAS, V., LOZANO, M. et al. 2009. CCR6 regulates EAE pathogenesis by controlling regulatory CD4+ T-cell recruitment to target tissues. **European Journal of Immunology**, **39**: 1671-1681.

WEINER, H.L. 2009. The challenge of multiple sclerosis: how do we cure a chronic heterogeneous disease? **Annals of Neurology**. **65 (3)**: 239-48.

WEINSTOCK-GUTTMAN, B., COHEN, J.A. 1996. Emerging therapies for multiple sclerosis. **Neurologist**. **2**: 342-55.

WEKERLE, H., KOJIMA, K., LANNES-VIEIRA, J., LASSMANN, H., LININGTON, C. 1994. Animal models. **Annals of Neurology**, **36** Suppl: S47-S53.

WLODARCZYK, A., LØBNER, M., CÉDILE, O., OWENS, T. 2014. Comparison of microglia and infiltrating CD11c+ cells as antigen presenting cells for T cell proliferation and cytokine response. **Journal of Neuroinflammation**, **11**: 57.

ZAGOTTO, G., SUPINO, R., FAVINI, E., MORO, S., PALUMBO, M. 2000. New 1,4-anthracene-9,10-dione derivatives as potential anticancer agents. **Farmaco**, **55**: 1–5.

ZHANG, Z., ZHANG, Z.Y., WU, Y., SCHLUESENER, H.J. 2012. Valproic acid ameliorates inflammation in experimental autoimmune encephalomyelitis rats. **Neuroscience**, **221**: 140-150.

YAMAZAKI, T., YANG, X. O., CHUNG, Y., FUKUNAGA, A., NURIEVA, R., PAPPU, B., MARTIN-OROZCO, N., KANG, H. S., MA, L., PANOPOULOS, A. D., CRAIG, S., WATOWICH, S. S., JETTEN, A. M., TIAN, Q., DONG, C. 2008. CCR6 Regulates the Migration of Inflammatory and Regulatory T Cells. **The Journal of Immunology**, **181** (12): 8391-8401.