

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Alyria Teixeira Dias

**AVALIAÇÃO DE DUAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE
GLICOPROTEÍNA MIELÍNICA DE OLIGODENDRÓCITOS NO
MODELO DE ENCEFALOMIELITE AUTOIMUNE EXPERIMENTAL**

JUIZ DE FORA

2012

ALYRIA TEIXEIRA DIAS

**AVALIAÇÃO DE DUAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE
GLICOPROTEÍNA MIELÍNICA DE OLIGODENDRÓCITOS NO
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 Doenças Infecto-Parasitárias.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Ferreira

JUIZ DE FORA

2012

Dias, Alyria Teixeira.

Avaliação de duas diferentes concentrações de glicoproteína miélica de oligodendrócitos no modelo de encefalomielite autoimune experimental / Alyria Teixeira Dias. – 2012.

111 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Imunologia e DIP/ Genética e Biotecnologia)—Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2012

1. Imunidade. 2. Esclerose Múltipla. I. Título.

CDU 57.083.3

ALYRIA TEIXEIRA DIAS

Avaliação de duas diferentes concentrações de glicoproteína mielínica de oligodendrócitos no modelo de encefalomielite autoimune experimental

Dissertação de Mestrado submetida à banca examinadora do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – ênfase em imunologia e doenças infecto-parasitárias, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 01 / 03 / 2012

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Ana Paula Ferreira

Orientadora

Universidade Federal de Juiz de Fora

Profa. Dra. Maria Aparecida de Souza

Universidade Federal de Uberlândia

Profa. Dra. Jacy Gameiro

Universidade Federal de Juiz de Fora

Dedico este trabalho ao meu pai

“O filho que encontra no lar uma escola de amor e trabalho, de disciplina e compreensão, jamais esquecerá as lições ali aprendidas. Além das palavras de orientação, é muito importante o exemplo da boa conduta. Por mais duros que sejam os embates da vida, ele saberá sempre escolher e trilhar os melhores caminhos, agradecendo aos pais, que souberam educá-lo com amor.”

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre entre nós.

Aos meus pais, que muitas vezes renunciaram a seus próprios sonhos, para que eu pudesse realizar os meus.

À minha família, o amor quando surge marca, mantém-se vivo e forte por toda à eternidade.

À querida Professora Ana Paula Ferreira, meu sincero e afetuoso muito obrigada.

À minha querida amiga Sandra, pela paciência, auxílio e amizade, dedicados nas horas mais aflitas.

Ao Caio, pela preciosa amizade e paciência em explicar a mesma coisa várias vezes. Obrigada por tudo.

À Nathália Visoná e Felipe Mesquita, meus “pupilos”. Tenho orgulho de vocês.

Aos queridos amigos, Patrícia, Marcilene, Luan e Thiago Amorim.

Aos professores e amigos do laboratório de imunologia da UFJF.

Aos pacientes portadores de esclerose múltipla, que contribuem participando de estudos que buscam compreender melhor esta patologia e desenvolver estratégias terapêuticas mais efetivas.

Ao CNPq, CAPES e FAPEMIG, pelo suporte financeiro.

A todos que de alguma forma tornaram este trabalho possível.

RESUMO

A esclerose múltipla (EM) é uma doença autoimune que acomete o sistema nervoso central (SNC) promovendo inflamação, desmielinização e subsequente comprometimento neurológico. A encefalomielite autoimune experimental (EAE) é o modelo animal mais amplamente utilizado para o estudo da EM, podendo ser induzida por uma grande diversidade de protocolos. Porém, o resultado da doença pode ser diferente em cada modelo, dependendo das características genéticas dos animais utilizados, da fonte e concentração do material antigênico e do modo de aplicação do antígeno, refletindo, em parte, a heterogeneidade encontrada nas diversas formas clínicas da EM. Portanto, devido à diversidade de modelos de indução de EAE, vários fatores relacionados à resposta imunológica, permanecem pouco conhecidos. O presente trabalho buscou avaliar a diferença entre duas concentrações antigênicas, utilizadas na indução, sobre o desenvolvimento clínico da EAE e em diversos parâmetros da resposta imunológica. Para isto, a EAE foi induzida em camundongos da linhagem C57BL/6, utilizando-se a glicoproteína mielínica de oligodendrócitos (MOG₃₅₋₅₅), em duas concentrações diferentes (100 ou 300 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅) e mantendo-se as concentrações de *Mycobacterium tuberculosis* (4 mg/mL) e toxina pertussis (300 ng) constantes. Foi então acompanhado o curso clínico da doença, nos dois protocolos utilizados, durante um período de 58 dias. Além disso, parâmetros da resposta imunológica, como avaliação do infiltrado celular no cérebro e dosagem de citocinas e quimiocinas no SNC e linfonodos inguinais foram acompanhados no 7º, 10º, 14º, 21º e 58º dias após a indução. Observou-se que embora não tenha ocorrido diferença significativa entre os grupos de animais imunizados em relação à pontuação do escore clínico, ocorreram diferenças importantes entre estes dois protocolos no que diz respeito ao perfil de citocinas, quimiocinas e infiltrado celular no cérebro. O aumento das citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas no SNC ocorreu de forma precoce no grupo imunizado com 100 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, que também exibiu infiltrado celular precoce e mais intenso do que o grupo imunizado com 300 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅. Além disso, o nível das quimiocinas CCL5 e CCL20 e das citocinas de perfil Th1 e Th17 foram, de forma geral, mais elevados no grupo imunizado com 100 µg do

peptídeo MOG₃₅₋₅₅. Os resultados sugerem que somente a variação na concentração antigênica do MOG₃₅₋₅₅, no momento da indução, não é capaz de induzir diferentes cursos clínicos de EAE e que a concentração mais elevada do antígeno (300 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅) parece promover algum mecanismo regulador ou de tolerância, que deve ser melhor estudado.

Palavras-chave: encefalomielite autoimune experimental; esclerose múltipla; MOG; autoimunidade.

ABSTRACT

Multiple sclerosis (MS) is an inflammatory autoimmune disease of central nervous system (CNS) that causes demyelination and neurological deficit. The experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) is the most common model for study this disease. The EAE can be induced by different protocols and the score of the disease is related to the genetic background of the animals, the concentration of antigen and the way of induction, reproducing the heterogeneity of the MS. Thus, due to the diversity of EAE induction, different factors related to immune response are still unclear. The aim of this study was evaluate the difference between two antigen concentrations in the development of EAE and the parameters of immune response. The EAE was induced in C57BL/6 female mice with the myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG₃₅₋₅₅) in two different concentrations (100 or 300µg of MOG₃₅₋₅₅), but keeping the same concentrations of Mycobacterium tuberculosis (4 mg/mL) and pertussis toxin (300 ng). The disease clinical signs were followed until the 58th day after induction in both protocols, and the immunological parameters, such as cellular infiltrate at brain and levels of cytokines and chemokines at CNS and lymph nodes, were evaluated at 7th, 10th, 14th, 21st and 58th days post induction. In relation to the clinical score, were not observed significant differences between the different protocols, however the cytokines, chemokines and cellular infiltrate profile at brain showed interesting results. The release of Th1 and Th17 cytokines and the CCL5 and CCL20 chemokines at CNS occurred early and more intense at 100µg MOG₃₅₋₅₅ group, in accordance with the earlier and intense cellular infiltrate than 300µg MOG₃₅₋₅₅ group. In conclusion, the results suggest that only the differences in the MOG₃₅₋₅₅ concentration at induction, is not capable of induce different clinical signs of EAE and that the 300 µg of MOG₃₅₋₅₅ seems to promote a regulatory or tolerance mechanism that deserves further studies.

Keywords: experimental autoimmune encephalomyelitis; multiple sclerosis; MOG; autoimmunity

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Padrões clínicos da EM	20
Figura 2 Média do escore clínico e massa corporal de camundongos C57BL/6 imunizados ou não com 100 µg do peptídeo MOG ₃₅₋₅₅	42
Figura 3 Análise histológica de cortes frontais do cérebro de camundongos C57BL/6 imunizados ou não com 100 µg do peptídeo MOG ₃₅₋₅₅ ,	44
Figura 4 Concentração das quimiocinas CCL5 e CCL20 no homogenato de cérebro de camundongos C57BL/6 imunizados ou não com 100 µg do peptídeo MOG ₃₅₋₅₅	46
Figura 5 Concentração das citocinas do perfil Th1 (IFN-γ, IL-12, TNF-α e IL-1β) no homogenato de cérebro de camundongos C57BL/6 imunizados ou não com 100 µg do peptídeo MOG ₃₅₋₅₅	48
Figura 6 Concentração das citocinas do perfil Th17 (IL-17A, IL-6 e TGF-β) no homogenato de cérebro de camundongos C57BL/6 imunizados ou não com 100 µg do peptídeo MOG ₃₅₋₅₅	49
Figura 7 Concentração da citocina IL-10 no homogenato de cérebro de camundongos C57BL/6 imunizados ou não com 100 µg do peptídeo MOG ₃₅₋₅₅	50
Figura 8 Concentração da citocina do perfil Th1 (IFN-γ) no homogenato de medula espinhal de camundongos C57BL/6 imunizados ou não com 100 µg do peptídeo MOG ₃₅₋₅₅	51
Figura 9 Concentração das citocinas do perfil Th17 (IL-17A, IL-6 e TGF-β) no homogenato de medula espinhal de camundongos C57BL/6 imunizados ou não com 100 µg do peptídeo MOG ₃₅₋₅₅	53
Figura 10 Concentração da citocina IL-10 no homogenato de medula espinhal de camundongos C57BL/6 imunizados ou não com 100 µg do peptídeo MOG ₃₅₋₅₅	54

Figura 11 Concentração das citocinas do perfil Th1 e Th17 (IFN- γ , IL-17A, IL-6 e TGF- β) no homogenato de linfonodos inguinais de camundongos C57BL/6 imunizados ou não com 100 μ g do peptídeo MOG ₃₅₋₅₅	56
Figura 12 Média do escore clínico e massa corporal de camundongos C57BL/6 imunizados ou não com 300 μ g do peptídeo MOG ₃₅₋₅₅	59
Figura 13 Análise histológica de cortes frontais do cérebro de camundongos C57BL/6 imunizados ou não com 300 μ g do peptídeo MOG ₃₅₋₅₅	61
Figura 14 Concentração das quimiocinas CCL5 e CCL20 no homogenato de cérebro de camundongos C57BL/6 imunizados ou não com 300 μ g do peptídeo MOG ₃₅₋₅₅	62
Figura 15 Concentração das citocinas do perfil Th1 (IFN- γ , IL-12, TNF- α e IL-1 β) no homogenato de cérebro de camundongos C57BL/6 imunizados ou não com 300 μ g do peptídeo MOG ₃₅₋₅₅	64
Figura 16 Concentração das citocinas do perfil Th17 (IL-17A, IL-6 e TGF- β) no homogenato de cérebro de camundongos C57BL/6 imunizados ou não com 300 μ g do peptídeo MOG ₃₅₋₅₅	65
Figura 17 Concentração da citocina IL-10 no homogenato de cérebro de camundongos C57BL/6 imunizados ou não com 300 μ g do peptídeo MOG ₃₅₋₅₅	66
Figura 18 Concentração da citocina do perfil Th1 (IFN- γ) no homogenato de medula espinhal de camundongos C57BL/6 imunizados ou não com 300 μ g do peptídeo MOG ₃₅₋₅₅	67
Figura 19 Concentração das citocinas do perfil Th17 (IL-17A, IL-6 e TGF- β) no homogenato de medula espinhal de camundongos C57BL/6 imunizados ou não com 300 μ g do peptídeo MOG ₃₅₋₅₅	69
Figura 20 Concentração da citocina IL-10 no homogenato de medula espinhal de camundongos C57BL/6 imunizados ou não com 300 μ g do peptídeo MOG ₃₅₋₅₅	70

Figura 21 Concentração das citocinas do perfil Th1 e Th17 (IFN- γ , IL-17A, IL-6 e TGF- β) no homogenato de linfonodos inguinais de camundongos C57BL/6 imunizados ou não com 300 μ g do peptídeo MOG ₃₅₋₅₅	72
Figura 22 Análise histológica de cortes frontais do cérebro de camundongos C57BL/6 não imunizados e imunizados com 100 ou 300 μ g do peptídeo MOG ₃₅₋₅₅	75
Figura 23 Concentração das quimiocinas CCL5 e CCL20 no homogenato de cérebro de camundongos C57BL/6 não imunizados e imunizados com 100 ou 300 μ g do peptídeo MOG ₃₅₋₅₅	77
Figura 24 Concentração das citocinas do perfil Th1 (IFN- γ , TNF- α e IL-1 β) no homogenato de cérebro e medula espinhal de camundongos C57BL/6 não imunizados e imunizados com 100 ou 300 μ g do peptídeo MOG ₃₅₋₅₅	79
Figura 25 Concentração das citocinas do perfil Th17 (IL-17A, IL-6 e TGF- β) no homogenato de cérebro e medula espinhal de camundongos C57BL/6 não imunizados e imunizados com 100 ou 300 μ g do peptídeo MOG ₃₅₋₅₅	81
Figura 26 Concentração da citocina IL-10 no homogenato de cérebro e medula espinhal de camundongos C57BL/6 não imunizados e imunizados com 100 ou 300 μ g do peptídeo MOG ₃₅₋₅₅	83
Figura 27 Concentração das citocinas do perfil Th1 e Th17 (IFN- γ , IL-17A, IL-6 e TGF- β) no homogenato de linfonodos inguinais de camundongos C57BL/6 não imunizados e imunizados com 100 ou 300 μ g do peptídeo MOG ₃₅₋₅₅	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Fenótipos clínicos de modelos de EAE	24
Tabela 2 Distribuição dos animais em grupos	34
Tabela 3 Escala neurológica clínica para avaliar a EAE	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CFA	adjuvante completo de Freund
d.p.i.	Dia pós-indução
EDSS	Escala Expandida do Estado de Incapacidade de Kurtzke
ELISA	Enzima imunoensaio
H&E	Hematoxilina-eosina
i.p.	Intraperitoneal
MOG	Glicoproteína Mielínica de Oligodendrócitos
PBS	Salina tamponada com fosfato
PBM	Proteína Básica da Mielina
PLP	Proteína Proteolípídica da Mielina
RR	Remitente-recorrente
s.c.	Subcutânea
TMEV-IDD	Doença desmielinizante induzida por vírus

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 ESCLEROSE MÚLTIPLA	19
2.2 ENCEFALOMIELTE AUTOIMUNE EXPERIMENTAL (EAE)	23
2.3 A RESPOSTA IMUNOLÓGICA NA EAE	26
3 OBJETIVOS	30
3.1 OBJETIVO GERAL	31
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
4 MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1 ANIMAIS	33
4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	33
4.3 AVALIAÇÃO DO ESCORE CLÍNICO E MASSA CORPORAL	35
4.4 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS E OBTENÇÃO DOS ÓRGÃOS E CÉLULAS	36
4.5 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS E QUIMIOCIAS POR ELISA	36
4.6 AVALIAÇÃO HISTOTOLÓGICA	37
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
RESULTADOS	39
PARTE I: CINÉTICA DA EAE NO PROTOCOLO DE INDUÇÃO COM 100 µg DO PEPTÍDEO MOG ₃₅₋₅₅	40
5.1 AVALIAÇÃO DO ESCORE CLÍNICO E MASSA CORPORAL	41

5.2 ANÁLISE HISTOLÓGICA DO CÉREBRO	43
5.3 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DAS QUIMIOCINAS CCL5 E CCL20 EM HOMOGENATO DE CÉREBRO	45
5.4 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DAS CITOCINAS IFN- γ , IL-12, TNF- α e IL-1 β EM HOMOGENATO DE CÉREBRO	46
5.5 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DAS CITOCINAS IL-17A, IL-6 e TGF- β EM HOMOGENATO DE CÉREBRO	48
5.6 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DA CITOCINA IL-10 EM HOMOGENATO DE CÉREBRO	50
5.7 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DA CITOCINA IFN- γ EM HOMOGENATO DE MEDULA ESPINHAL	51
5.8 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DAS CITOCINAS IL-17A, IL-6 e TGF- β EM HOMOGENATO DE MEDULA ESPINHAL	52
5.9 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DA CITOCINA IL-10 EM HOMOGENATO DE MEDULA ESPINHAL	54
5.10 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DAS CITOCINAS IFN- γ , IL-17A, IL-6 e TGF- β EM HOMOGENATO DE LINFONODOS INGUINAIS	55
PARTE II: CINÉTICA DA EAE NO PROTOCOLO DE INDUÇÃO COM 300 μ g DO PEPTÍDEO MOG ₃₅₋₅₅	57
5.11 AVALIAÇÃO DO SCORE CLÍNICO E MASSA CORPORAL ...	58
5.12 ANÁLISE HISTOLÓGICA DO CÉREBRO	60
5.13 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DAS QUIMIOCINAS CCL5 E CCL20 EM HOMOGENATO DE CÉREBRO	62
5.14 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DAS CITOCINAS IFN- γ , IL-12, TNF- α e IL-1 β EM HOMOGENATO DE CÉREBRO	63
5.15 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DAS CITOCINAS IL-17A, IL-6 e TGF- β EM HOMOGENATO DE CÉREBRO	64

5.16 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DA CITOCINA IL-10 EM HOMOGENATO DE CÉREBRO	66
5.17 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DA CITOCINA IFN- γ EM HOMOGENATO DE MEDULA ESPINHAL	67
5.18 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DAS CITOCINAS IL-17A, IL-6 e TGF- β EM HOMOGENATO DE MEDULA ESPINHAL	68
5.19 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DA CITOCINA IL-10 EM HOMOGENATO DE MEDULA ESPINHAL	70
5.20 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DAS CITOCINAS IFN- γ , IL-17A, IL-6 e TGF- β EM HOMOGENATO DE LINFONODOS INGUINAIS	71
PARTE III: COMPARAÇÃO ENTRE OS PROTOCOLOS DE INDUÇÃO DE EAE COM 100 OU 300 μ g DO PEPTÍDEO MOG ₃₅₋₅₅	73
5.21 COMPARAÇÃO DA ANÁLISE HISTOLÓGICA DO CÉREBRO ..	74
5.22 COMPARAÇÃO DOS NÍVEIS DAS QUIMIOKINAS CCL5 E CCL20 EM HOMOGENATO DE CÉREBRO	76
5.23 COMPARAÇÃO DOS NÍVEIS DAS CITOCINAS IFN- γ , TNF- α e IL-1 β EM HOMOGENATO DE CÉREBRO E MEDULA ESPINHAL ..	77
5.24 COMPARAÇÃO DOS NÍVEIS DAS CITOCINAS IL-17A, IL-6 e TGF- β EM HOMOGENATO DE CÉREBRO E MEDULA ESPINHAL	80
5.25 COMPARAÇÃO DOS NÍVEIS DA CITOCINA IL-10 EM HOMOGENATO DE CÉREBRO E MEDULA ESPINHAL	82
5.26 COMPARAÇÃO DOS NÍVEIS DAS CITOCINAS IFN- γ , IL-17A, IL-6 e TGF- β EM HOMOGENATO DE LINFONODOS INGUINAIS ...	83
6 DISCUSSÃO	85
7 CONCLUSÃO	95
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97

1 INTRODUÇÃO

A esclerose múltipla (EM) é uma doença inflamatória crônica do sistema nervoso central (SNC), caracterizada por destruição da bainha de mielina, perda de oligodendrócitos e de axônios (BRUCK, 1996; KERSCHENSTEINER et al., 2004). A encefalomielite autoimune experimental (EAE) é o modelo animal mais amplamente utilizado para o estudo da EM e caracteriza-se por um distúrbio inflamatório do SNC, induzido em animais de laboratório, após a sensibilização com antígenos da mielina (GENAIN et al., 1999; COSTA et al., 2003).

A EAE pode ser induzida por uma grande variedade de protocolos, sendo que a indução clássica pode ser ativa ou passiva. A forma ativa baseia-se na imunização de animais com doses de proteína básica de mielina (PBM), proteína proteolípídica de mielina (PLP) ou glicoproteína mielínica de oligodendrócitos (MOG), emulsificadas ou não em adjuvante, contendo *Mycobacterium tuberculosis*, cepa H37RA, seguido por administração de toxina pertussis (KUERTEN et al., 2010; NÚÑEZ-IGLESIAS et al., 2010; SMOLIANOV et al., 2011; MUILI et al., 2012). Já a forma passiva é a transferência adotiva de células T encefalitogênicas de animais sensibilizados para animais saudáveis (RAO e SEGAL, 2004).

Esta grande diversidade de protocolos de indução de EAE ocorre em virtude da complexidade de mecanismos patogênicos envolvidos na EM, o que torna improvável que esta patologia possa ser reproduzida em um modelo de doença único. O que os estudos realizados até o momento mostram é que as formas clínicas da EAE podem variar de acordo com o protocolo de indução utilizado (revisto por WEINER, 2009). Portanto, o conhecimento dos mecanismos imunológicos envolvidos em cada um dos protocolos de indução da EAE e a comparação entre eles poderia possibilitar um melhor entendimento do desenvolvimento da EAE e conseqüentemente da EM.

Desta forma, este estudo tem por objetivo avaliar a influência da concentração do antígeno sobre o curso clínico e sobre diferentes parâmetros da resposta imunológica na EAE em camundongos da linhagem C57BL/6, utilizando o mesmo antígeno de mielina, glicoproteína mielínica de oligodendrócitos, em duas concentrações diferentes (100 ou 300 µg de peptídeo MOG₃₅₋₅₅) e mantendo-se as concentrações de *M. tuberculosis* (4 mg/mL) e toxina pertussis (300 ng) constantes.

**2 REVISÃO
BIBLIOGRÁFICA**

2.1 ESCLEROSE MÚLTIPLA

A esclerose múltipla é uma doença mediada por processos imunológicos que afeta o sistema nervoso central, sendo caracterizada por desmielinização, lesão axonal e subsequente comprometimento neurológico (SOSPEDRA e MARTIN, 2005). Esta doença acomete mais de 1,3 milhões de pessoas em todo o mundo (DUA e ROMANI, 2008) e se manifesta por uma série de surtos que normalmente envolvem falta de coordenação motora, perda de equilíbrio, fraqueza muscular e distúrbios visuais, alternados por períodos de remissão parcial ou completa dos sintomas, frequentemente seguidos por uma fase de progressão crônica (MILLER et al., 2008).

As primeiras manifestações clínicas ocorrem geralmente em adultos jovens, na faixa etária compreendida entre os 25 e 30 anos de idade e afeta principalmente as mulheres (CZLONKOWSKA et al., 2005; MILO e KAHANA, 2010). A etiologia da EM não está totalmente determinada, acredita-se que a existência de um fator extrínseco, tal como uma infecção, associado a um fator genético de suscetibilidade, desencadearia o aparecimento dos sinais clínicos da doença (revisto por HAFLER, 1999; VON HERRATH, FUJINAMI e WHITTON, 2003).

O surto é um evento marcante na clínica da EM e útil para o diagnóstico, sendo caracterizado por uma exacerbação de sinais, resultantes de um processo inflamatório agudo desmielinizante no SNC (POLMAN et al., 2011). A remissão completa após o surto pode ocorrer, mas sinais residuais persistem em até 40% dos eventos (LUBLIN, BAIER e CUTTER, 2003). Sintomas iniciais mais graves, recuperação incompleta do primeiro surto e um curto intervalo entre o primeiro e o segundo surtos são alguns parâmetros clínicos que podem ser correlacionados com um pior prognóstico da doença (MOWRY et al., 2009).

A Escala Expandida do Estado de Incapacidade de Kurtzke (EDSS) é um método utilizado para quantificar as incapacidades ocorridas durante a evolução clínica da EM ao longo do tempo e avalia funções piramidais, cerebelares, do tronco cerebral, sensitivas, vesicais, intestinais, visuais e mentais (KURTZKE, 1983). A figura 1 apresenta as quatro formas clínicas da EM no gráfico obtido pela medida de escore segundo a escala EDSS, demonstrando as consequências na progressão da

doença após os surtos e caracterizando as formas clínicas, sendo que a inclinação do gráfico para a direita indica a piora do escore.

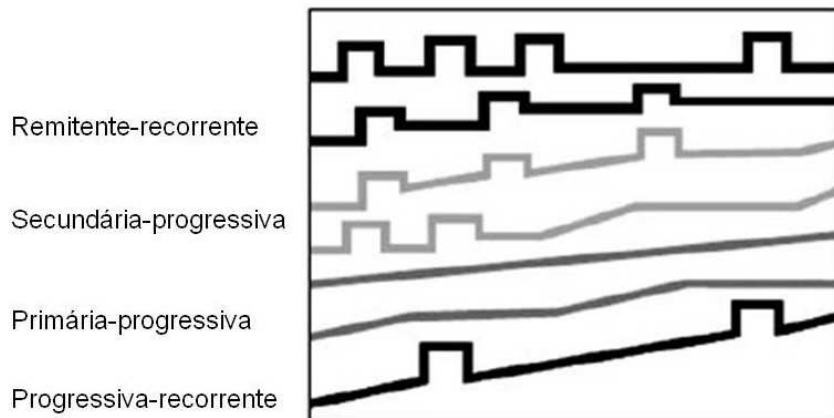


Figura 1: Padrões clínicos da EM (Adaptado: LUBLIN et al., 2007)

A maioria dos pacientes com EM apresenta uma fase inicial da doença caracterizada por surtos e remissões que é denominada forma remitente-recorrente (RR), na qual podem ser observados surtos claramente definidos, com uma completa recuperação ou com sequelas e déficit residual após a recuperação. Nesta forma clínica, os períodos entre os surtos são caracterizados por ausência de progressão da doença. A maioria dos pacientes que apresentam a forma RR evoluem para a forma secundária progressiva (SP), na qual ocorre a progressão da doença, com ou sem surtos, pequenas remissões e platôs (WEINSHENKER et al., 1989).

A forma primária progressiva (PP) é caracterizada por progressão desde o início da doença, com ocasionais platôs e pequenas melhoras temporárias. Pacientes com a forma PP apresentam gradual e contínuo agravamento da sua condição, mas sem recaídas claras. A forma progressiva recorrente (PR), na qual não há progressão da doença desde o início, apresenta recaídas agudas claras, com ou sem plena recuperação e com períodos entre os surtos mostrando progressão contínua (LUBLIN et al., 2007).

A relação entre os surtos sucessivos, o início da progressão secundária e a incapacidade crescente são altamente relevantes para a prática clínica. Sendo a supressão dos surtos, um parâmetro importante para avaliar a eficácia do tratamento da EM, pois os danos acumulados durante estas etapas de exacerbação da doença promovem uma piora generalizada dos sinais clínicos do paciente (WINGERCHUK et al., 1999).

A inflamação do SNC, característica da esclerose múltipla, é mediada pela ação de linfócitos. As células de perfil Th1 e a citocina IFN- γ foram inicialmente caracterizadas como responsáveis por promover o desenvolvimento da EM (OLSSON et al., 1990; VOSKUHL et al., 1993). Posteriormente, foi atribuído às células Th17, produtoras de IL-17, um papel importante na indução de doenças autoimunes, incluindo a EM (ISHIZU et al., 2005; ANNUNZIATO et al., 2007; TZARTOS et al., 2008).

Foi observado que tanto as células Th1, quanto as células Th17 são capazes de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) e promover inflamação no SNC. No entanto, um estudo no qual foi utilizado um modelo *in vitro* de BHE, produzida a partir de células endoteliais microvasculares de cérebro humano, mostrou que células Th17 migram mais avidamente através da barreira do que as células Th1 (KEBIR et al., 2009). Além disso, Edwards e colaboradores (2011) mostraram que as células de perfil Th17 e de perfil Th17/Th1 são encontradas em maior frequência no sangue periférico de pacientes com EM na fase de recaídas, quando comparado a pacientes na fase de remissão ou pacientes saudáveis, reforçando a importância destas células na patogênese da doença.

Alguns estudos mostraram que o perfil de citocinas no líquido cefalorraquidiano de pacientes com EM durante os surtos se caracteriza pelo aumento de TNF- α , IL-1 β e IL-12, além de diminuição de IL-10 (HAUSER et al., 1990; TSUKADA et al., 1991; CARRIERI et al., 1992; CARRIERI et al., 1998; BARTOSIK-PSUJEK e STELMASIAK, 2006). Além disso, níveis elevados de TNF- α foram observados no líquido cefalorraquidiano de pacientes com esclerose múltipla crônico-progressiva, quando comparado aos níveis de pacientes com esclerose múltipla estável, sugerindo papel importante do TNF- α na progressão da doença (SHARIEF et al., 1991).

Apesar dos avanços no conhecimento da imunopatologia e no desenvolvimento de terapias para o tratamento da EM, as drogas atualmente utilizadas são parcialmente eficazes. O que se observa é que com a utilização da terapia a maioria dos pacientes apresenta apenas redução da atividade da doença, mas ainda enfrentam surtos, incapacidade crescente e novas lesões cerebrais (revisto por HAVLA et al., 2011). Outra questão a ser observada é o problema da transferência de terapias que foram eficientes em modelos experimentais de estudo da EM, mas que falharam quando aplicadas a pacientes, tal como o anticorpo monoclonal anti-CD40L, que poderia ser responsável pela elevada incidência de complicações tromboembólicas após a sua administração (KAWAI et al., 2000) e o ustekinumab, o anticorpo monoclonal anti-IL-12/23p40, que não inibiu a formação de lesões inflamatórias na substância branca do SNC e também não inibiu as manifestações clínicas em pacientes com EM remitente-recorrente (SEGAL et al., 2008).

Além das falhas envolvidas na transferência de terapias estudadas em animais e aplicadas em humanos, existem muitas restrições em relação à interpretação de estudos realizados em modelos experimentais e como podem ser extrapolados para a EM, uma vez que experimentos em modelos animais refletem apenas aspectos simplificados da doença humana (revisto por HART, GRAN e WEISSERT, 2011). Desta forma, o estudo e a comparação de diferentes protocolos de indução de modelos experimentais de estudo da EM, poderia favorecer uma melhor compreensão do complexo processo inflamatório gerado no SNC durante a doença, o que melhoraria o desenvolvimento de novas terapias para a EM.

2.2 ENCEFALOMIELEITE AUTOIMUNE EXPERIMENTAL (EAE)

A encefalomielite autoimune experimental é uma doença inflamatória do sistema nervoso central, com graus variáveis de desmielinização, que pode ser induzida por imunização de animais suscetíveis com antígenos da mielina e adjuvante de Freund, sendo capaz de reproduzir várias características da esclerose múltipla (WEKERLE et al., 1994). Este modelo experimental foi desenvolvido por Rivers e colaboradores (1993), ao tentarem elucidar a etiologia de complicações neurológicas que se seguiram à vacinação anti-rábica e inspirados por descobertas anteriores sobre paralisias fatais que ocorreram após o tratamento anti-rábico.

Inicialmente, a doença inflamatória desmielinizante foi induzida em macacos rhesus imunizados com emulsões de cérebros de coelhos, sendo que infiltrado perivascular e destruição da mielina foram encontrados no cérebro e medula espinhal de 6 dos 8 macacos tratados (RIVERS e SCHWENTKER, 1935). Posteriormente, a indução de EAE foi realizada pelo uso de adjuvantes adicionados a emulsões de cérebro, homogeneizado de medula espinhal, preparações de mielina ou proteínas purificadas de mielina (KABAT, WOLF e BEZER, 1946). Após estes experimentos iniciais, a EAE passou a ser induzida em uma variedade de espécies de mamíferos, incluindo camundongos, ratos, cobaias, coelhos, cabras, ovelhas e primatas (revisto por BAXTER, 2007). Em 1947, um grupo de pesquisadores documentou a semelhança da EAE com doenças desmielinizantes humanas (WOLF, KABAT e BEZER, 1947).

Atualmente, a forma mais comum de indução é a EAE ativa, induzida pela injeção subcutânea de um peptídeo encefalitogênico, tal como, a proteína básica de mielina, a proteína proteolipídica de mielina ou a glicoproteína mielínica de oligodendrócitos, emulsificadas ou não em adjuvante completo de Freund (CFA), contendo *M. tuberculosis*, cepa H37RA, seguido por injeção intraperitoneal de toxina pertussis. Outra forma de indução de EAE é a transferência adotiva de linfócitos CD4⁺ Th1 reativos para a mielina, por via intravenosa, para animais saudáveis (revisto por MIX, MEYER-RIENECKER e ZETTL, 2008).

A EAE tem sido utilizada para o estudo da imunobiologia da EM e também para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas. Várias terapias foram inicialmente estudadas na EAE, para posteriormente serem aplicadas na EM (revisto

por BAXTER, 2007; DENIC et al., 2011). Contudo, a ineficácia de numerosas abordagens terapêuticas que mostraram resultados promissores neste modelo animal, mas falharam quando aplicadas à EM, ressaltou a importância de melhor compreender os mecanismos envolvidos no desenvolvimento destas patologias.

Até hoje não existe um modelo animal único que possa representar toda a heterogeneidade envolvida na fisiopatologia e clínica da EM humana. No entanto, ao longo das últimas décadas, diversos modelos animais foram desenvolvidos para representar determinados aspectos da doença humana (SRIRAM e STEINER, 2005; MIX, MEYER-RIENECKER e ZETTL, 2008; WEINER, 2009). (Tabela 1).

Tabela 1: Fenótipos clínicos de modelos de EAE (Adaptado: WEINER, 2009)

Linhagem animal	Indução	Curso clínico
C57BL/6	MOG	Remitente-recorrente
SJL/J	PLP	Remitente-recorrente
NOD	MOG	Crônico-progressiva
MOG TCR Tg X MOG BCR Tg	MOG	Doença de Devic's disease (Krishnamoorthy et al., 2006)
MOG TCR Tg (SJL/J)	MOG	Remitente-recorrente (Pollinger et al., 2009)
C57BL/6	Monócitos	Progressiva
SJL/J	Vírus Theiler's	Progressiva-recorrente
Ratos Lewis	PBM	Aguda recorrente ADEM

Desde o estabelecimento do modelo experimental por Rivers e colaboradores em 1930, pesquisadores vêm buscando variações de EAE que incluem modelos de neurite óptica (BETTELLI et al., 2003), formas remitente-recorrente (LUBLIN et al., 1981) e progressivas da doença (ZAMVIL et al., 1985). Foi desenvolvido, por exemplo, um modelo murino de EAE com o gene que codifica o antígeno leucocitário humano (HLA) DR2, associado à suscetibilidade a EM (MADSEN et al., 1999). Em outro trabalho foi criada uma forma de EAE em sagüis,

que reflete com fidelidade aspectos essenciais da EM (revisto por GENAIN e HAUSER, 2001).

Begolka e colaboradores (1998) trabalharam com dois modelos distintos de indução de EAE. Camundongos da linhagem SJL/J foram induzidos a desenvolver doença desmielinizante crônico-progressiva, por vírus (TMEV-IDD) ou foram imunizados com PLP₁₃₉₋₁₅₁, proteína que induz a forma remitente-recorrente de EAE. Camundongos infectados com vírus, expressaram RNAm para IFN- γ e TNF- α durante a fase pré-clínica e os seus níveis continuaram a aumentar ao longo do curso da doença. Além de apresentarem continuamente células T CD4⁺ e macrófagos F4/80⁺ no infiltrado celular do SNC. Em contraste, camundongos SJL/J imunizados com PLP₁₃₉₋₁₅₁, exibiram um padrão bifásico de expressão das citocinas pró-inflamatórias IFN- γ e TNF- α no SNC, com expressão atingindo um valor máximo durante a fase aguda e durante os surtos, sendo este padrão correlacionado com mudanças dinâmicas nas células T CD4⁺ e populações de macrófagos F4/80⁺. Os pesquisadores sugeriram que a cinética da expressão de citocinas e a natureza do infiltrado inflamatório contribuem para as diferenças de curso clínico entre TMEV-IDD e EAE remitente-recorrente induzida por PLP₁₃₉₋₁₅₁.

Recentemente, um grupo de pesquisadores buscou variar seus protocolos de indução para estabelecer as formas RR e crônica de EAE, através da variação da quantidade de antígeno, de adjuvantes e toxina utilizados na indução em camundongos da linhagem C57BL/6. Utilizando dois protocolos distintos de indução, estes pesquisadores obtiveram modelos que apresentaram cursos clínicos diferentes e que se aproximaram das formas RR e crônica da EAE (BERARD et al., 2010).

A partir das observações realizadas nos diversos estudos que envolvem protocolos diferenciados de indução da EAE constatou-se que a seleção do modelo animal apropriado permitiria a compreensão de dados que possam ser aplicáveis às diferentes formas clínicas de EM. O que os estudos constataram é que o curso clínico e a histopatologia da EAE podem variar significativamente, dependendo da característica genética dos animais utilizados, da fonte e concentração de material antigênico e do modo de aplicação do antígeno, refletindo, em parte, a heterogeneidade encontrada na EM (MIX, MEYER-RIENECKER e ZETTL, 2008; WEINER, 2009).

2.3 A RESPOSTA IMUNOLÓGICA NA EAE

A encefalomielite autoimune experimental é um protótipo de doença autoimune mediada por células T. Alguns estudos sugeriram que as células Th1 produtoras de IFN- γ seriam iniciadores essenciais do desenvolvimento da EAE (SEGAL, 2003), sendo a diferenciação de células T *naive* para o perfil de células Th1 efetoras mediado pela produção de IL-12 por células dendríticas (MACATONIA et al., 1995).

Posteriormente, foi identificado outro perfil celular denominado Th17. As células Th17 são geradas a partir de células T *naive* por estímulo de TGF- β e IL-6 e são expandidas pela IL-23 (BETTELLI et al., 2006; VELDHONEN et al., 2006). As células Th17 específicas para os auto-antígenos são capazes de atravessar a barreira hematoencefálica e induzir EAE. Sabe-se que a inflamação induzida por este perfil celular no SNC é caracterizada pelo recrutamento de neutrófilos (KROENKE et al., 2008) e pela morte de neurônios (KEBIR et al., 2007).

Apesar do infiltrado celular no parênquima do SNC por células T CD4⁺ Th1 e Th17 ser necessário para o desenvolvimento de lesões na EAE, macrófagos infiltrantes e a microglia residente no SNC, também desempenham importante papel efetor nesta patologia, promovendo desmielinização e morte de oligodendrócitos, o que resulta em perda da função axonal (BAUER et al., 1995).

A ativação da microglia e de macrófagos durante a doença no SNC leva à produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , TNF- α e IL-6, bem como quimiocinas, que contribuem para a inflamação e danos à mielina (BENVENISTE, 1997). IL-1 β , juntamente com a IL-23, desempenha um papel crucial na expansão de células Th17 de memória (SUTTON et al., 2006), produção de IL-17 por células T $\gamma\delta$ (SUTTON et al., 2009) e pode causar o rompimento da barreira hematoencefálica, ativação da microglia e desmielinização (FERRARI et al., 2004).

A produção de TNF- α no SNC induz inflamação através do aumento da apresentação de antígenos, da proliferação de astrócitos e da alteração da expressão de moléculas de adesão e quimiocinas, contribuindo para regular o tráfego de células para o SNC (SEDGWICK et al., 2000; SELMAJ, 2000). Em adição, a IL-6 aumenta a expressão de genes que codificam fatores pró-inflamatórios e ativa

astroglíose e microglíose (QUINTANA et al., 2009), sendo ainda necessária para a indução de moléculas de adesão, como VCAM-1, nos vasos sanguíneos do cérebro, que são essenciais para o tráfego de leucócitos para o SNC durante a EAE (EUGSTER et al., 1998).

Além disso, foi demonstrado que a redução da expressão de TNF- α e de IL-6 no SNC está associada à apresentação clínica atenuada de EAE (PENKOWA e HIDALGO, 2001), confirmando a importância dessas citocinas na patologia do SNC. Recentemente, estão sendo propostas novas subpopulações de células Th17, classificadas como patogênica e reguladora: a Th17 patogênica é caracterizada pela produção de IL-17, IL-22 e IFN- γ , enquanto a Th17 reguladora produz IL-17 e IL-10. Neste caso, a IL-10 produzida é responsável pela regulação da EAE, melhorando os sinais clínicos da doença (McGEACHY et al., 2007; IMLER e PETRO Jr, 2009).

No modelo de EAE, o início da inflamação no SNC envolve células T específicas para a mielina, que são ativadas nos linfonodos periféricos e posteriormente migram para o SNC para serem reapresentadas aos antígenos da mielina, por células apresentadoras de antígeno (ENGELHARDT e RANSOHOFF, 2005; REBOLDI, et al., 2009). O acesso de linfócitos T ao SNC pode ocorrer através do plexo coróide para o espaço subaracnóide, que contém o líquido cefalorraquidiano ou ocorrer a partir do sangue, diretamente para o parênquima cerebral através da barreira hematoencefálica, via espaço perivascular (KIVISAKK et al., 2003; ENGELHARDT e RANSOHOFF, 2005; KIVISAKK et al., 2006).

Os determinantes moleculares que controlam este passo inicial de migração celular para o SNC envolvem integrinas e moléculas de adesão que permitem adesão e rolamento das células T através das paredes dos vasos (PICCIO et al., 2002). Além disso, há a ação de quimiocinas, que são potentes citocinas com atividade quimiotática, produzidas localmente e que a partir de sua interação com o seu receptor na superfície celular promovem o direcionamento da migração e a chegada de leucócitos e outras células para o sítio inflamatório (McQUIBBAN et al., 2002; BELMADANI et al., 2006).

Os leucócitos expressam uma variedade de receptores de quimiocinas inflamatórias, mais consistentemente CCR1, CCR2 e CCR5 que têm sido identificados em diversos tecidos e fluidos inflamatórios, tanto de lesões cerebrais na EM (BALASHOV et al., 1999), quanto em modelos de doenças neurológicas,

incluindo a EAE (ROTTMAN et al., 2000). A migração inicial de células Th17 para o cérebro parece estar relacionada com o receptor de quimiocina CCR6, constitutivamente expresso por células Th17, que encontra o seu ligante CCL20 em células epiteliais do plexo coróide e regula a entrada destes linfócitos no SNC (REBOLDI, 2009).

A expressão de CCR1 e seus ligantes CCL3, CCL5 e CCL7 já foi demonstrada em lesões cerebrais inflamatórias (MAHAD et al., 2004). A quimiocina CCL5 é produzida por linfócitos T, células endoteliais e eosinófilos e é atrativa para monócitos, macrófagos e células T (ZLOTNIK e YOSHIE, 2000). Além disso, a redução de CCL5 pode estar relacionada a uma baixa migração de células Th1 para o SNC e também pode ser associada com a melhora dos sinais clínicos da EAE (GLABINSKI et al., 2002; JALOSINSKI et al., 2008).

A EAE pode seguir um curso remitente-recorrente ou crônico, com características que poderiam se aproximar das formas RR e progressivas da EM, porém, os modelos experimentais utilizam animais de linhagens genéticas distintas ou diferentes antígenos e concentrações para a indução, o que dificulta a comparação e compreensão dos mecanismos moleculares responsáveis pela diferença entre estas duas formas de evolução clínica da doença.

Para minimizar a influência dessas variantes e permitir a melhor compreensão das diferenças entre as formas RR e crônica da EAE, um grupo de pesquisadores simulou estas duas formas clínicas na linhagem de camundongos C57BL/6, utilizando para a indução o mesmo antígeno de mielina (MOG₃₅₋₅₅), em duas concentrações diferentes (50 ou 300 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅) e variando também as concentrações de *M. tuberculosis* (1 ou 4 mg/mL) e toxina pertussis (200 ou 300 ng). Eles observaram que há diferenças importantes entre estes dois modelos no que diz respeito ao curso clínico da EAE, sendo que a menor concentração de antígeno e adjuvantes foi capaz de induzir a forma RR da EAE, enquanto as concentrações elevadas resultaram no desenvolvimento da forma crônica. Além disso, observaram diferenças em relação à progressão e composição celular nas lesões inflamatórias, ao perfil de citocinas, bem como na extensão e duração da desmielinização e perda axonal no SNC, entre os dois protocolos de indução utilizados (BERARD et al., 2010).

Porém, o trabalho de Berard e colaboradores (2010) não avaliou separadamente os componentes utilizados na emulsão e, até o momento, não existe

nenhum trabalho que esclareça qual seria o principal fator responsável pelas diferenças no desenvolvimento da EAE, ou seja, a concentração do antígeno (MOG₃₅₋₅₅), do *M. tuberculosis* e/ou da toxina pertussis.

Neste estudo, objetivou-se avaliar somente a importância da concentração antigênica utilizada no momento da indução, sobre o desenvolvimento clínico da EAE e de diversos parâmetros da resposta imunológica. Utilizamos dois protocolos distintos de indução em camundongos da linhagem C57BL/6, utilizando o mesmo antígeno de mielina em duas concentrações diferentes (100 ou 300 µg de peptídeo MOG₃₅₋₅₅) e mantendo-se as concentrações de *M. tuberculosis* (4 mg/mL) e toxina pertussis (300 ng) constantes.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar parâmetros clínicos, histológicos e imunológicos durante o desenvolvimento do modelo de encefalomielite autoimune experimental, induzido por duas diferentes concentrações do peptídeo MOG₃₅₋₅₅.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Acompanhar o escore clínico e a massa corporal dos animais induzidos com EAE, utilizando 100 ou 300 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅ para a indução;
- Avaliar o infiltrado celular no cérebro dos animais imunizados com 100 ou 300 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅ nos dias 7, 10, 14, 21 e 58 após a indução da EAE;
- Quantificar os níveis de quimiocinas (CCL5 e CCL20) no homogenado de cérebro dos animais imunizados com 100 ou 300 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅ nos dias 7, 10, 14, 21 e 58 após a indução da EAE;
- Quantificar os níveis de citocinas de perfil Th1 (IFN- γ e IL-12), Th17 (IL-17, IL-6 e TGF- β), pró-inflamatório (IL-1 β e TNF- α) e regulador (IL-10 e TGF- β) no homogenato de cérebro, medula espinhal e linfonodos inguinais dos animais imunizados com 100 ou 300 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅ nos dias 7, 10, 14, 21 e 58 após a indução da EAE.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Para a indução da EAE foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6, fêmeas, com 6-8 semanas de idade, provenientes do Biotério do Centro de Biologia da Reprodução (CBR) da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF). Os animais foram mantidos no setor de experimentação do Laboratório de Imunologia do ICB/UFJF, acondicionados em estantes ventiladas e receberam ração e água *ad libitum*. Todos os experimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos postulados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Animais da UFJF (protocolo nº 07/2011).

4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os animais foram imunizados por via subcutânea (s.c.), em ambos os lados da base da cauda, com emulsão contendo 100 ou 300 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅/animal (o peptídeo MOG₃₅₋₅₅ foi sintetizado pela professora Dra. Maria Aparecida Juliano do Departamento de Biofísica, da Universidade Federal de São Paulo) e adjuvante completo de Freund (CFA) suplementado com 4 mg/mL de *M. tuberculosis* (H37RA; Difco Laboratories, Detroit, MI). No dia da imunização e 48 horas após, os animais receberam 300 ng de toxina pertussis (Islet – Activating Protein; List Biologic Laboratories, INC., Campbell, CA) por via intraperitoneal (i.p.). Os camundongos foram divididos em três grupos experimentais avaliados em cinco pontos distintos 7, 10, 14, 21 e 58 dias pós-indução (Tabela 2):

- a) grupo controle (não imunizado);
- b) grupo imunizado com 100 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅ + CFA + *M. tuberculosis* (4mg/mL);
- c) grupo imunizado com 300 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅ + CFA + *M. tuberculosis* (4mg/mL).

Tabela 2 Distribuição dos animais em grupos

Grupos/dias avaliados	Parâmetro avaliado (n° de animais utilizados)		
	Controles	Imunizados com 100 µg de MOG	Imunizados com 300 µg de MOG
7° dia pós-indução	Citocinas (6) Quimiocinas (6) Histologia (3)	Citocinas (6) Quimiocinas (6) Histologia (3)	Citocinas (6) Quimiocinas (6) Histologia (3)
10° dia pós-indução	Citocinas (6) Quimiocinas (6) Histologia (3)	Citocinas (6) Quimiocinas (6) Histologia (3)	Citocinas (6) Quimiocinas (6) Histologia (3)
14° dia pós-indução	Citocinas (6) Quimiocinas (6) Histologia (3)	Citocinas (6) Quimiocinas (6) Histologia (3)	Citocinas (6) Quimiocinas (6) Histologia (3)
21° dia pós-indução	Citocinas (6) Quimiocinas (6) Histologia (3)	Citocinas (6) Quimiocinas (6) Histologia (3)	Citocinas (6) Quimiocinas (6) Histologia (3)
58° dia pós-indução	Citocinas (6) Quimiocinas (6) Histologia (3)	Citocinas (6) Quimiocinas (6) Histologia (3)	Citocinas (6) Quimiocinas (6) Histologia (3)

4.3 AVALIAÇÃO DO ESCORE CLÍNICO E MASSA CORPORAL

Vinte e quatro animais foram divididos entre os três grupos experimentais (8 animais/grupo) e tiveram seu escore clínico e massa corporal avaliados. A massa corporal dos animais foi determinada no dia zero e em todos os dias pós-imunização, até o 58º dia pós-indução (d.p.i.). A avaliação do escore clínico foi realizada do 2º até o 58º d.p.i., sendo que os animais foram clinicamente avaliados e classificados com relação à incapacidade neurológica através da escala apresentada na tabela 3, adaptada por De PAULA e colaboradores (2008). O escore final de cada animal corresponde ao somatório da pontuação obtida em todos os parâmetros avaliados em um mesmo dia.

Tabela 3 Escala neurológica clínica para avaliar a EAE (Adaptada: De PAULA et al., 2008).

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

4.4 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS E OBTENÇÃO DOS ÓRGÃOS E CÉLULAS

A eutanásia foi realizada com dose letal de Xilazina (10 mg/Kg) e Ketamina (150 mg/Kg) nos dias 7, 10, 14, 21 e 58 pós-indução. Após estarem completamente anestesiados, parte dos animais foram perfundidos intracardialmente por uma solução de formalina 4% para a retirada do cérebro para a análise histológica (3 animais/grupo). Os outros animais foram perfundidos com PBS para a retirada de cérebro, medula espinhal e linfonodos inguinais para a quantificação de citocinas e quimiocinas por ELISA (6 animais/grupo).

4.5 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS POR ELISA

Homogenatos de cérebro, medula espinhal e linfonodos inguinais foram submetidos à técnica de ELISA para a determinação dos níveis de citocinas e quimiocinas. No cérebro foram avaliadas a produção das citocinas IFN- γ , IL-12, IL-17A, IL-6, TGF- β , IL-10, IL-1 β e TNF- α e das quimiocinas CCL5 e CCL20. Devido ao menor volume de tecido obtido foram determinadas somente as concentrações das citocinas IFN- γ , IL-17A, IL-6, TGF- β e IL-10 na medula espinhal e IFN- γ , IL-17A, IL-6 e TGF- β nos linfonodos inguinais. As placas de ELISA foram sensibilizadas com o anticorpo de captura, diluído em tampão específico e incubadas por 18 h a 4°C. Em seguida, lavadas quatro vezes com PBS-Tween e bloqueadas com PBS + Soro Fetal Bovino (10%) por 1 hora. Após este período, as placas foram lavadas novamente quatro vezes e, em seguida, as amostras dos animais utilizados e os padrões de citocinas e quimiocinas foram adicionados. As placas foram então incubadas por 18 horas a 4°C. Após a incubação, as placas foram lavadas quatro vezes, o 2° anticorpo biotinizado e o complexo enzimático acrescentados e a placa incubada por 1 hora à temperatura ambiente. Após a incubação as placas foram lavadas seis vezes e a reação revelada pela adição do substrato contendo TMB (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) e bloqueio com ácido sulfúrico 2N. A leitura foi realizada em

leitor de microplacas (SPECTRAMAX 190, Molecular Devices) a 450 nm. As quantidades de citocinas e quimiocinas foram calculadas a partir das curvas-padrão, obtidas pelas diferentes concentrações dos respectivos recombinantes (IFN- γ , IL-12, IL-6, TGF- β , IL-1 β , TNF- α , IL-10, CCL5 e CCL20, BD Biosciences Pharmigen, San Diego, CA,USA; IL-17A, eBioscience, San Diego, CA,USA).

4.6 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

Cérebros foram coletados para análise histológica nos dias 7, 10, 14, 21 e 58 pós-indução. Os órgãos foram fixados em solução de formol tamponado 4%, posteriormente foram seccionados em cortes frontais e incluídos em parafina. Após a inclusão, foram realizados cortes frontais de 5 μ m de espessura para a montagem em lâmina. O processo de coloração em hematoxilina-eosina (H&E) iniciou-se com a imersão das lâminas em xilol I, II e III, durante 5 minutos para a desparafinização. Em seguida, estas lâminas foram imersas durante 3 minutos em banhos de álcool absoluto, álcool 95%, álcool 80%, álcool 70% e água destilada por 5 minutos para a hidratação. Após a hidratação, as lâminas foram imersas no corante específico, seguindo as exigências da técnica de H&E para a avaliação do infiltrado celular. As lâminas foram imersas em Hematoxilina (corante ácido) por dois minutos, em seguida lavadas em água corrente por quatro minutos e imersas em água destilada por 2 minutos. Finalizada esta etapa, as lâminas foram imersas no corante Eosina (corante básico), por 1 minuto. Logo após, as lâminas foram desidratadas, sendo imersas na bateria de álcool 70%, álcool 80%, álcool 95% e álcool absoluto e xilol IV, V e VI. Posteriormente, os cortes foram montados com meio de montagem Erv-Mount (EasyPath, Erviegas, São Paulo, SP) entre lâminas e lamínulas. As imagens foram obtidas usando o microscópio Olympus BX51 e os resultados foram registrados pelo software Image Pro plus (Media Cybernetics TM).

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram representados por média \pm erro padrão. As variáveis numéricas foram avaliadas nos diferentes grupos pelo teste paramétrico t' student, de acordo com a análise de variância dos dados e One-Way ANOVA, com o pós-teste Bonferroni para comparações múltiplas, para determinação das diferenças significantes entre os grupos de camundongos, com nível de significância $p < 0,05$. O programa estatístico utilizado foi o GraphPad Prism 5.0.

5 RESULTADOS

PARTE I

CINÉTICA DA EAE NO PROTOCOLO DE INDUÇÃO COM 100 µg DO PEPTÍDEO MOG₃₅₋₅₅

5.1 AVALIAÇÃO DO ESCORE CLÍNICO E MASSA CORPORAL

Após a indução do modelo de EAE em camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6, utilizando o protocolo de indução com 100 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, o curso clínico da EAE e a massa corporal de 8 animais/grupo, foram acompanhados diariamente durante 58 dias pós-indução. Para o grupo controle, não imunizado, durante todo o período avaliado não foi observado nenhum sinal clínico neurológico da EAE. Por outro lado, todos os animais imunizados desenvolveram sinais clínicos, sendo $11,1 \pm 0,61$, a média \pm erro padrão dos dias de início dos sinais clínicos da doença, nestes animais. O pico máximo de pontuação clínica ocorreu no 19º dia pós-indução e a média da pontuação do escore clínico durante o pico foi $4,5 \pm 0,36$. No 30º dia pós-indução, a média da pontuação do escore clínico foi $1,8 \pm 0,34$ e corresponde a menor média de pontuação do escore clínico, durante o período avaliado após o surgimento dos sinais (Figura 2A). Em paralelo ao agravamento dos sinais clínicos foi observada perda acentuada da massa corporal nos animais do grupo imunizado com 100 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, quando comparados aos animais do grupo controle, não imunizado, entre os dias 10 e 21 pós-imunização ($p < 0,05$) (Figura 2B).

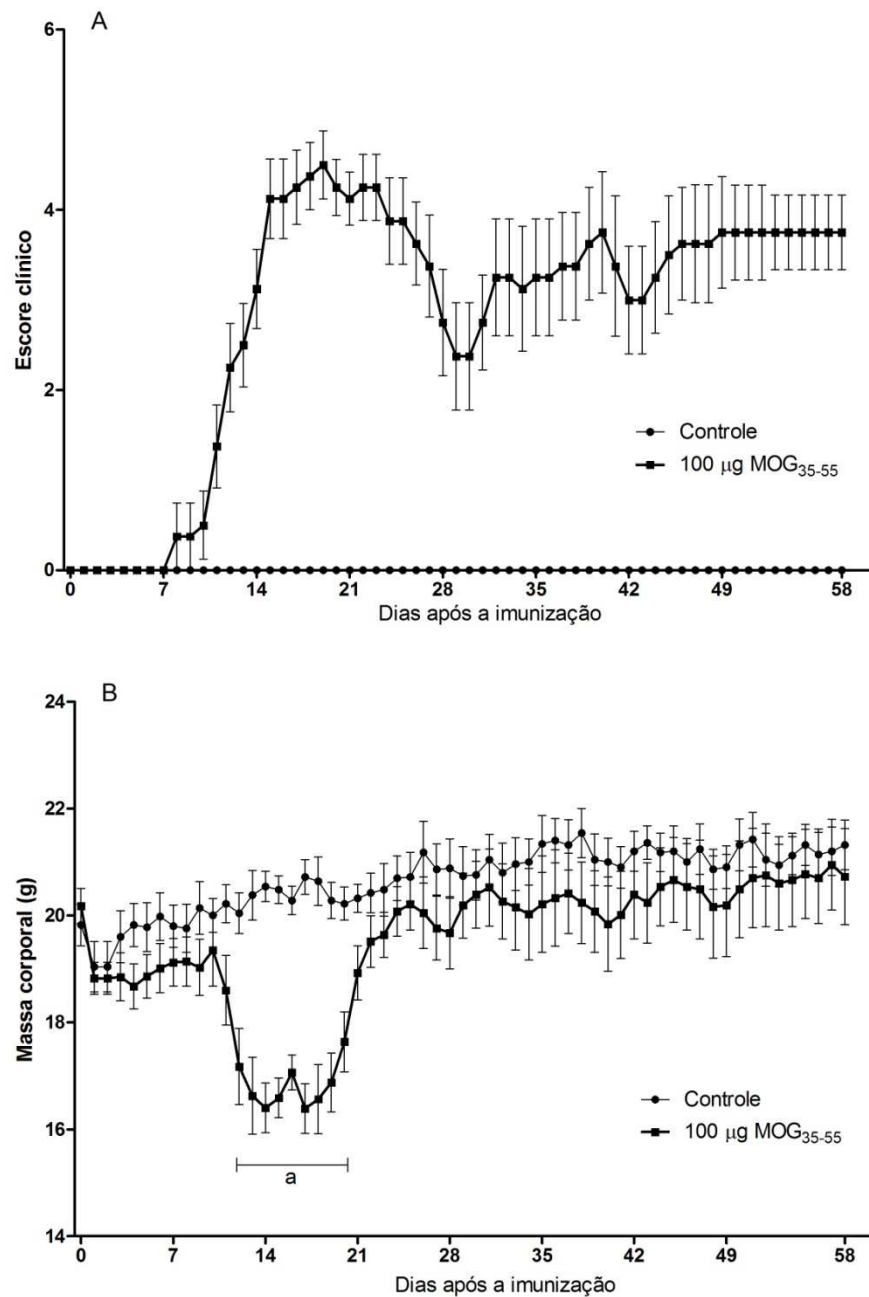


Figura 2 Média do escore clínico e massa corporal. (A) Escore clínico e (B) Massa corporal de camundongos C57BL/6 imunizados ou não com 100 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, (n=8 por grupo). Os sinais clínicos e a massa corporal foram registrados do dia 0 até o 58º dia após a imunização. Cada ponto representa a média±erro padrão. a = p<0,05 versus o grupo controle.

5.2 ANÁLISE HISTOLÓGICA DO CÉREBRO

Cortes histológicos dos cérebros, corados por H&E, de animais imunizados ou não com 100 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, nos dias 7, 10, 14, 21 e 58 pós-imunização, foram analisados. Os animais do grupo controle, não imunizado, apresentaram padrão parenquimatoso habitual no cérebro, sem a presença de infiltrado celular inflamatório.

No 7° d.p.i. os animais do grupo imunizado com 100 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, apresentaram focos de infiltrado celular inflamatório meningeano associado à congestão e ectasia vascular. No 10° d.p.i., estavam presentes congestão e ectasia vascular neste mesmo grupo, além disso, o infiltrado celular inflamatório foi observado na região meningeana e infiltrando o parênquima do tecido.

No 14° d.p.i. os animais imunizados apresentaram espessamento da região meningeana em função da presença de infiltrado inflamatório intenso, predominantemente linfocítico. No 21° d.p.i. ocorreu redução do processo inflamatório nos animais imunizados e no 58° d.p.i. foi possível observar tendência ao padrão parenquimatoso encontrado no grupo controle não imunizado (Figura 3).

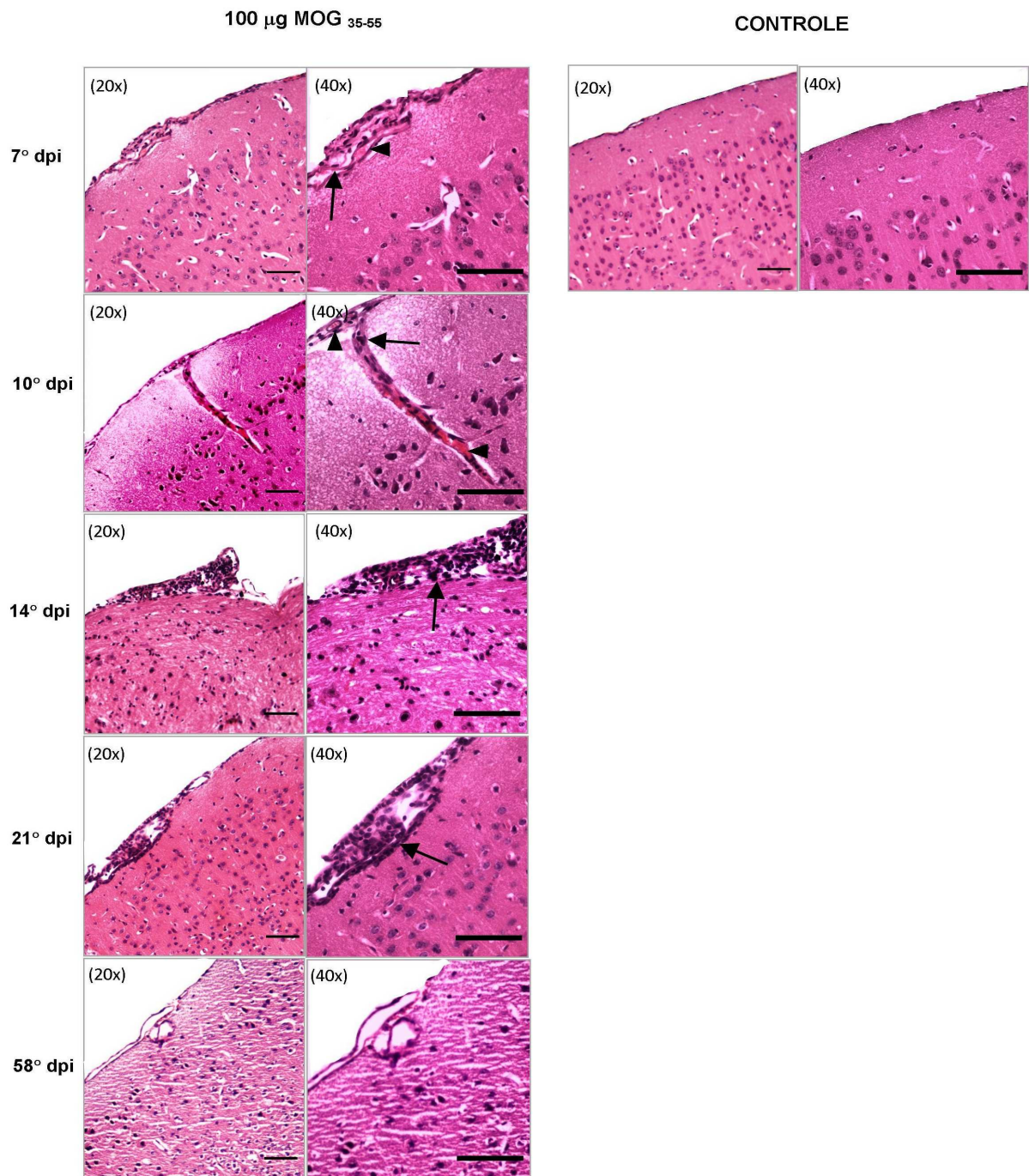


Figura 3. Análise histológica de cortes frontais do cérebro de camundongos C57BL/6 imunizados ou não com 100 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, (n=3 animais por grupo). As figuras são representativas da análise histológica de cada grupo experimental: grupo controle, não imunizado e grupo imunizado com 100 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, nos dias 7, 10, 14, 21 e 58 pós-imunização. O grupo controle apresentou histologia normal sem regiões inflamatórias. O grupo imunizado com 100 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅ apresentou focos de infiltrado celular inflamatório meningeano (seta) associado à congestão e ectasia vascular (ponta de seta), no 7° d.p.i.. No 10° d.p.i. o infiltrado celular inflamatório (seta) estava presente na região meningeana e no parênquima do tecido, associado à congestão e ectasia vascular (ponta de seta), intensificando-se no 14° d.p.i.. No 21° e 58° d.p.i. ocorreu gradativa redução do infiltrado inflamatório (seta). Coloração H&E. Magnificação de 20x e 40x, escala de barra = 50 µm.

5.3 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DAS QUIMIOCINAS CCL5 E CCL20 EM HOMOGENATO DE CÉREBRO

Os níveis de produção das quimiocinas CCL5 e CCL20 foram determinados em homogenato de cérebro dos animais imunizados ou não, com 100 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, nos dias 7, 10, 14, 21 e 58 pós-imunização.

O grupo de animais imunizados com 100 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, apresentou aumento dos níveis das quimiocinas CCL5 e CCL20 (6896±534,3 e 1681±183,7, respectivamente), em relação ao grupo controle (1631±338,4 e 582,6±38,0, respectivamente) a partir do 7° d.p.i. e estes níveis se mantiveram elevados até o 14° d.p.i. (7695±823,9 e 1569±161,0, respectivamente) ($p < 0,05$). No 21° d.p.i., ocorreu pequena redução nos níveis de CCL5 (4659±373,4) em relação ao 7° e 14° d.p.i. e de CCL20 (1174±88,6) em relação ao 7° d.p.i.. No 58° d.p.i., os níveis de CCL5 e CCL20 (173,4±17,7 e 153,2±25,3, respectivamente) estavam reduzidos em relação a todos os outros pontos avaliados ($p < 0,05$) (Figura 4A e B).

Os resultados obtidos para as quimiocinas CCL5 e CCL20 estão em concordância ao observado na análise histológica do cérebro, que mostrou presença de infiltrado celular a partir do 7° d.p.i. e tendência a gradativa redução do processo inflamatório a partir do 21° d.p.i. nos animais imunizados.

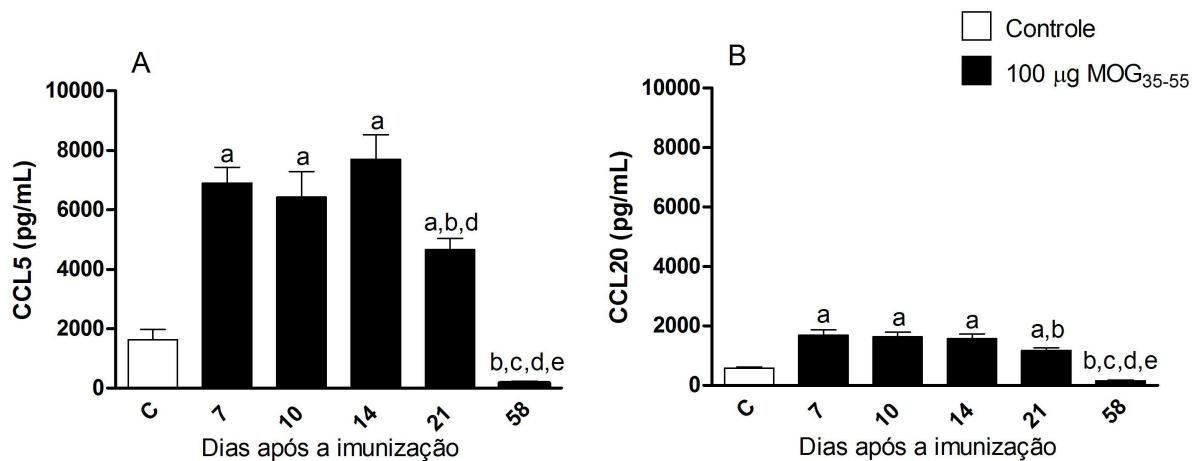


Figura 4 Concentração das quimiocinas (A) CCL5 e (B) CCL20 no homogenato de cérebro de camundongos C57BL/6 imunizados ou não com 100 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, (n=6 animais por grupo), avaliadas por ELISA, nos dias 7, 10, 14, 21 e 58 pós-imunização. a = p<0,05 versus o grupo controle; b = p<0,05 versus o 7° d.p.i.; c = p<0,05 versus o 10° d.p.i.; d = p<0,05 versus o 14° d.p.i.; e = p<0,05 versus o 21° d.p.i.

5.4 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DAS CITOCINAS IFN- γ , IL-12, TNF- α e IL-1 β EM HOMOGENATO DE CÉREBRO

Os níveis de produção das citocinas de perfil Th1 (IFN- γ , IL-12, TNF- α e IL-1 β) foram determinados em homogenato de cérebro dos animais imunizados ou não, com 100 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, nos dias 7, 10, 14, 21 e 58 pós-imunização.

O grupo de animais imunizados com 100 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, apresentou aumento dos níveis das citocinas IFN- γ , IL-12, TNF- α e IL-1 β no cérebro, em relação ao grupo controle, não imunizado, a partir do 7° d.p.i.. Os níveis de IFN- γ , se mantiveram elevados no 7°, 10°, 14° e 58° d.p.i. (1520 \pm 132,7; 1168 \pm 81,0; 1104 \pm 46,4 e 1190 \pm 94,2, respectivamente) em relação ao grupo controle (589,7 \pm 18,9). No 21° d.p.i. (860 \pm 51,5) ocorreu redução, em relação ao observado no 7° d.p.i. (p<0,05) (Figura 5A).

Assim como observado para o IFN- γ , os níveis de IL-12p40 estavam elevados no 7°, 10° e 14° d.p.i. (3546 \pm 372,5; 3152 \pm 427,7 e 3476 \pm 387,1, respectivamente) em relação ao grupo controle (729,3 \pm 87,5). No 21° d.p.i. (2377 \pm 153,0) ocorreu redução, em relação ao 7° e 14° d.p.i.. No 58° d.p.i.

(284,1±41,6), os níveis estavam reduzidos em relação ao 7°, 10°, 14° e 21° d.p.i. ($p<0,05$) (Figura 5B).

Os níveis da citocina TNF- α estavam elevados no grupo de animais imunizados com 100 μ g do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, em relação ao grupo controle (146,2±14,3), apenas no 7° e 58° d.p.i. (365,6±26,6 e 262,9±8,5, respectivamente) ($p<0,05$) (Figura 5C). Enquanto os níveis de IL-1 β , apresentavam-se elevados nos animais imunizados em relação ao grupo controle (704,9±45,3), em todos os pontos avaliados, 7°, 10°, 14°, 21° e 58° d.p.i. (1937±118,3; 1529±110,5; 1439±8,9; 1239±68,8 e 1067±78,9, respectivamente) ($p<0,05$) (Figura 5D).

Os resultados obtidos para as citocinas de perfil Th1 também podem ser correlacionados às observações realizadas na análise histológica de cortes de cérebro, que mostraram presença de infiltrado celular a partir do 7° d.p.i. e tendência a gradativa redução do processo inflamatório nos animais imunizados a partir do 21° d.p.i..

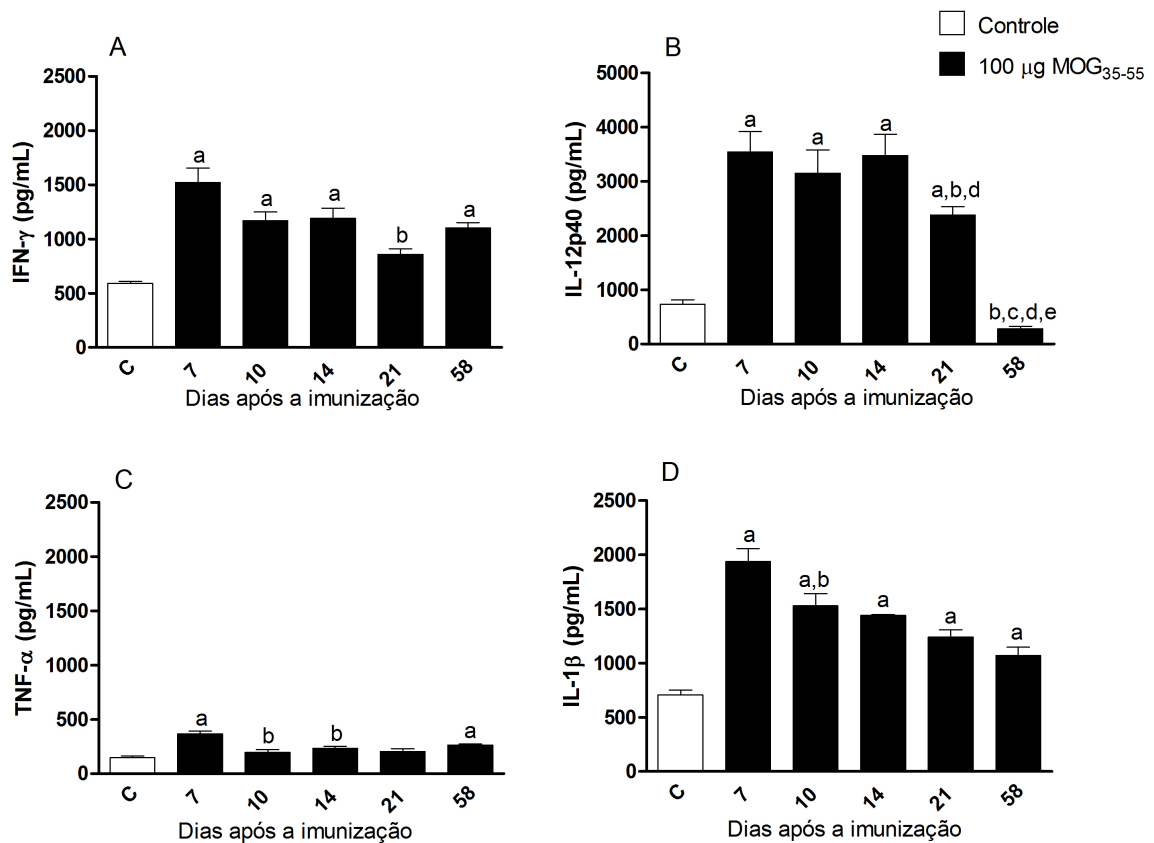


Figura 5 Concentração das citocinas do perfil Th1 (A) IFN- γ , (B) IL-12p40, (C) TNF- α e (D) IL-1 β no homogenato de cérebro de camundongos C57BL/6 imunizados ou não com 100 μ g do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, (n=6 animais por grupo), avaliadas por ELISA, nos dias 7, 10, 14, 21 e 58 pós-imunização. a = p<0,05 versus o grupo controle; b = p<0,05 versus o 7° d.p.i.; c = p<0,05 versus o 10° d.p.i.; d = p<0,05 versus o 14° d.p.i.; e = p<0,05 versus o 21° d.p.i.

5.5 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DAS CITOCINAS IL-17A, IL-6 e TGF- β EM HOMOGENATO DE CÉREBRO

Os níveis de produção das citocinas de perfil Th17 (IL-17A, IL-6 e TGF- β) foram determinados em homogenato de cérebro dos animais imunizados ou não, com 100 μ g do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, nos dias 7, 10, 14, 21 e 58 pós-imunização.

Assim como observado para as citocinas de perfil Th1, os animais do grupo imunizado com 100 μ g do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, apresentaram aumento precoce dos níveis das citocinas IL-17A, IL-6 e TGF- β no cérebro em relação ao grupo controle, não imunizado, no 7° d.p.i.. Sendo que, os níveis da citocina IL-17A estavam

aumentados no grupo de animais imunizados ($374,2 \pm 23,1$) em relação aos animais controle ($234,3 \pm 22,9$), somente no 7° d.p.i. ($p < 0,05$) (Figura 6A).

A citocina IL-6 apresentou níveis de produção elevados no 7°, 10° e 14° d.p.i. ($523,8 \pm 33,7$; $579,6 \pm 33,0$ e $373,6 \pm 11,4$, respectivamente) nos animais imunizados, em relação ao grupo controle não imunizado ($252,1 \pm 18,2$) ($p < 0,05$) e não ocorreu diferença entre os grupos no 21° e 58° d.p.i. ($306,1 \pm 14,9$ e $315,4 \pm 29,0$, respectivamente) (Figura 6B). Os resultados da citocina TGF- β foram similares aos observados para a citocina IL-6, com valores elevados no 7°, 10° e 14° d.p.i. ($10156 \pm 863,4$; $6884 \pm 420,6$ e $5339 \pm 434,6$, respectivamente), nos animais imunizados, em relação ao grupo controle ($2894 \pm 744,1$) ($p < 0,05$), porém mostrando tendência à redução. No 21° e 58° d.p.i. ($3951 \pm 215,1$ e $2823 \pm 177,7$, respectivamente), não ocorreu diferença entre os grupos de animais imunizados ou não (Figura 6C).

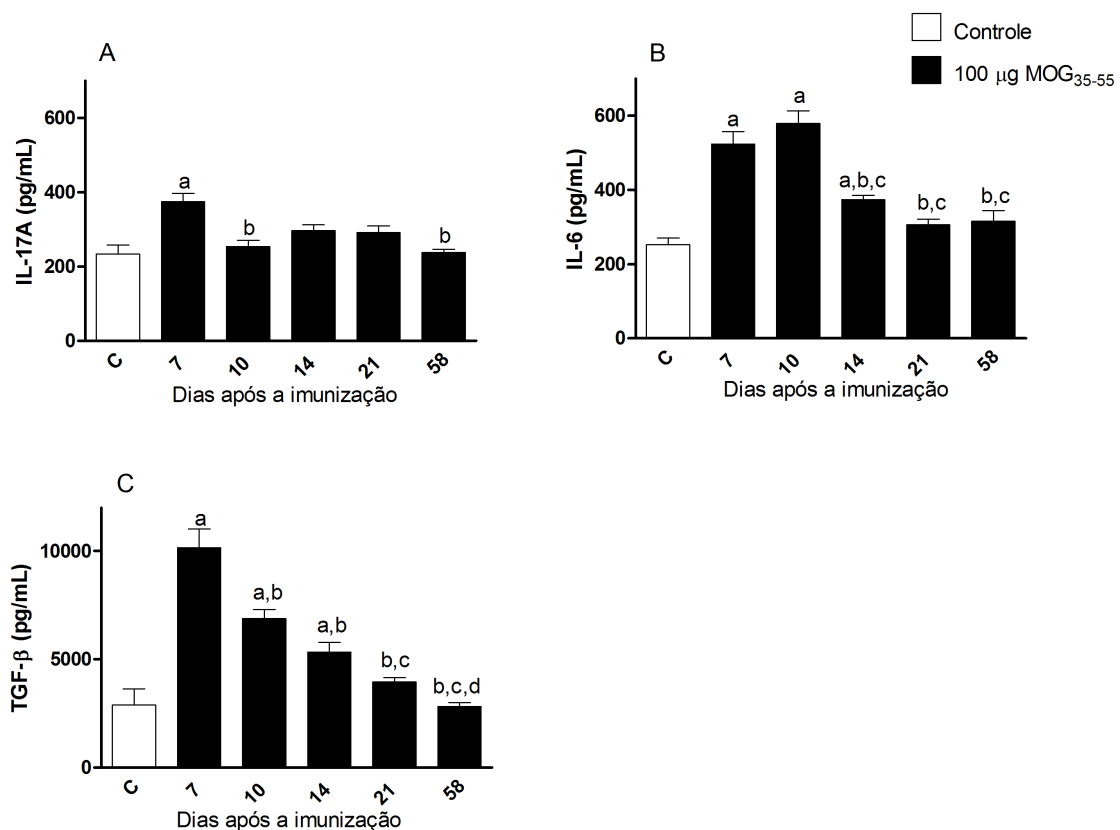


Figura 6 Concentração das citocinas do perfil Th17 (A) IL-17A, (B) IL-6 e (C) TGF- β no homogenato de cérebro de camundongos C57BL/6 imunizados ou não com 100 μ g do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, (n=6 animais por grupo), avaliadas por ELISA, nos dias 7, 10, 14, 21 e 58 pós-imunização. a = $p < 0,05$ versus o grupo controle; b = $p < 0,05$ versus o 7° d.p.i.; c = $p < 0,05$ versus o 10° d.p.i.; d = $p < 0,05$ versus o 14° d.p.i.

5.6 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DA CITOCINA IL-10 EM HOMOGENATO DE CÉREBRO

Os níveis de produção da citocina IL-10 foram determinados em homogenato de cérebro dos animais imunizados ou não, com 100 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, nos dias 7, 10, 14, 21 e 58 pós-imunização.

Assim como observado para as citocinas pró-inflamatórias de perfil Th1 e Th17, os níveis de produção da citocina IL-10 no cérebro estavam elevados no grupo de animais imunizados com 100 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, em relação ao grupo controle (302±19,1), no 7° e 10° d.p.i. (565±49,5 e 559,4±33,7, respectivamente) (p<0,05). Entretanto, a partir do 14° houve diminuição na produção desta citocina, sendo que não ocorreu diferença entre os grupos de animais imunizados, ou não, no 14°, 21° e 58° d.p.i. (392±20,8; 306,1±14,9 e 373,7±57,5, respectivamente) (Figura 7).

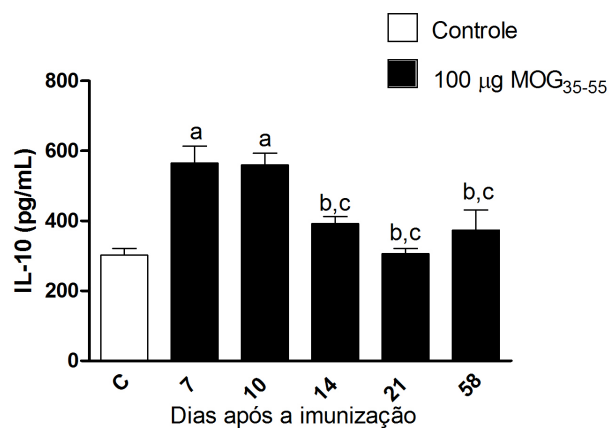


Figura 7 Concentração da citocina IL-10 no homogenato de cérebro de camundongos C57BL/6 imunizados ou não com 100 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, (n=6 animais por grupo), avaliada por ELISA, nos dias 7, 10, 14, 21 e 58 pós-imunização. a = p<0,05 versus o grupo controle; b = p<0,05 versus o 7° d.p.i.; c = p<0,05 versus o 10° d.p.i..

5.7 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DA CITOCINA IFN- γ EM HOMOGENATO DE MEDULA ESPINHAL

Os níveis de produção da citocina de perfil Th1 (IFN- γ) foram determinados em homogenato de medula espinhal dos animais imunizados ou não, com 100 μ g do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, nos dias 7, 10, 14, 21 e 58 pós-imunização.

Em concordância ao observado no cérebro, os animais do grupo imunizado com 100 μ g do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, apresentaram aumento dos níveis da citocina IFN- γ , em relação ao grupo controle (798,3 \pm 116,8), no 7° e 10° d.p.i. (2151 \pm 154,9 e 1814 \pm 357,1, respectivamente) na medula espinhal ($p < 0,05$). No 14°, 21° e 58° d.p.i. (1009 \pm 10,3; 982,9 \pm 33,3 e 139,7 \pm 8,6, respectivamente) os níveis de IFN- γ estavam reduzidos nos animais imunizados e não apresentaram diferença em relação aos controles, não imunizados (Figura 8).

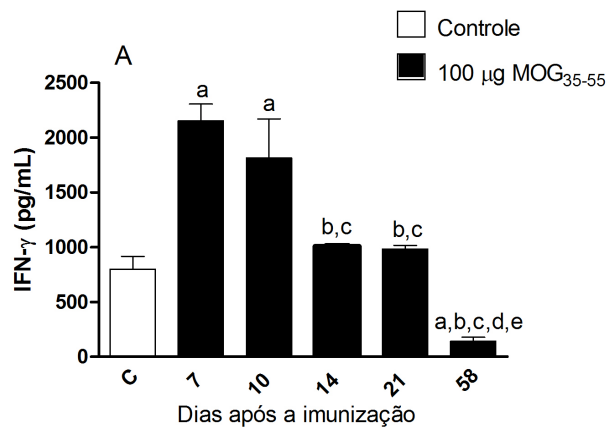


Figura 8 Concentração da citocina do perfil Th1 IFN- γ no homogenato de medula espinhal de camundongos C57BL/6 imunizados ou não com 100 μ g do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, (n=6 animais por grupo), avaliada por ELISA, nos dias 7, 10, 14, 21 e 58 pós-imunização. a = $p < 0,05$ versus o grupo controle; b = $p < 0,05$ versus o 7° d.p.i.; c = $p < 0,05$ versus o 10° d.p.i.; d = $p < 0,05$ versus o 14° d.p.i.; e = $p < 0,05$ versus o 21° d.p.i.

5.8 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DAS CITOCINAS IL-17A, IL-6 e TGF- β EM HOMOGENATO DE MEDULA ESPINHAL

Os níveis de produção das citocinas de perfil Th17 (IL-17A, IL-6 e TGF- β) foram determinados em homogenato de medula espinhal dos animais imunizados ou não, com 100 μ g do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, nos dias 7, 10, 14, 21 e 58 pós-imunização.

Na medula espinhal, de forma semelhante ao ocorrido no cérebro, os animais do grupo imunizado com 100 μ g do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, apresentaram aumento precoce dos níveis das citocinas IL-17A, IL-6 e TGF- β em relação ao grupo controle não imunizado, a partir do 7° d.p.i.. Além disso, os níveis da citocina IL-17A estavam aumentados no grupo de animais imunizados ($203,6 \pm 19,1$), em relação aos animais controle ($68,9 \pm 2,3$), somente no 7° d.p.i. ($p < 0,05$) (Figura 9A).

A citocina IL-6 apresentou níveis de produção elevados no 7° e 10° d.p.i. ($175,5 \pm 0,6$ e $189,8 \pm 9,5$, respectivamente), nos animais imunizados, em relação aos animais do grupo controle ($56,7 \pm 2,8$) ($p < 0,05$) e não ocorreu diferença entre os grupos no 14° e 21° d.p.i.. Houve aumento dos níveis de IL-6 no 58° d.p.i. ($212,8 \pm 8,6$) ($p < 0,05$) (Figura 9B). A citocina TGF- β apresentou níveis de produção elevados no 7° d.p.i. ($3626 \pm 102,8$) nos animais imunizados, em relação ao grupo controle ($1576 \pm 91,9$) e como observado para a citocina IL-6 ocorreu aumento no 58° d.p.i. ($2806 \pm 352,8$) ($p < 0,05$). No 10°, 14° e 21° d.p.i. ($2020 \pm 361,3$; $1258 \pm 70,3$ e $1321 \pm 157,7$, respectivamente) não ocorreu diferença entre os grupos de animais imunizados ou não (Figura 9C).

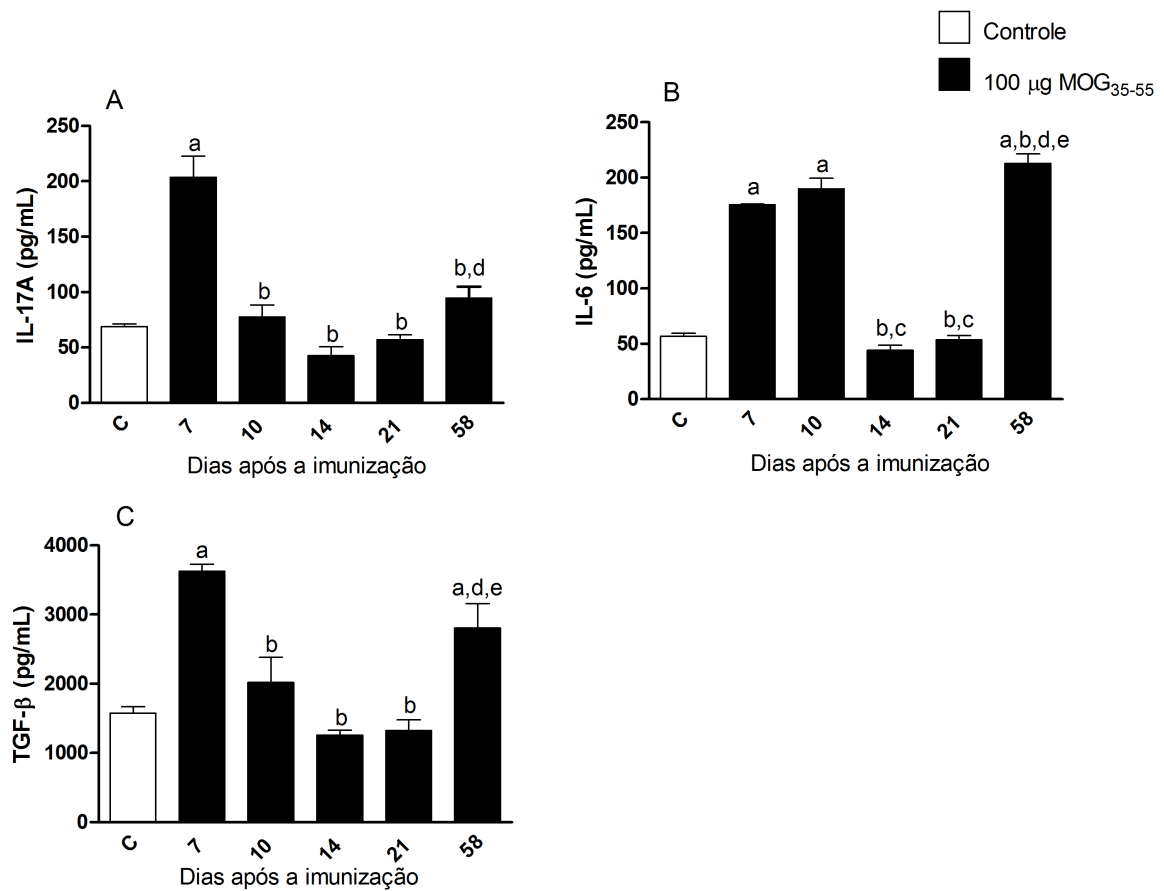


Figura 9 Concentração das citocinas do perfil Th17 (A) IL-17A, (B) IL-6 e (C) TGF- β no homogenato de medula espinhal de camundongos C57BL/6 imunizados ou não com 100 μ g do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, (n=6 animais por grupo), avaliadas por ELISA, nos dias 7, 10, 14, 21 e 58 pós-imunização. a = p<0,05 versus o grupo controle; b = p<0,05 versus o 7° d.p.i.; c = p<0,05 versus o 10° d.p.i.; d = p<0,05 versus o 14° d.p.i.; e = p<0,05 versus o 21° d.p.i.

5.9 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DA CITOCINA IL-10 EM HOMOGENATO DE MEDULA ESPINHAL

Os níveis de produção da citocina IL-10 foram determinados em homogenato de medula espinhal dos animais imunizados ou não, com 100 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, nos dias 7, 10, 14, 21 e 58 pós-imunização.

Os níveis da citocina IL-10 nos animais do grupo imunizado com 100 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅ aumentaram no 7º d.p.i. (395,4±35,3), decaindo a partir do 10º até o 14º d.p.i. (209±9,8 e 40,8±4,4, respectivamente), sendo que a partir do 21º d.p.i. (159,2±16,0), houve aumento que se intensificou no 58º d.p.i. (293,8±56,4). No 10º, 14º e 21º d.p.i. não houve diferença entre os grupos de animais imunizados ou não (Figura 10).

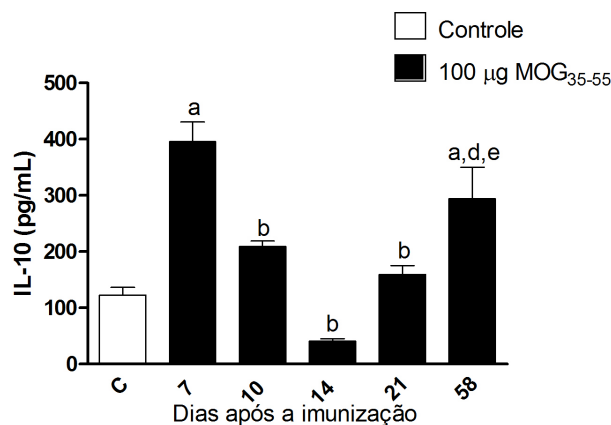


Figura 10 Concentração da citocina IL-10 no homogenato de medula espinhal de camundongos C57BL/6 imunizados ou não com 100 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, (n=6 animais por grupo), avaliada por ELISA, nos dias 7, 10, 14, 21 e 58 pós-imunização. a = p<0,05 versus o grupo controle; b = p<0,05 versus o 7º d.p.i.; d = p<0,05 versus o 14º d.p.i.; e = p<0,05 versus o 21º d.p.i.

5.10 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DAS CITOCINAS IFN- γ , IL-17A, IL-6 e TGF- β EM HOMOGENATO DE LINFONODOS INGUINAIS

Os níveis de produção das citocinas de perfil Th1 (IFN- γ) e Th17 (IL-17A, IL-6 e TGF- β) foram determinados em homogenato de linfonodos inguinais dos animais imunizados ou não, com 100 μ g do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, nos dias 7, 10, 14, 21 e 58 pós-imunização.

Em contraste ao observado no cérebro e na medula espinhal, os animais do grupo imunizado com 100 μ g do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, apresentaram aumento dos níveis das citocinas IFN- γ e IL-17A, em relação ao grupo controle, não imunizado, somente a partir do 10° ou 14° d.p.i.. Os níveis da citocina IFN- γ foram mais elevados nos animais do grupo imunizado com 100 μ g do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, no 10°, 14° e 21° d.p.i. (5544 \pm 119,9; 6833 \pm 18,5 e 6704 \pm 225,7, respectivamente) em relação ao grupo controle (3837 \pm 100,9) ($p < 0,05$) diminuindo no 58° d.p.i. (3180 \pm 64,7) (Figura 11A).

A citocina IL-17A apresentou tendência de aumento já a partir do 10° d.p.i. nos animais imunizados, sendo que houve diferença significativa somente no 14° e 21° d.p.i. (2752 \pm 68,9 e 3399 \pm 80,1) em relação ao grupo controle (1943 \pm 270,4) ($p < 0,05$). Semelhante ao ocorrido com o IFN- γ , houve redução drástica nos níveis desta citocina no 58° d.p.i. (864 \pm 24,6) (Figura 11B).

As citocinas IL-6 e TGF- β também apresentaram tendência ao aumento já a partir do 10° d.p.i., nos animais imunizados. Sendo os níveis mais elevados de IL-6 nos animais imunizados no 10°, 14° e 21° d.p.i. (1324 \pm 62,1; 1521 \pm 31,8 e 1588 \pm 59,8) em relação ao grupo controle (955,6 \pm 34,8) ($p < 0,05$). Além disso, mostrou redução no 58° d.p.i. (1024 \pm 60,0) (Figura 11C). TGF- β apresentou níveis mais elevados nos animais imunizados no 14° e 21° d.p.i. (18104 \pm 144,3 e 20232 \pm 44,8) em relação ao grupo controle (14523 \pm 352,2) ($p < 0,05$). Em concordância ao observado para as citocinas IFN- γ , IL-17A e IL-6, havia redução do nível da citocina TGF- β no 58° d.p.i. (13998 \pm 1637) (Figura 11D).

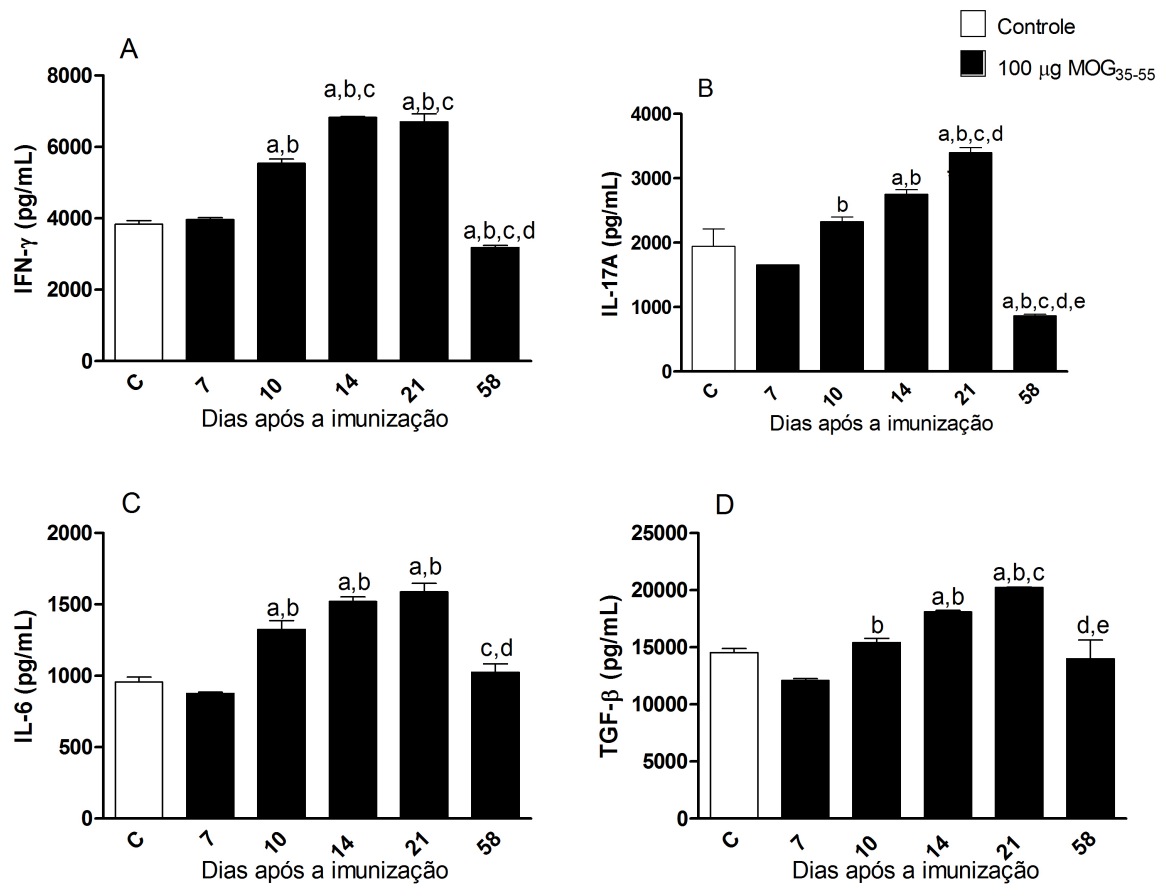


Figura 11 Concentração das citocinas do perfil Th1 e Th17 (A) IFN- γ , (B) IL-17A, (C) IL-6 e (D) TGF- β no homogenato de linfonodos inguinais de camundongos C57BL/6 imunizados ou não com 100 μ g do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, (n=6 animais por grupo), avaliadas por ELISA, nos dias 7, 10, 14, 21 e 58 pós-imunização. a = p<0,05 versus o grupo controle; b = p<0,05 versus o 7° d.p.i.; c = p<0,05 versus o 10° d.p.i.; d = p<0,05 versus o 14° d.p.i.; e = p<0,05 versus o 21° d.p.i.

PARTE II

CINÉTICA DA EAE NO PROTOCOLO DE INDUÇÃO COM 300 µg DO PEPTÍDEO MOG₃₅₋₅₅

5.11 AVALIAÇÃO DO ESCORE CLÍNICO E MASSA CORPORAL

Após a indução do modelo de EAE em camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6, utilizando o protocolo de indução com 300 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, o curso clínico da EAE e a massa corporal de 8 animais/grupo, foram acompanhados diariamente durante 58 dias pós-indução. Para o grupo controle não imunizado, durante todo o período avaliado, não foi observado nenhum sinal clínico neurológico da EAE. Por outro lado, todos os animais imunizados desenvolveram sinais clínicos, sendo $11,4 \pm 0,26$, a média dos dias de início dos sinais clínicos da doença, nestes animais. O pico máximo de pontuação clínica ocorreu no 17º dia pós-indução e a média de pontuação do escore clínico durante o pico foi $4,8 \pm 0,16$. No 29º dia pós-indução, a média da pontuação do escore clínico foi $3,0 \pm 0,26$ e corresponde a menor média de pontuação do escore clínico (Figura 12A). Concomitante ao agravamento dos sinais clínicos da EAE foi observada perda acentuada da massa corporal nos animais do grupo imunizado com 300 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, quando comparados aos animais do grupo controle, não imunizado, entre os dias 10 e 22 pós-imunização ($p < 0,05$) (Figura 12B).

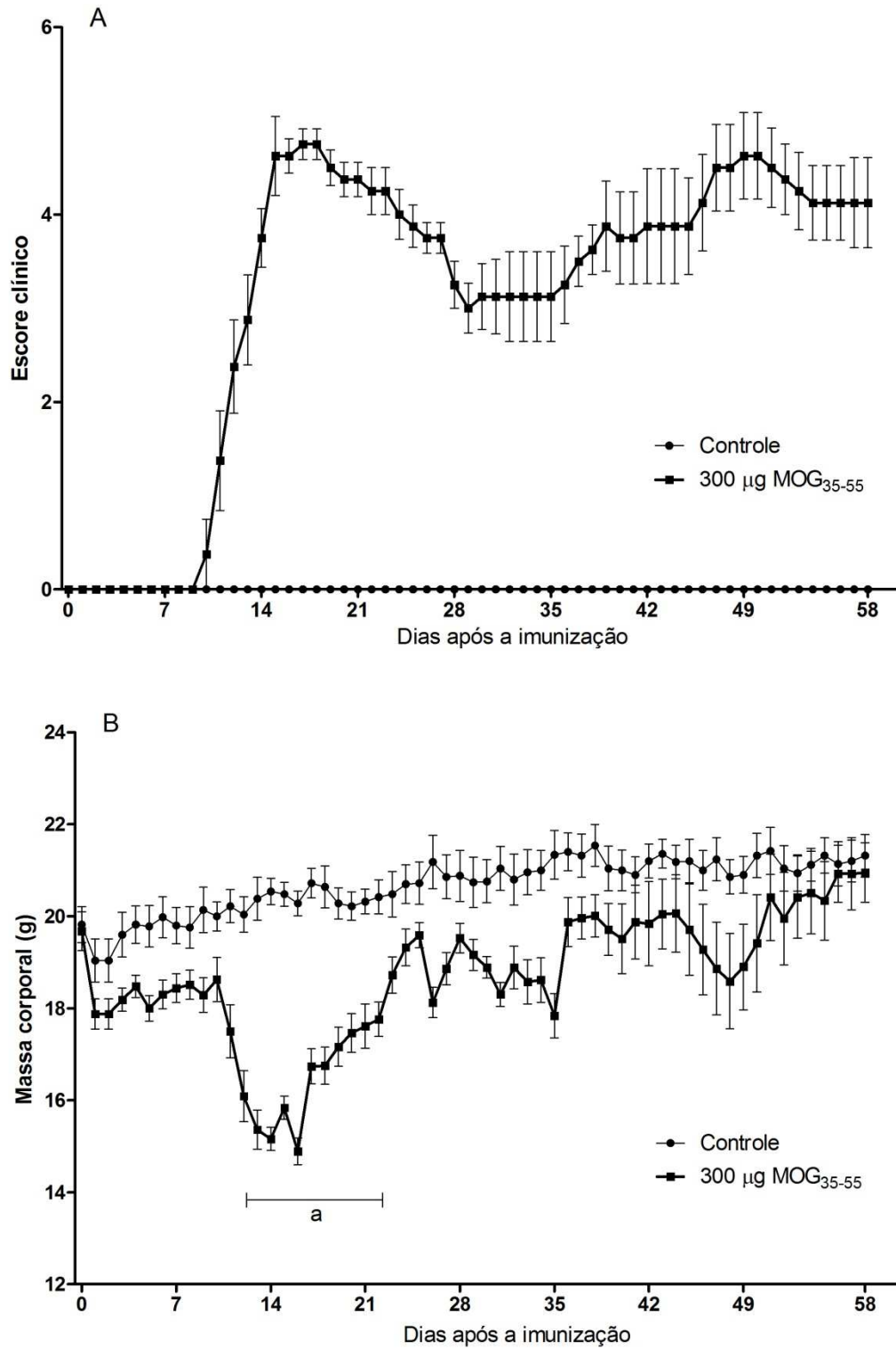


Figura 12 Média do escore clínico e massa corporal. (A) Escore clínico e (B) Massa corporal de camundongos C57BL/6 imunizados ou não com 300 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, (n=8 por grupo). Os sinais clínicos e a massa corporal foram registrados do dia 0 até o 58º dia após a imunização. Cada ponto representa a média±erro padrão. a = $p < 0,05$ versus o grupo controle.

5.12 ANÁLISE HISTOLÓGICA DO CÉREBRO

Cortes histológicos dos cérebros, corados por H&E, de animais imunizados ou não com 300 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, nos dias 7, 10, 14, 21 e 58 pós-imunização, foram analisados. Os animais do grupo controle, não imunizado, apresentaram padrão parenquimatoso habitual no cérebro, sem a presença de infiltrado celular inflamatório.

No 7° d.p.i., os animais imunizados com 300 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅ apresentaram aspecto histológico semelhante ao encontrado no grupo controle não imunizado. No 10° d.p.i., foi possível observar que os animais do grupo imunizado apresentaram infiltrado celular inflamatório.

No 14° d.p.i., este mesmo grupo de animais, apresentava infiltrado inflamatório meningeano, associado à congestão e ectasia vascular. No 21° e no 58° d.p.i., ocorreu gradativa redução do processo inflamatório nos animais imunizados, tendendo ao padrão parenquimatoso habitual, presente nos animais não imunizados (Figura 13).

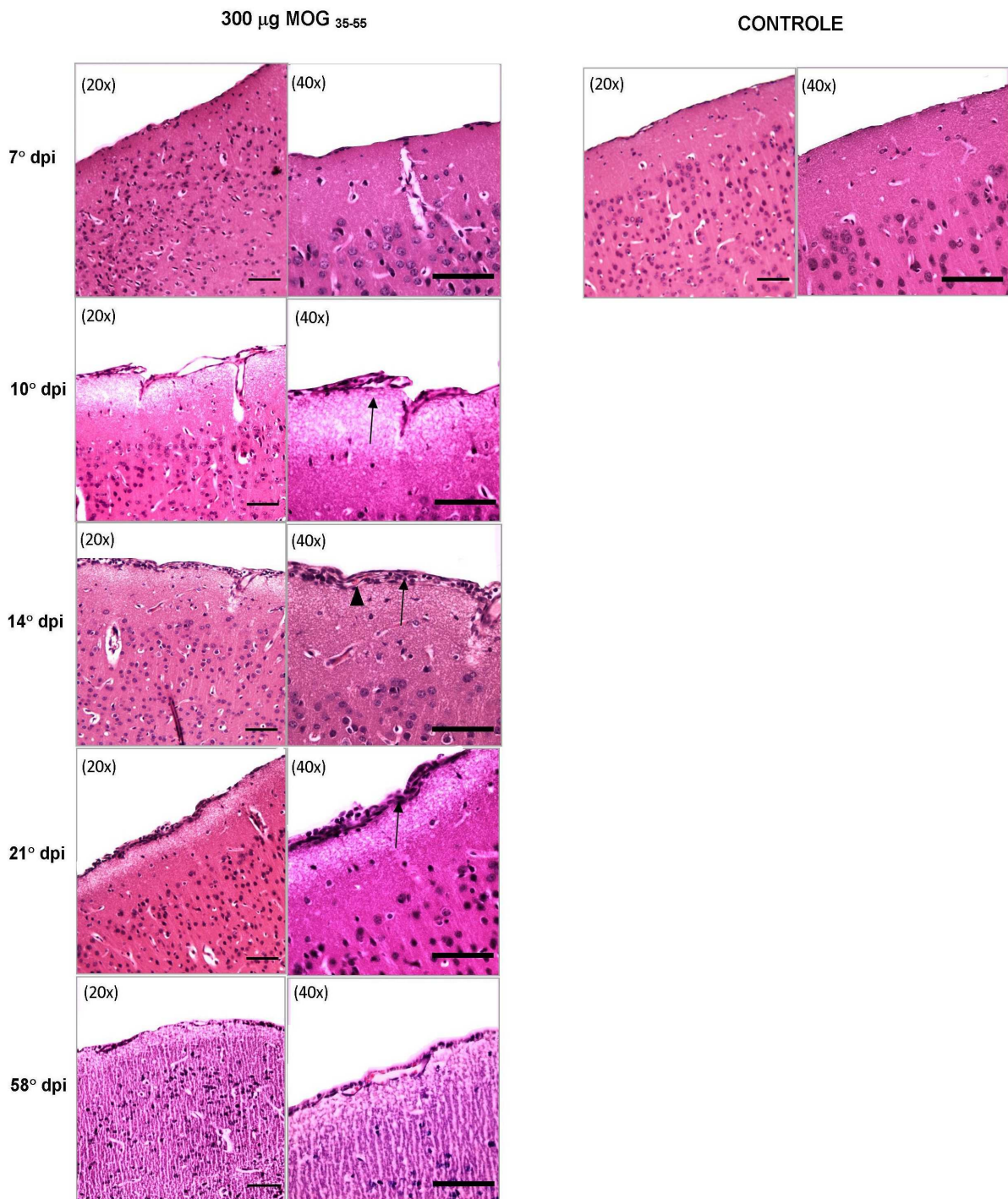


Figura 13. Análise histológica de cortes frontais do cérebro de camundongos C57BL/6 imunizados ou não com 300 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, (n=3 animais por grupo). As figuras são representativas da análise histológica de cada grupo experimental: grupo controle, não imunizado e grupo imunizado com 300 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, nos dias 7, 10, 14, 21 e 58 pós-imunização. O grupo controle apresentou histologia normal sem regiões inflamatórias. O grupo imunizado com 300 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅ não apresentou infiltrado celular inflamatório no 7° d.p.i.. No 10° d.p.i. foi observado infiltrado celular inflamatório meningeano (seta), que estava associado à congestão e ectasia vascular (ponta de seta) no 14° d.p.i.. No 21° e 58° d.p.i. ocorreu gradativa redução do infiltrado inflamatório (seta). Coloração H&E. Magnificação de 20x e 40x, escala de barra = 50 µm.

5.13 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DAS QUIMIOCINAS CCL5 E CCL20 EM HOMOGENATO DE CÉREBRO

Os níveis de produção das quimiocinas CCL5 e CCL20 foram determinados em homogenato de cérebro dos animais imunizados ou não, com 300 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, nos dias 7, 10, 14, 21 e 58 pós-imunização.

O grupo de animais imunizados com 300 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, apresentou aumento dos níveis das quimiocinas CCL5 e CCL20 somente no 10° d.p.i. (4524±684,3 e 1583±189,2, respectivamente) em relação ao grupo controle (1631±338,4 e 627,3±99,7, respectivamente) ($p < 0,05$) (Figura 14A e B). A partir do 14° d.p.i., houve diminuição gradativa na produção destas quimiocinas.

Os resultados obtidos para as quimiocinas CCL5 e CCL20 estão em concordância ao observado na análise histológica, que mostrou presença de infiltrado celular discreto no 7° d.p.i. e tendência a gradativa redução do processo inflamatório, nos animais imunizados, a partir do 21° d.p.i..

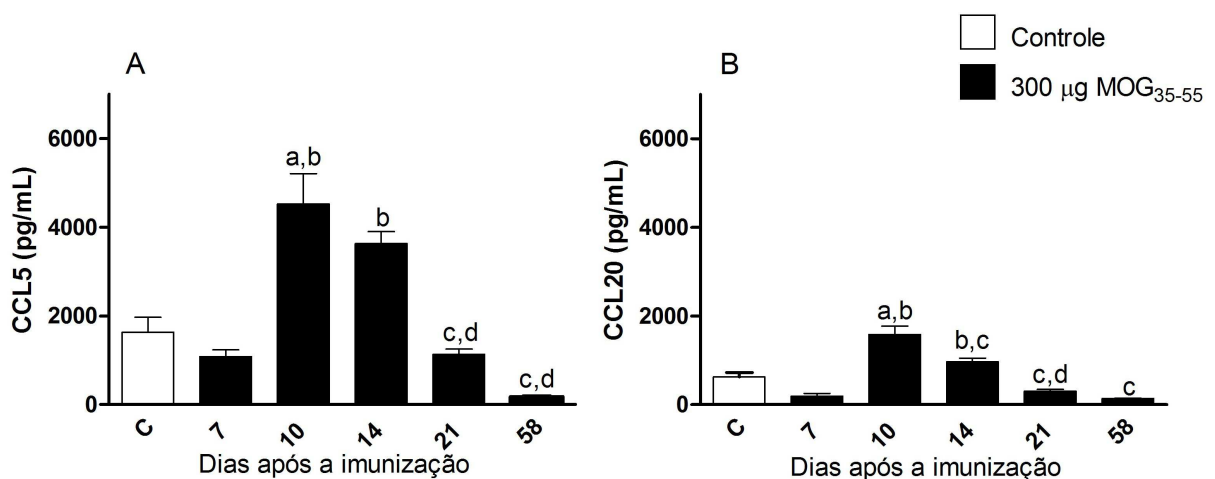


Figura 14 Concentração das quimiocinas (A) CCL5 e (B) CCL20 no homogenato de cérebro de camundongos C57BL/6 imunizados ou não com 300 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, (n=6 animais por grupo), avaliadas por ELISA, nos dias 7, 10, 14, 21 e 58 pós-imunização. a = $p < 0,05$ versus o grupo controle; b = $p < 0,05$ versus o 7° d.p.i.; c = $p < 0,05$ versus o 10° d.p.i.; d = $p < 0,05$ versus o 14° d.p.i..

5.14 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DAS CITOCINAS IFN- γ , IL-12, TNF- α e IL-1 β EM HOMOGENATO DE CÉREBRO

Os níveis de produção das citocinas de perfil Th1 (IFN- γ , IL-12, TNF- α e IL-1 β) foram determinados em homogenato de cérebro dos animais imunizados ou não, com 300 μ g do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, nos dias 7, 10, 14, 21 e 58 pós-imunização.

O grupo de animais imunizados com 300 μ g do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, apresentou aumento dos níveis das citocinas IL-12, TNF- α e IL-1 β em relação ao grupo controle, não imunizado, somente a partir do 10° d.p.i., sendo que houve uma diminuição gradativa a partir deste ponto. Entretanto, os níveis da citocina IFN- γ nos animais do grupo imunizado com 300 μ g do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, começaram a aumentar no 10° d.p.i. (1000 \pm 104,3) sendo maiores que os níveis do grupo controle (589,7 \pm 18,8), apresentando um pico no 14° d.p.i. (721,1 \pm 42,6) e decrescendo a partir deste ponto (Figura 15A).

Os níveis da citocina IL-12 foram mais elevados no grupo de animais imunizados com 300 μ g do peptídeo MOG₃₅₋₅₅ no 10° e 14° d.p.i. (2446 \pm 415,1 e 4416 \pm 323,6) em relação ao grupo controle (729,3 \pm 87,5) (Figura 15B). Os níveis de TNF- α foram maiores no 10° d.p.i. (277,5 \pm 28,5) e os níveis de IL-1 β no 10° e 14° d.p.i. (1307 \pm 66,5 e 1147 \pm 43,3, respectivamente) em relação ao grupo controle (146,2 \pm 14,2 e 704,9 \pm 45,3, respectivamente) ($p < 0,05$) (Figura 15C e D).

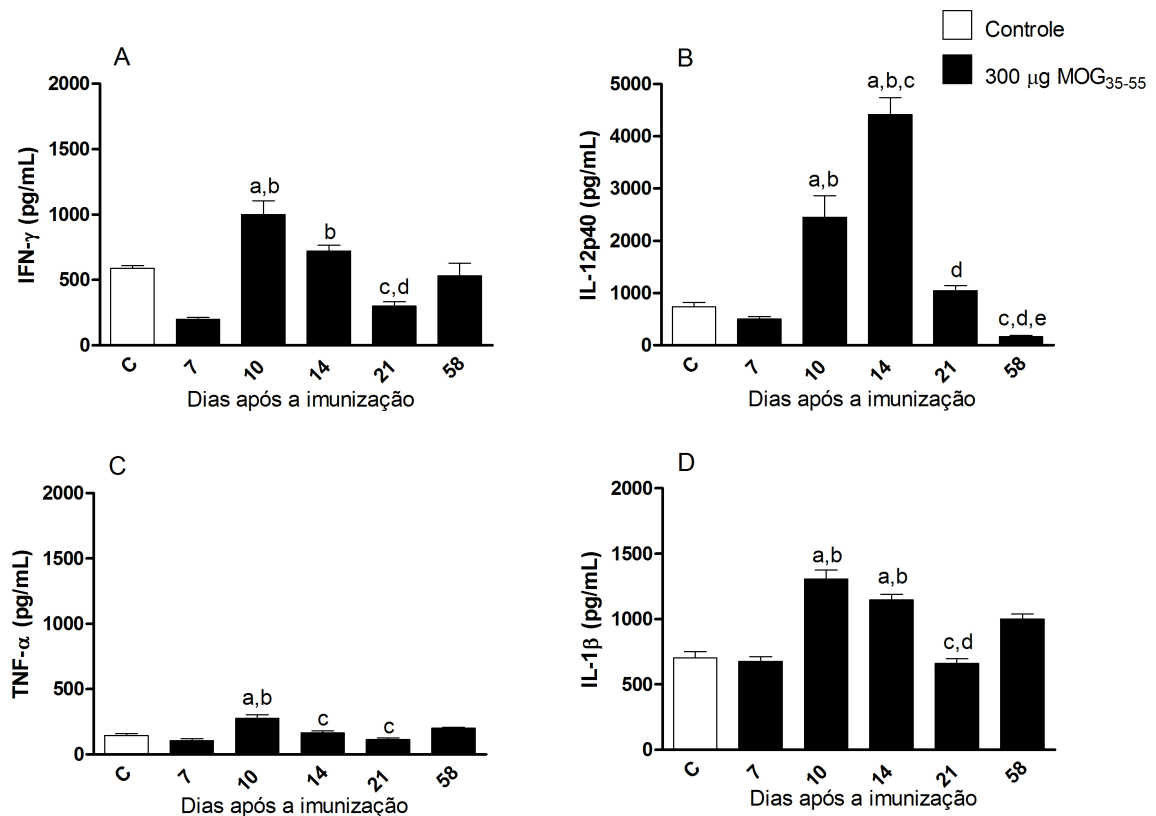


Figura 15 Concentração das citocinas do perfil Th1 (A) IFN- γ , (B) IL-12, (C) TNF- α e (D) IL-1 β no homogenato de cérebro de camundongos C57BL/6 imunizados ou não com 300 μ g do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, (n=6 animais por grupo), avaliadas por ELISA, nos dias 7, 10, 14, 21 e 58 pós-imunização. a = p<0,05 versus o grupo controle; b = p<0,05 versus o 7^o d.p.i.; c = p<0,05 versus o 10^o d.p.i.; d = p<0,05 versus o 14^o d.p.i.; e = p<0,05 versus o 21^o d.p.i..

5.15 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DAS CITOCINAS IL-17A, IL-6 e TGF- β EM HOMOGENATO DE CÉREBRO

Os níveis de produção das citocinas de perfil Th17 (IL-17A, IL-6 e TGF- β) foram determinados em homogenato de cérebro dos animais imunizados ou não, com 300 μ g do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, nos dias 7, 10, 14, 21 e 58 pós-imunização.

Foi observado aumento do nível de produção da citocina IL-17A nos animais do grupo imunizado com 300 μ g do peptídeo MOG₃₅₋₅₅ (450,7 \pm 65,2) em relação ao grupo controle (234,3 \pm 22,9) somente no 10^o d.p.i. (p<0,05) (Figura 16A). Não ocorreu aumento de IL-6 nos animais do grupo imunizado com 300 μ g do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, em relação ao grupo controle, não imunizado, em nenhum dos pontos

avaliados (Figura 16B). Além disso, a citocina TGF- β mostrou aumento do nível de produção nos animais do grupo imunizado com 300 μ g do peptídeo MOG₃₅₋₅₅ (6019 \pm 596,9) em relação ao grupo controle (2894 \pm 744,1), somente no 21° d.p.i. ($p < 0,05$) (Figura 16C).

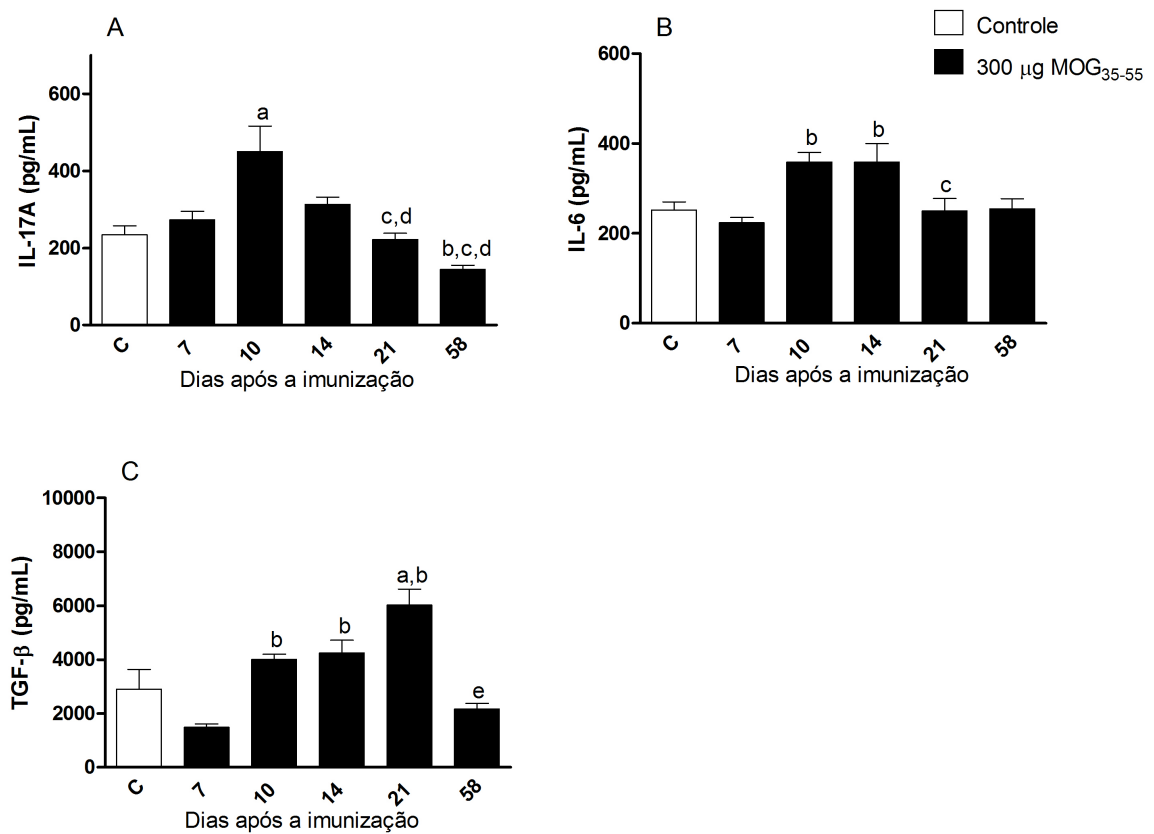


Figura 16 Concentração das citocinas do perfil Th17 (A) IL-17A, (B) IL-6 e (C) TGF- β no homogenato de cérebro de camundongos C57BL/6 imunizados ou não com 300 μ g do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, (n=6 animais por grupo), avaliadas por ELISA, nos dias 7, 10, 14, 21 e 58 pós-imunização. a = $p < 0,05$ versus o grupo controle; b = $p < 0,05$ versus o 7° d.p.i.; c = $p < 0,05$ versus o 10° d.p.i.; d = $p < 0,05$ versus o 14° d.p.i.; e = $p < 0,05$ versus o 21° d.p.i.

5.16 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DA CITOCINA IL-10 EM HOMOGENATO DE CÉREBRO

Os níveis de produção da citocina IL-10 foram determinados em homogenato de cérebro dos animais imunizados ou não, com 300 μg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, nos dias 7, 10, 14, 21 e 58 pós-imunização.

Não ocorreu aumento de IL-10 nos animais do grupo imunizado com 300 μg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, em relação ao grupo controle, não imunizado, em nenhum dos pontos avaliados (Figura 17). Entretanto parece que houve tendência de aumento desta citocina no 10º d.p.i., com uma diminuição gradativa nos pontos posteriores.

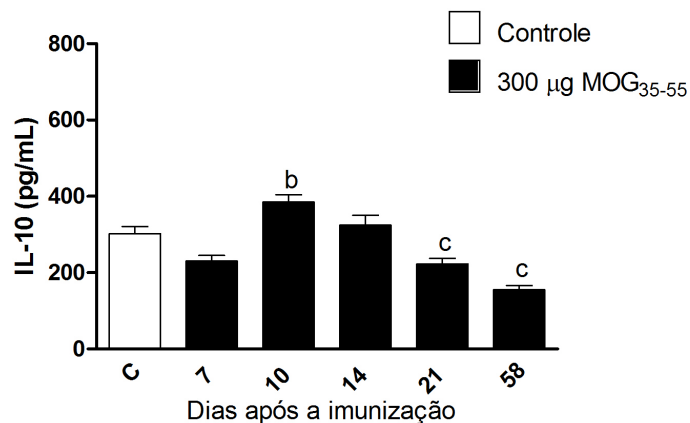


Figura 17 Concentração da citocina IL-10 no homogenato de cérebro de camundongos C57BL/6 imunizados ou não com 300 μg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, (n=6 animais por grupo), avaliada por ELISA, nos dias 7, 10, 14, 21 e 58 pós-imunização. b = $p < 0,05$ versus o 7º d.p.i.; c = $p < 0,05$ versus o 10º d.p.i.

5.17 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DA CITOCINA IFN- γ EM HOMOGENATO DE MEDULA ESPINHAL

Os níveis de produção da citocina de perfil Th1 (IFN- γ) foram determinados em homogenato de medula espinhal dos animais imunizados ou não, com 300 μ g do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, nos dias 7, 10, 14, 21 e 58 pós-imunização.

A citocina IFN- γ mostrou aumento gradativo do nível de produção nos animais do grupo imunizado com 300 μ g do peptídeo MOG₃₅₋₅₅ a partir do 14° d.p.i., sendo que somente no 21° d.p.i. (1744 \pm 125,6) houve aumento significativo em relação ao grupo controle (798,3 \pm 116,8), decrescendo drasticamente a partir deste ponto. Vale ressaltar que neste mesmo ponto, os animais imunizados mostravam o início de uma fase de recorrência na avaliação do escore clínico ($p < 0,05$) (Figura 18).

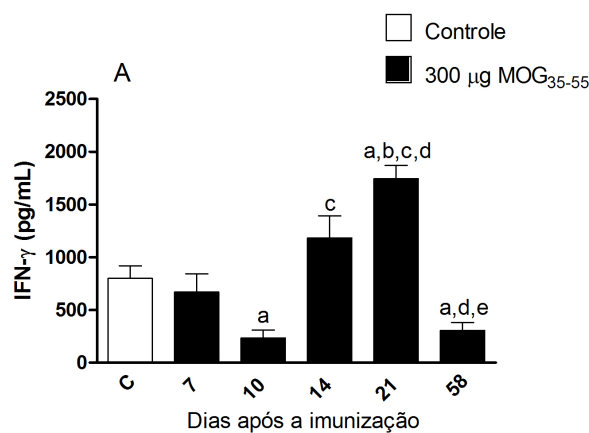


Figura 18 Concentração da citocina do perfil Th1 (IFN- γ) no homogenato de medula espinhal de camundongos C57BL/6 imunizados ou não com 300 μ g do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, (n=6 animais por grupo), avaliada por ELISA, nos dias 7, 10, 14, 21 e 58 pós-imunização. a = $p < 0,05$ versus o grupo controle; b = $p < 0,05$ versus o 7° d.p.i.; c = $p < 0,05$ versus o 10° d.p.i.; d = $p < 0,05$ versus o 14° d.p.i.; e = $p < 0,05$ versus o 21° d.p.i.

5.18 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DAS CITOCINAS IL-17A, IL-6 e TGF- β EM HOMOGENATO DE MEDULA ESPINHAL

Os níveis de produção das citocinas de perfil Th17 (IL-17A, IL-6 e TGF- β) foram determinados em homogenato de medula espinhal dos animais imunizados ou não, com 300 μ g do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, nos dias 7, 10, 14, 21 e 58 pós-imunização.

Foi observado aumento do nível de produção da citocina IL-17A nos animais do grupo imunizado com 300 μ g do peptídeo MOG₃₅₋₅₅ (130,4 \pm 2,8), em relação ao grupo controle (68,9 \pm 2,3), somente no 14° d.p.i. ($p < 0,05$) (Figura 19A). A citocina IL-6 apresentou níveis aumentados nos animais imunizados com 300 μ g do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, no 10° e 58° d.p.i. (194,7 \pm 7,6 e 319,3 \pm 1,0, respectivamente) em relação ao grupo controle (56,7 \pm 2,8) ($p < 0,05$) (Figura 19B). Enquanto TGF- β apresentou nível de produção elevado nos animais imunizados com 300 μ g do peptídeo MOG₃₅₋₅₅ (3303 \pm 488,4) em relação ao grupo controle (1576 \pm 91,9), somente no 14° d.p.i. ($p < 0,05$) (Figura 19C).

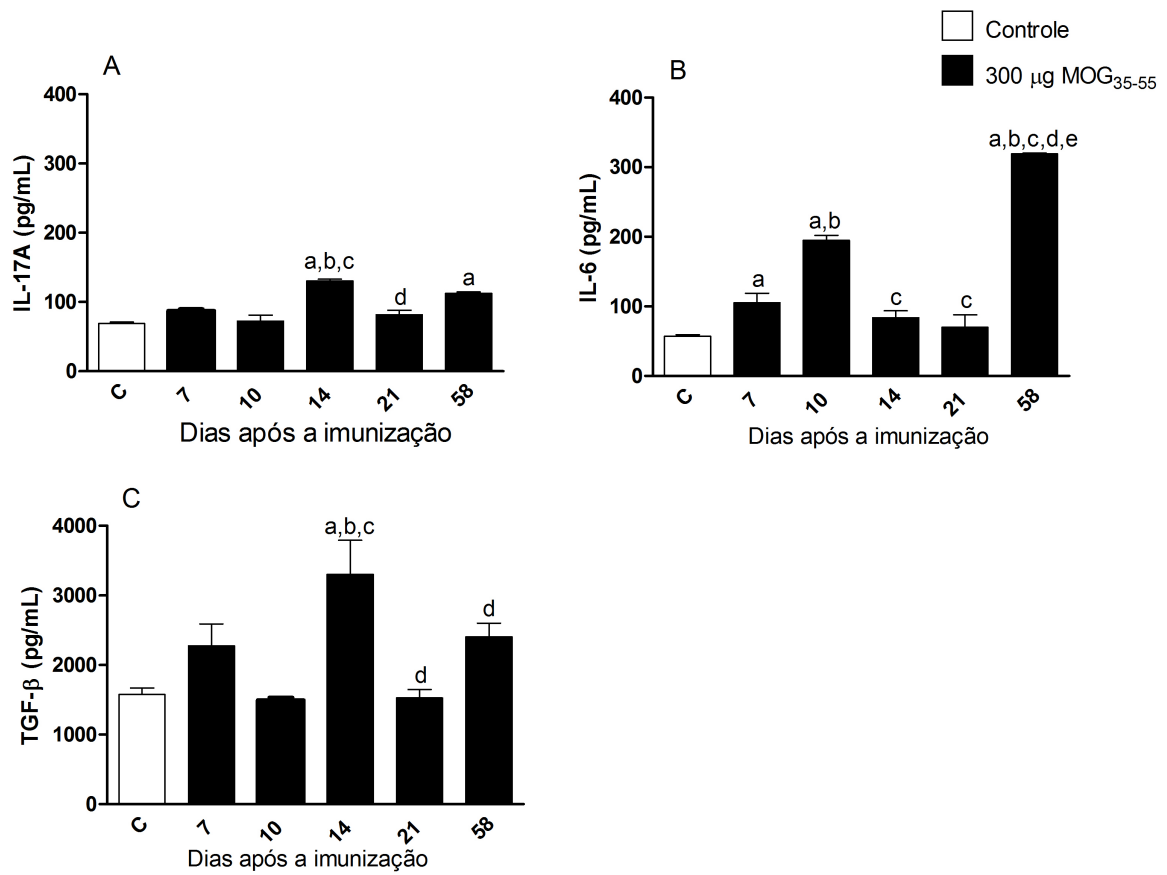


Figura 19 Concentração das citocinas do perfil Th17 (A) IL-17A, (B) IL-6 e (C) TGF- β no homogenato de medula espinhal de camundongos C57BL/6 imunizados ou não com 300 μ g do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, (n=6 animais por grupo), avaliadas por ELISA, nos dias 7, 10, 14, 21 e 58 pós-imunização. a = p<0,05 versus o grupo controle; b = p<0,05 versus o 7° d.p.i.; c = p<0,05 versus o 10° d.p.i.; d = p<0,05 versus o 14° d.p.i.; e = p<0,05 versus o 21° d.p.i.

5.19 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DA CITOCINA IL-10 EM HOMOGENATO DE MEDULA ESPINHAL

Os níveis de produção da citocina IL-10 foram determinados em homogenato de medula espinhal dos animais imunizados ou não, com 300 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, nos dias 7, 10, 14, 21 e 58 pós-imunização.

Foi observado aumento do nível de produção da citocina IL-10 nos animais do grupo imunizado com 300 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅ (376,2±35,2) em relação ao grupo controle (122,7±13,8), somente no 14° d.p.i. ($p < 0,05$) (Figura 20).

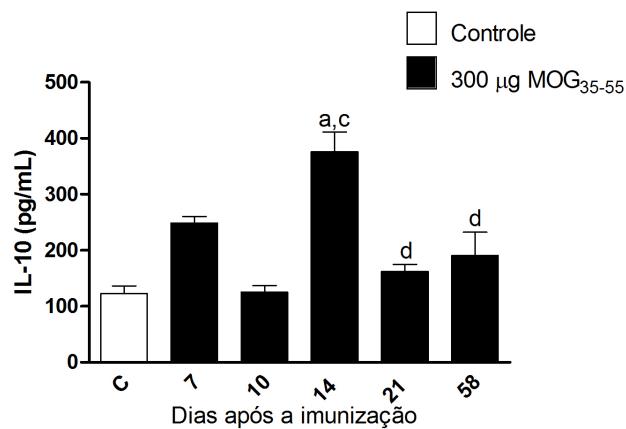


Figura 20 Concentração da citocina IL-10 no homogenato de medula espinhal de camundongos C57BL/6 imunizados ou não com 300 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, (n=6 animais por grupo), avaliada por ELISA, nos dias 7, 10, 14, 21 e 58 pós-imunização. a = $p < 0,05$ versus o grupo controle; c = $p < 0,05$ versus o 10° d.p.i.; d = $p < 0,05$ versus o 14° d.p.i.

5.20 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DAS CITOCINAS IFN- γ , IL-17A, IL-6 e TGF- β EM HOMOGENATO DE LINFONODOS INGUINAIS

Os níveis de produção das citocinas de perfil Th1 (IFN- γ) e Th17 (IL-17A, IL-6 e TGF- β) foram determinados em homogenato de linfonodos inguinais dos animais imunizados ou não, com 300 μ g do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, nos dias 7, 10, 14, 21 e 58 pós-imunização.

Em contraste ao observado no cérebro e na medula espinhal, os animais do grupo imunizado com 300 μ g do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, apresentaram aumento dos níveis das citocinas IFN- γ , IL-17A, IL-6 e TGF- β , em relação ao grupo controle, não imunizado, no 7° d.p.i., nos linfonodos inguinais. O IFN- γ mostrou aumento nos animais do grupo imunizado com 300 μ g do peptídeo MOG₃₅₋₅₅ (6230 \pm 19,9) em relação ao grupo controle (3837 \pm 100,9), somente no 7° d.p.i. ($p < 0,05$) (Figura 21A). IL-17A, IL-6 e TGF- β estavam aumentados no grupo imunizado com 300 μ g do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, no 7° (3320 \pm 137,4; 1350 \pm 13,2 e 20538 \pm 437,2, respectivamente) e 10° d.p.i. (2847 \pm 3,2; 1243 \pm 21,0 e 19495 \pm 367,2, respectivamente) em relação ao grupo controle (1943 \pm 270,4, 955,6 \pm 34,8 e 14523 \pm 352,2, respectivamente) ($p < 0,05$) (Figura 21B, C e D). Vale ressaltar que para todas as citocinas avaliadas nos linfonodos inguinais, houve redução no 14° d.p.i., mas apresentaram tendência à reversão nos pontos posteriores da avaliação.

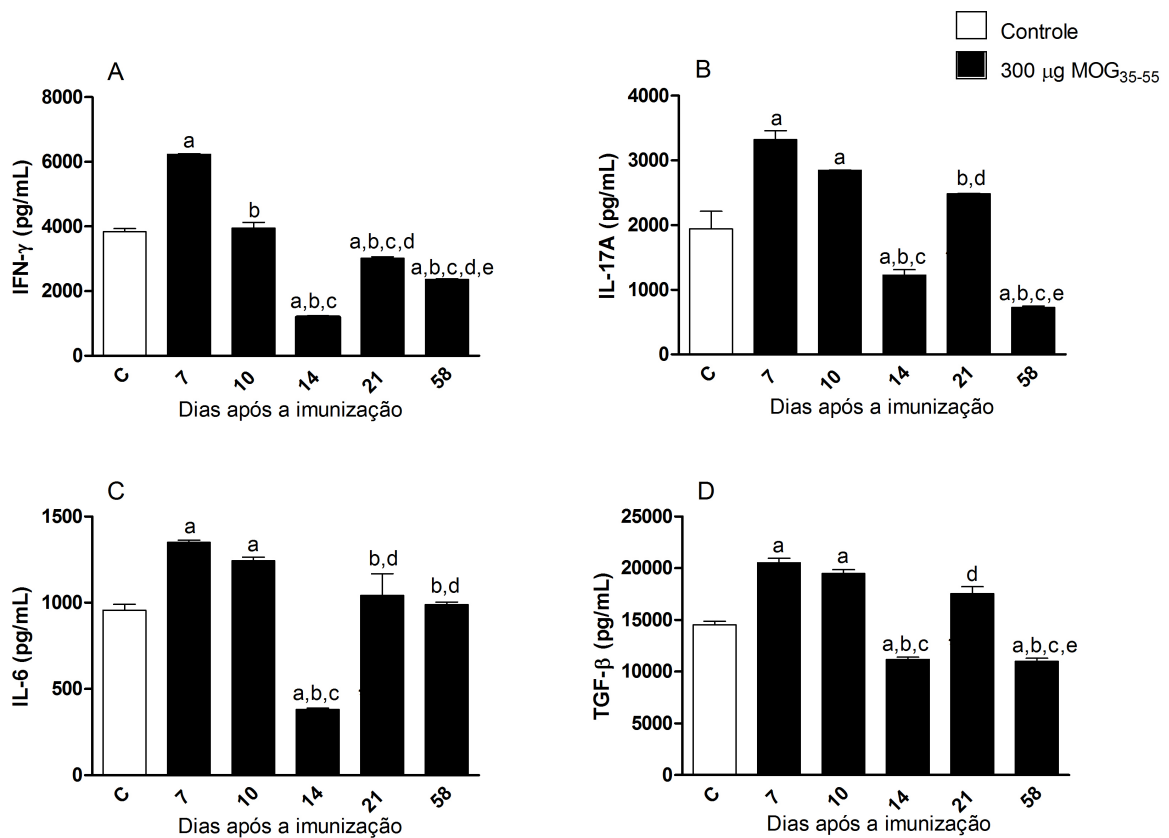


Figura 21 Concentração das citocinas do perfil Th1 e Th17 (A) IFN- γ , (B) IL-17A, (C) IL-6 e (D) TGF- β no homogenato de linfonodos inguinais de camundongos C57BL/6 imunizados ou não com 300 μ g do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, (n=6 animais por grupo), avaliadas por ELISA, nos dias 7, 10, 14, 21 e 58 pós-imunização. a = $p < 0,05$ versus o grupo controle; b = $p < 0,05$ versus o 7° d.p.i.; c = $p < 0,05$ versus o 10° d.p.i.; d = $p < 0,05$ versus o 14° d.p.i.; e = $p < 0,05$ versus o 21° d.p.i.

PARTE III

COMPARAÇÃO ENTRE OS PROTOCOLOS DE INDUÇÃO DE EAE COM 100 OU 300 µg DO PEPTÍDEO MOG₃₅₋₅₅

5.21 COMPARAÇÃO DA ANÁLISE HISTOLÓGICA DO CÉREBRO

Não houve diferença significativa em relação à pontuação do escore clínico, durante os 58 dias avaliados, entre os grupos de animais imunizados com 100 ou 300 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, porém o perfil de produção de citocinas e quimiocinas e o infiltrado celular observado nos cortes histológicos de cérebro apresentaram diferença entre os grupos imunizados. O 7° e o 14° d.p.i. constituem os pontos de maior diferença dos parâmetros avaliados entre os dois protocolos de indução utilizados e por esta razão foram selecionados para a comparação do perfil histológico, produção de citocinas e quimiocinas.

Inicialmente, cortes histológicos dos cérebros, corados por H&E, de animais não imunizados e imunizados com 100 ou 300 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, nos dias 7 e 14 pós-imunização, foram analisados e comparados. Os animais do grupo controle, não imunizado, apresentaram padrão parenquimatoso habitual no cérebro. Os animais do grupo imunizado com 100 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅ apresentaram infiltrado celular associado à congestão e ectasia vascular, já a partir do 7° d.p.i.. Os animais do grupo imunizado com 300 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, neste mesmo ponto, apresentaram aspecto histológico semelhante ao encontrado no grupo controle não imunizado.

Outra diferença interessante ocorreu no 14° d.p.i., quando o grupo de animais imunizados com 100 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅ apresentou infiltrado inflamatório intenso, quando comparado ao grupo imunizado com 300 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅ (Figura 22).

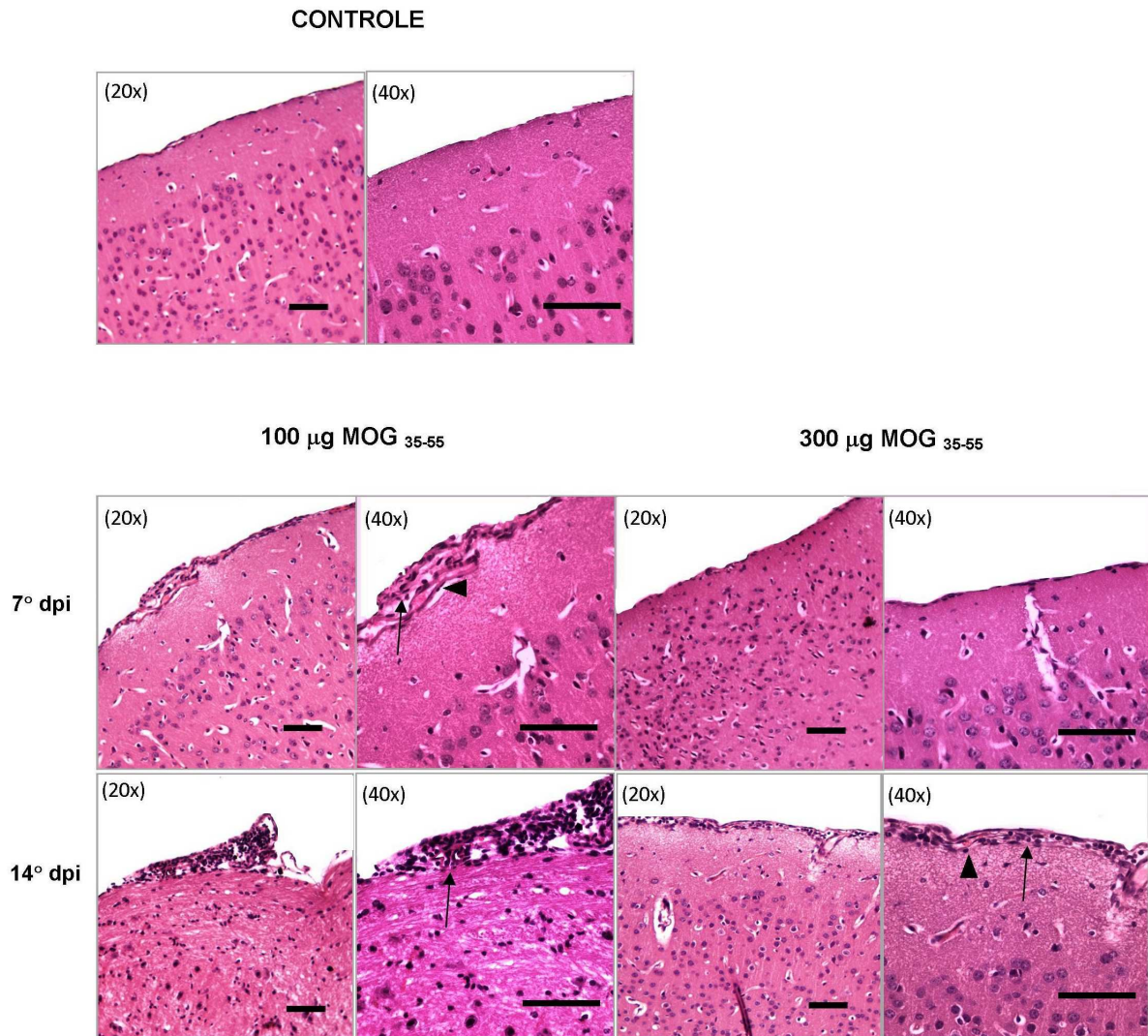


Figura 22. Análise histológica de cortes frontais do cérebro de camundongos C57BL/6 não imunizados e imunizados com 100 ou 300 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, (n=3 animais por grupo). As figuras são representativas da análise histológica de cada grupo experimental: grupo controle, não imunizado, grupo imunizado com 100 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅ e grupo imunizado com 300 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, nos dias 7 e 14 pós-imunização. O grupo controle apresentou histologia normal sem regiões inflamatórias. O grupo imunizado com 100 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅ apresentou focos de infiltrado celular inflamatório meningeano (seta) associado à congestão e ectasia vascular (ponta de seta) no 7° d.p.i., que não foram observados no grupo imunizado com 300 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅. No 14° d.p.i. o infiltrado inflamatório (seta) era intenso no grupo imunizado com 100 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅ em relação ao infiltrado observado no grupo imunizado com 300 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅. Coloração H&E. Magnificação de 20x e 40x, escala de barra = 50 µm.

5.22 COMPARAÇÃO DOS NÍVEIS DAS QUIMIOCINAS CCL5 E CCL20 EM HOMOGENATO DE CÉREBRO

Os níveis de produção das quimiocinas CCL5 e CCL20 foram determinados em homogenato de cérebro dos animais não imunizados e imunizados com 100 ou 300 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, nos dias 7 e 14 pós-imunização.

Os animais do grupo imunizado com 100 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, quando comparados aos animais do grupo imunizado com 300 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅ apresentaram níveis de CCL5 (6896±534,3 e 1082±152,1, respectivamente) e CCL20 (1681±183,7 e 192,3±62,1, respectivamente) mais elevados no 7° d.p.i.. No 14° d.p.i. os animais do grupo imunizado com 100 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅ e do grupo imunizado com 300 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅ também apresentavam níveis elevados de CCL5 (7695±823,9 e 3630±266,5, respectivamente) e de CCL20 (1569±161,0 e 965,1±79,7, respectivamente) ($p < 0,05$) (Figura 23A e B).

Os valores encontrados para as quimiocinas no cérebro estão em concordância ao observado na análise histológica, que mostrou infiltrado celular mais intenso no grupo imunizado com 100 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅ no 7° e no 14° d.p.i..

Além disso, ocorreu aumento da produção das quimiocinas CCL5 e CCL20 no grupo imunizado com 300 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, no 14° d.p.i., em relação ao 7° d.p.i. ($p < 0,05$), reforçando o observado nos cortes histológicos que mostraram que no 7° d.p.i., os animais do grupo imunizado com 300 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, apresentavam discreto infiltrado celular e aspecto histológico semelhante ao encontrado no controle negativo na região próxima ao plexo coróide e este infiltrado aumentou no 14° d.p.i..

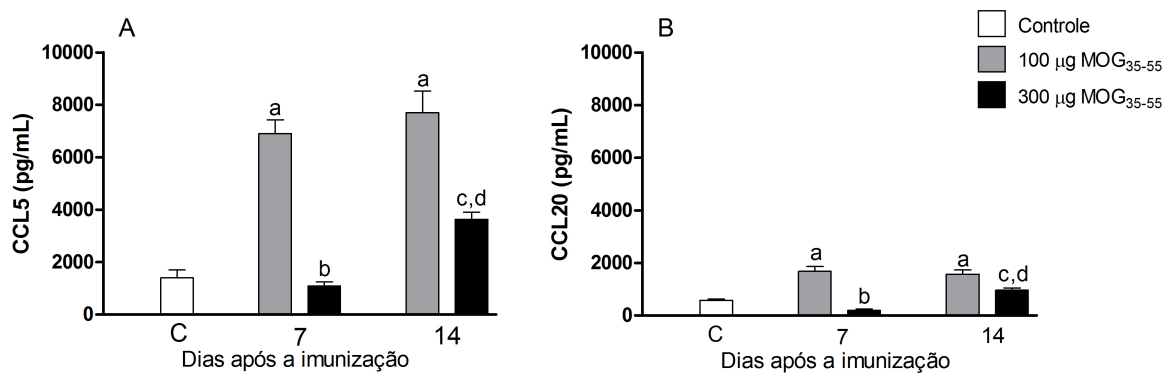


Figura 23 Concentração das quimiocinas (A) CCL5 e (B) CCL20 no homogenato de cérebro de camundongos C57BL/6 não imunizados e imunizados com 100 ou 300 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, (n=6 animais por grupo), avaliadas por ELISA, nos dias 7 e 14 pós-imunização. a = p<0,05 versus o grupo controle; b = p<0,05 versus o 100 µg MOG, 7° d.p.i.; c = p<0,05 versus o 300 µg MOG, 7° d.p.i.; d = p<0,05 versus o 100 µg MOG, 14° d.p.i.

5.23 COMPARAÇÃO DOS NÍVEIS DAS CITOCINAS IFN- γ , TNF- α e IL-1 β EM HOMOGENATO DE CÉREBRO E MEDULA ESPINHAL

Os níveis de produção das citocinas de perfil Th1 (IFN- γ , TNF- α e IL-1 β) foram determinados em homogenato de cérebro e medula espinhal dos animais não imunizados e imunizados com 100 ou 300 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, nos dias 7 e 14 pós-imunização.

No cérebro, o grupo de animais imunizados com 100 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, apresentou níveis de IFN- γ mais elevados, do que o grupo imunizado com 300 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, no 7° d.p.i. (1520 \pm 132,7 e 199,8 \pm 13,2, respectivamente) e no 14° d.p.i. (1190 \pm 94,3 e 721,1 \pm 42,6, respectivamente). Além disso, o grupo de animais imunizados com 300 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, mostrou aumento desta citocina no 14° d.p.i., em relação ao 7° d.p.i.. O que reforça novamente as observações realizadas nos cortes histológicos do cérebro, que mostram aumento do infiltrado celular no 14° d.p.i., em relação ao 7° d.p.i. (p<0,05) (Figura 24A).

Na medula espinhal, os níveis de IFN- γ foram mais elevados no grupo imunizado com 100 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, em relação ao grupo imunizado com 300 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅ (2151 \pm 154,9 e 670,1 \pm 99,1, respectivamente), somente

no 7° d.p.i. ($p < 0,05$). No 14° d.p.i. não ocorreu diferença significativa entre os grupos imunizados (Figura 24B).

Em relação às citocinas TNF- α e IL-1 β , no cérebro, foi observado que os animais do grupo imunizado com 100 μ g do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, quando comparados aos animais do grupo imunizado com 300 μ g do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, apresentaram no 7° d.p.i., níveis mais elevados de IL-1 β ($1937 \pm 118,3$ e $675,2 \pm 39,5$, respectivamente) e de TNF- α ($365,6 \pm 26,6$ e $106,5 \pm 13,9$, respectivamente). No 14° d.p.i. não ocorreu diferença significativa entre os grupos imunizados. Semelhante ao observado nos dados do IFN- γ , o grupo de animais imunizados com 300 μ g do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, mostrou aumento destas citocinas no 14° d.p.i., em relação ao 7° d.p.i. ($p < 0,05$) (Figura 24C e D).

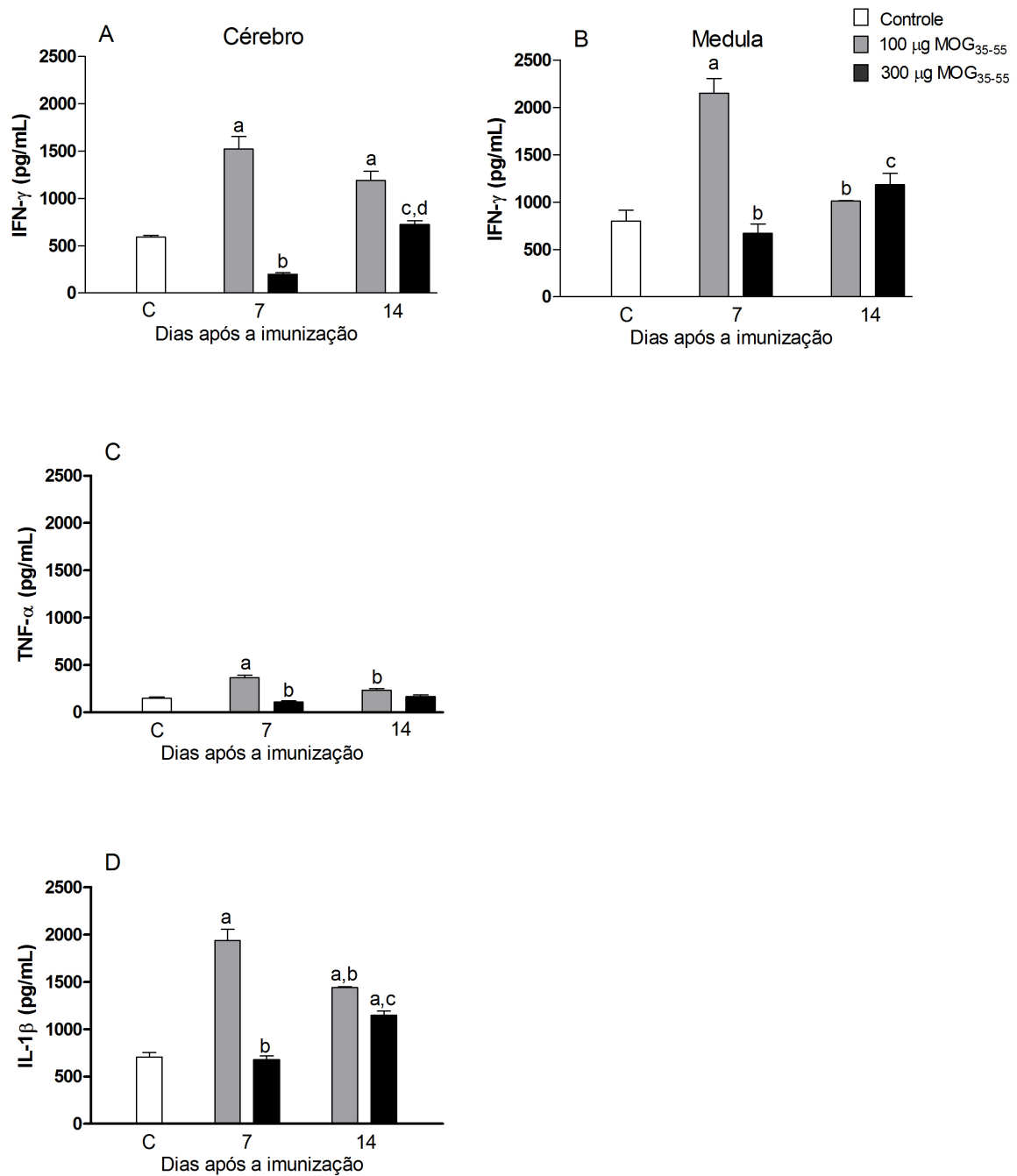


Figura 24 Concentração das citocinas do perfil Th1 (IFN- γ , TNF- α e IL-1 β) no cérebro (A, C e D, respectivamente) e IFN- γ na medula espinhal (B) no homogenato de cérebro e medula espinhal de camundongos C57BL/6 não imunizados e imunizados com 100 ou 300 μ g do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, (n=6 animais por grupo), avaliadas por ELISA, nos dias 7 e 14 pós-imunização. a = $p < 0,05$ versus o grupo controle; b = $p < 0,05$ versus o 100 μ g MOG, 7° d.p.i.; c = $p < 0,05$ versus o 300 μ g MOG, 7° d.p.i.; d = $p < 0,05$ versus o 100 μ g MOG, 14° d.p.i.

5.24 COMPARAÇÃO DOS NÍVEIS DAS CITOCINAS IL-17A, IL-6 e TGF- β EM HOMOGENATO DE CÉREBRO E MEDULA ESPINHAL

Os níveis de produção das citocinas de perfil Th17 (IL-17A, IL-6 e TGF- β) foram determinados em homogenato de cérebro e medula espinhal dos animais não imunizados e imunizados com 100 ou 300 μg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, nos dias 7 e 14 pós-imunização.

A citocina IL-17A, no 7° d.p.i., apresentou níveis mais elevados no grupo de animais imunizados com 100 μg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, quando comparados aos animais do grupo imunizado com 300 μg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, no cérebro ($374,7 \pm 22,8$ e $274 \pm 21,0$, respectivamente) e na medula espinhal ($203,6 \pm 19,0$ e $87,3 \pm 1,5$, respectivamente) ($p < 0,05$) (Figura 25A e B). Além disso, na medula, no 14° d.p.i., ocorreu inversão desse padrão de resultados e o grupo imunizado com 100 μg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅ ($42,6 \pm 8,1$) apresentou menor produção de IL-17A, do que o grupo imunizado com 300 μg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅ ($130,4 \pm 2,8$) ($p < 0,05$) (Figura 25B).

As citocinas IL-6 e TGF- β apresentaram o mesmo perfil de resultados encontrados para a citocina IL-17A. A IL-6 apresentou níveis mais elevados no grupo de animais imunizados com 100 μg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, quando comparados aos animais do grupo imunizado com 300 μg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, no 7° d.p.i., no cérebro ($523,8 \pm 33,7$ e $223,5 \pm 12,1$, respectivamente) (Figura 25C) e na medula espinhal ($175,5 \pm 0,6$ e $105,3 \pm 7,8$, respectivamente) ($p < 0,05$) (Figura 25D). O TGF- β , no 7° d.p.i., também apresentou níveis mais elevados no grupo de animais imunizados com 100 μg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, no cérebro ($10156 \pm 863,4$ e $1489 \pm 111,5$, respectivamente) e na medula ($3626 \pm 102,8$ e $2274 \pm 319,1$, respectivamente) ($p < 0,05$) (Figura 25E e F). No 14° d.p.i., os níveis de TGF- β foram menores no grupo de animais imunizados com 100 do peptídeo de MOG₃₅₋₅₅ ($1258 \pm 40,6$) quando comparado ao grupo de animais imunizados com 300 μg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅ ($3636 \pm 322,8$) na medula ($p < 0,05$) (Figura 25F). Os resultados encontrados para as citocinas de perfil Th17 também reforçam os dados encontrados na análise histológica.

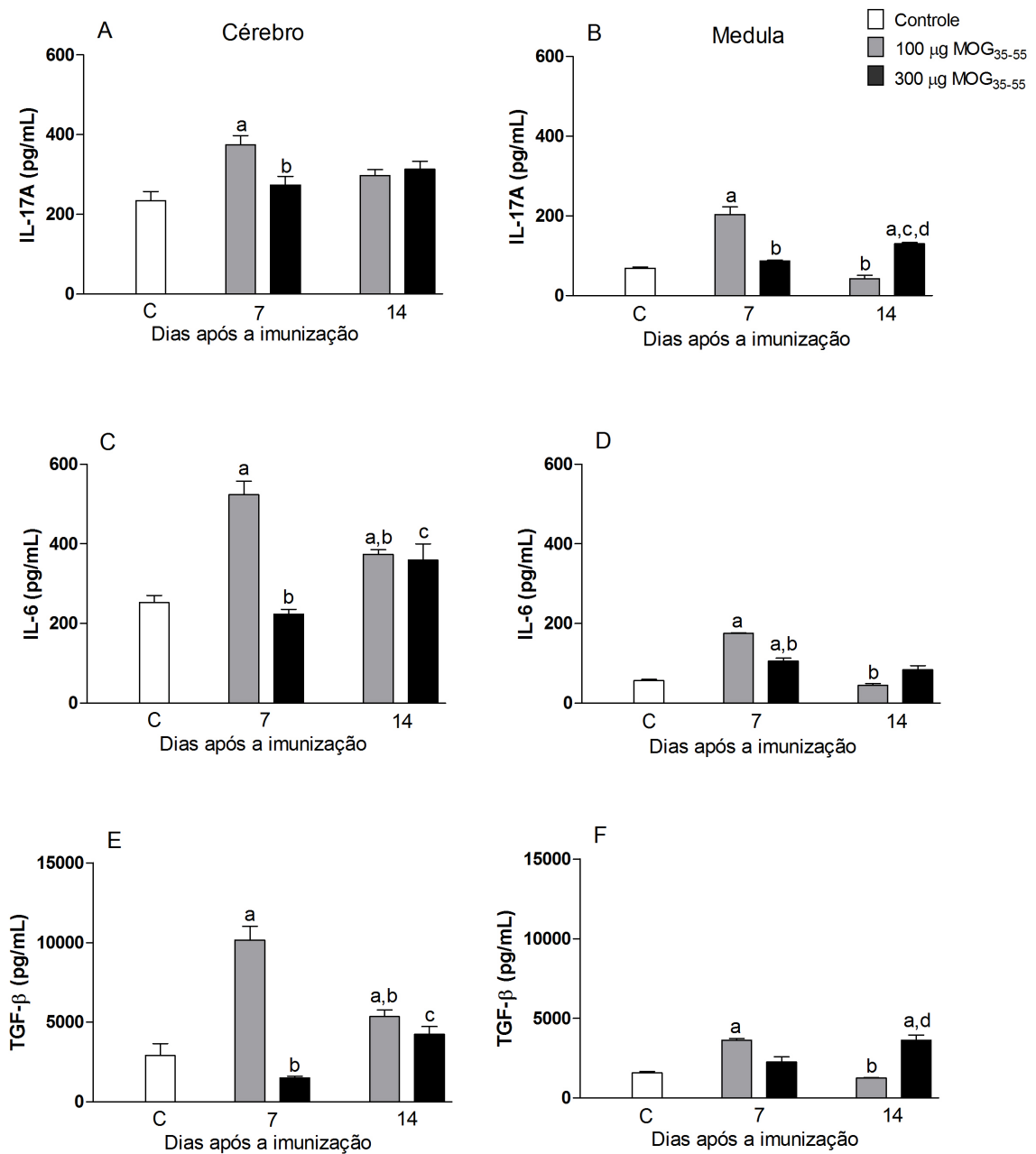


Figura 25 Concentração das citocinas do perfil Th17 (IL-17A, IL-6 e TGF- β) no homogenato de cérebro (A, C e E, respectivamente) e IL-17A, IL-6 e TGF- β no homogenato de medula espinhal (B, D e F, respectivamente) de camundongos C57BL/6 não imunizados e imunizados com 100 ou 300 μ g do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, (n=6 animais por grupo), avaliadas por ELISA, nos dias 7 e 14 pós-imunização. a = $p < 0,05$ versus o grupo controle; b = $p < 0,05$ versus o 100 μ g MOG, 7° d.p.i.; c = $p < 0,05$ versus o 300 μ g MOG, 7° d.p.i.; d = $p < 0,05$ versus o 100 μ g MOG, 14° d.p.i.

5.25 COMPARAÇÃO DOS NÍVEIS DA CITOCINA IL-10 EM HOMOGENATO DE CÉREBRO E MEDULA ESPINHAL

Os níveis de produção da citocina IL-10 foram determinados em homogenato de cérebro e medula espinhal dos animais não imunizados e imunizados com 100 ou 300 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, nos dias 7 e 14 pós-imunização.

No cérebro, os animais do grupo imunizado com 100 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅ (565±49,5), quando comparados aos animais do grupo imunizado com 300 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅ (230,4±14,5) apresentaram níveis mais elevados de IL-10 no 7° d.p.i. ($p < 0,05$). No 14° não ocorreu diferença significativa entre os grupos. Foi observado redução dos níveis de IL-10 do 7° d.p.i., para o 14° d.p.i., nos animais imunizados com 100 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅ (565±49,5 e 392±20,8, respectivamente), e aumento nos animais imunizados com 300 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅ (230,4±14,5 e 324±26,3, respectivamente) ($p < 0,05$) (Figura 26A).

Na medula, os animais do grupo imunizado com 100 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, quando comparados aos animais do grupo imunizado com 300 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, apresentaram nível de IL-10 maior no 7° d.p.i. (395,4±35,3 e 248,4±12,2, respectivamente) e menor no 14° d.p.i. (140,8±4,3 e 376,2±35,2, respectivamente). Além disso, foi observado aumento dos níveis de IL-10 do 7° d.p.i., para o 14° d.p.i., nos animais imunizados com 300 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅ ($p < 0,05$) (Figura 26B).

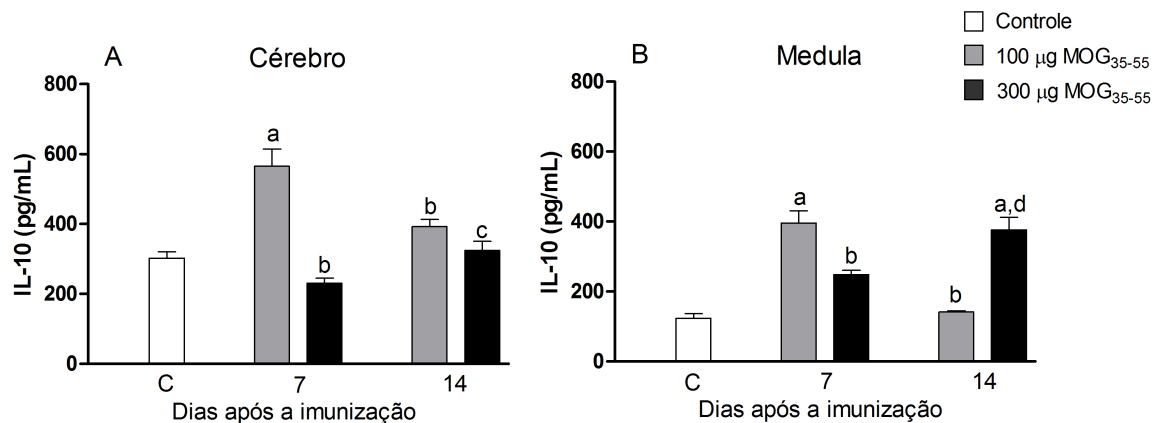


Figura 26 Concentração da citocina IL-10 no homogenato de (A) cérebro e (B) medula espinal de camundongos C57BL/6 não imunizados e imunizados com 100 ou 300 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, (n=6 animais por grupo), avaliada por ELISA, nos dias 7 e 14 pós-imunização. a = p<0,05 versus o grupo controle; b = p<0,05 versus o 100 µg MOG, 7° d.p.i.; c = p<0,05 versus o 300 µg MOG, 7° d.p.i.; d = p<0,05 versus o 100 µg MOG, 14° d.p.i.

5.26 COMPARAÇÃO DOS NÍVEIS DAS CITOCINAS IFN- γ , IL-17A, IL-6 e TGF- β EM HOMOGENATO DE LINFONODOS INGUINAIS

Os níveis de produção das citocinas de perfil Th1 (IFN- γ) e Th17 (IL-17A, IL-6 e TGF- β) foram determinados em homogenato de linfonodos inguiniais dos animais não imunizados e imunizados com 100 ou 300 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, nos dias 7 e 14 pós-imunização.

Em contraste ao observado no cérebro e na medula espinal, os animais do grupo imunizado com 100 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, não apresentaram aumento dos níveis das citocinas IFN- γ , IL-17A, IL-6 e TGF- β no homogenato de linfonodos inguiniais no 7° d.p.i.. Por outro lado, os animais do grupo imunizado com 300 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, apresentaram aumento precoce dos níveis destas citocinas, no 7° d.p.i.. Além disso, os animais imunizados com 100 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅ apresentaram aumento nos níveis das citocinas IFN- γ (3966±49,5 e 6833±18,5), IL-17A (1654±0,9 e 2752±68,9), IL-6 (875,3±10,8 e 1521±31,8) e TGF- β (12094±166,8 e 18104±144,3) do 7° d.p.i., para o 14° d.p.i., enquanto no grupo de animais imunizados com 300 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, as citocinas IFN- γ (6230±19,8 e

1191±11,8), IL-17A (3320±137,4 e 1229±81,2), IL-6 (1350±13,23 e 380±9,2) e TGF- β (20538±437,2 e 11181±217,2) apresentaram redução do 7° d.p.i., para o 14° d.p.i. ($p < 0,05$) (Figura 27A, B, C, D, E e F).

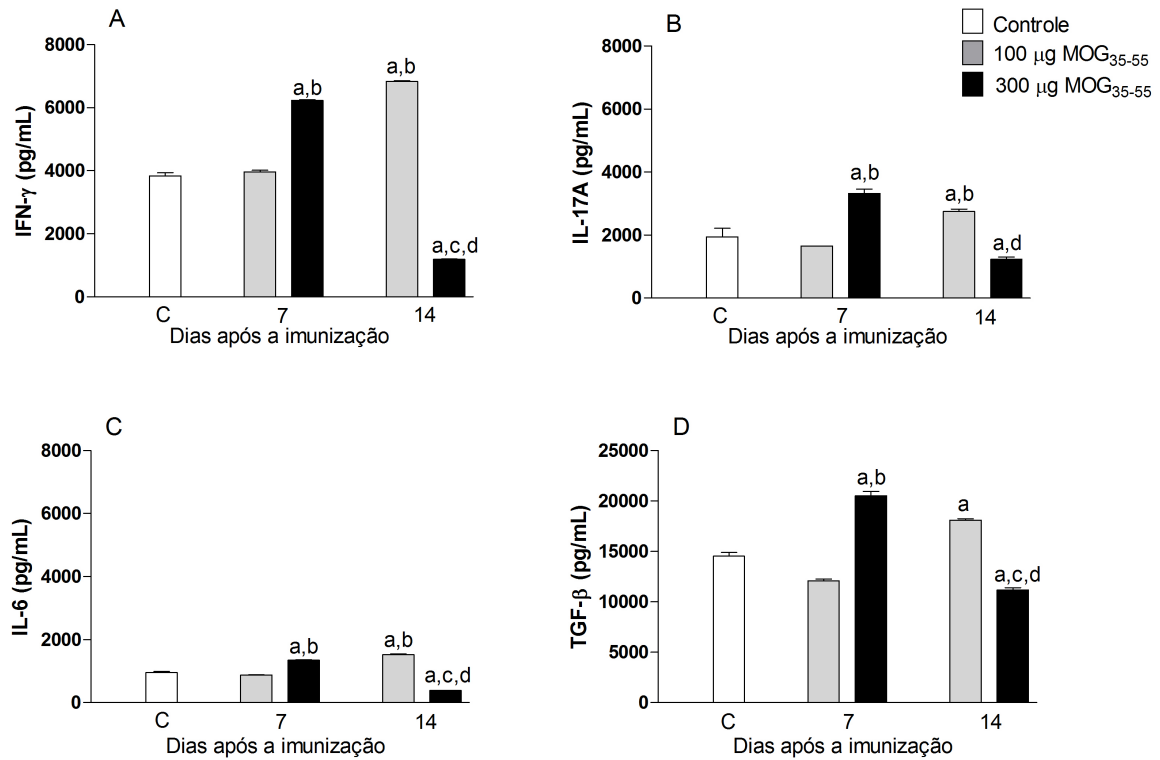


Figura 27 Concentração das citocinas do perfil Th1 e Th17 (A) IFN- γ , (B) IL-17A, (C) IL-6 e (D) TGF- β no homogenato de linfonodos inguinais de camundongos C57BL/6 não imunizados e imunizados com 100 ou 300 μ g do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, (n=6 animais por grupo), avaliadas por ELISA, nos dias 7 e 14 pós-imunização. a = $p < 0,05$ versus o grupo controle; b = $p < 0,05$ versus o 100 μ g MOG, 7° d.p.i.; c = $p < 0,05$ versus o 300 μ g MOG, 7° d.p.i.; d = $p < 0,05$ versus o 100 μ g MOG, 14° d.p.i.

6 DISCUSSÃO

A encefalomielite autoimune experimental é uma doença inflamatória do SNC, mediada por células T CD4⁺, amplamente utilizada como modelo experimental no estudo da esclerose múltipla. Durante os últimos 30 anos, a EAE tornou-se um dos modelos animais mais bem sucedidos na pesquisa básica, pré-clínica e de células T em imunologia. De fato, a EAE em suas múltiplas variantes não só reproduz as características histopatológicas da EM, como também é um modelo adequado para estudar o desenvolvimento de células T, durante as reações imunológicas (revisto por HART, GRAN, WEISSERT, 2011).

A heterogeneidade clínica é uma importante característica da EM que também está presente na EAE (LUBLIN et al., 2007; WEINER, 2009). O modelo experimental pode seguir cursos remittente-recorrente ou crônico que podem se aproximar das características das formas RR ou progressivas da EM. Diversos grupos têm estudado a patologia dessas duas formas de EAE e mostrado diferenças na produção de citocinas, de anticorpos e na regulação da resposta imunológica (BEGOLKA et al., 1998; ZHANG et al., 2004; KUERTEN et al., 2007; KUERTEN et al., 2011) porém, os mecanismos envolvidos na patogênese e que determinam o perfil de evolução clínica da EAE permanecem pouco compreendidos.

Alguns estudos discutiram o padrão de evolução clínica e de resposta imunológica neste modelo experimental como sendo consequência de variações na indução da EAE, tais como, a linhagem do animal utilizado, a dose administrada de adjuvantes (*M. tuberculosis* e toxina pertussis), as diferenças na dose e variações na natureza do antígeno (BILLIAU; MATTHYS, 2001; BERARD et al., 2010; KUERTEN et al., 2011). Contudo, não está totalmente esclarecido como uma dessas variáveis separadamente poderia determinar diferenças na resposta imunológica durante o curso clínico da EAE.

Nosso grupo está há cinco anos trabalhando com o modelo de EAE induzido com o peptídeo MOG₃₅₋₅₅ em camundongos C57BL/6, no qual estão sendo estudados os efeitos de drogas de origem natural ou sintética. Entretanto, a grande diversidade de protocolos de indução existentes nos levou a questionar qual seria o melhor modelo para reproduzir aspectos específicos da EM e que permitiria o desenvolvimento de terapias mais promissoras. Portanto, a compreensão de como cada protocolo de indução influencia o perfil clínico e a resposta imunológica é

importante para a escolha do modelo a ser utilizado nos estudos pré-clínicos para a avaliação de novas terapias (revisado por HART, GRAN, WEISSERT, 2011).

Desta forma, neste trabalho buscou-se avaliar somente a influência da concentração do antígeno MOG₃₅₋₅₅ sobre o curso clínico, o infiltrado celular inflamatório e a modulação da resposta imunológica na EAE, induzida em camundongos da linhagem C57BL/6, utilizando o antígeno MOG₃₅₋₅₅ em duas concentrações diferentes (100 ou 300 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅) e mantendo-se constantes as concentrações de *M. tuberculosis* (4 mg/mL) e toxina pertussis (300 ng).

Inicialmente, foi observado que todos os animais imunizados, acompanhados durante 58 dias após a imunização, desenvolveram os sinais clínicos da EAE entre o 8° e o 14° d.p.i. e estes dados estão de acordo com resultados encontrados na literatura (STROMNES e GOVERMAN, 2004; BROWN e SAWCHENKO, 2007; MURPHY et al., 2010). Entretanto, não houve diferença significativa em relação à pontuação do escore clínico entre os grupos de animais imunizados com 100 ou 300 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, ou seja, a variação somente na concentração do antígeno MOG₃₅₋₅₅ não foi capaz de induzir cursos clínicos diferentes neste modelo.

Corroborando com estas observações, Shao e colaboradores (2004) também não encontraram diferenças em relação à pontuação do escore clínico entre os grupos de animais imunizados, ao induzirem o modelo de EAE em camundongos da linhagem C57BL/6, utilizando duas diferentes concentrações do antígeno MOG₃₅₋₅₅ (200 ou 50 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅) e mantendo constantes as concentrações de *M. tuberculosis* (600 µg/mL) e toxina pertussis (400 ng).

Porém, os resultados encontrados no presente trabalho e os apresentados pelo grupo de Shao (2004) diferem dos observados no estudo de Berard e colaboradores (2010), no qual a EAE foi induzida em camundongos da linhagem C57BL/6 através da utilização do antígeno MOG₃₅₋₅₅ em duas concentrações diferentes (50 ou 300 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅) e variando-se também as concentrações de *M. tuberculosis* (1 mg/mL ou 4 mg/mL) e de toxina pertussis (200 ou 300 ng), sendo que estes dois protocolos foram capazes de promover o desenvolvimento das formas RR e crônica, comprovado pela avaliação do escore clínico, perfil celular e análise histológica do SNC.

Portanto, estas observações sugerem que a variação nas concentrações dos adjuvantes *M. tuberculosis* e toxina pertussis parecem ter papel importante no desenvolvimento de perfis clínicos diferentes na EAE, além de reforçarem os argumentos propostos pela hipótese microbiana. Segundo esta hipótese, infecções microbianas poderiam desencadear respostas imunológicas contra antígenos próprios e este fenômeno pode estar relacionado ao desenvolvimento de autoimunidade, tal como ocorre na EM. Possivelmente, alguma molécula microbiana com epítipo que mimetize a mielina, promove a ativação inicial das células T específicas para a mielina na periferia (FUJINAMI e OLDSTONE, 1985), que posteriormente são capazes de reconhecer estas proteínas no SNC e iniciar o processo inflamatório local (LEHMANN et al., 1992).

Em modelos animais, foi proposto que uma infecção microbiana (COHEN, 2001), ou até mesmo a administração de forte adjuvante (THEIL et al., 2001), poderia induzir um estado imunológico temporário para o qual foi atribuída a terminologia "campo fértil". Neste estado imunológico favorável, no qual já existem células T ativadas, o contato com auto-antígenos poderia resultar no desenvolvimento da resposta imunológica auto-agressiva que promoveria patogenicidade (VON HERRATH, FUJINAMI e WHITTON, 2003). Portanto, diferentes concentrações dos adjuvantes poderiam influenciar a resposta imunológica e desempenhar papel importante no desenvolvimento de perfis clínicos distintos.

Por outro lado, os resultados mostram diferenças em relação ao infiltrado celular presente nos cortes histológicos de cérebro e no perfil de produção de quimiocinas e citocinas no SNC e linfonodos inguinais dos animais, mesmo na ausência de evoluções clínicas distintas. Estes dados sugerem que a concentração do antígeno MOG₃₅₋₅₅ é capaz de influenciar parâmetros imunológicos e histológicos, tais como, a produção de citocinas pró-inflamatórias e o infiltrado celular no SNC.

O infiltrado celular inflamatório no SNC é uma característica patológica importante, tanto na EM, quanto na EAE (PRINEAS e WRIGHT, 1978; ADAMS et al., 1989). O recrutamento de leucócitos para a microcirculação cerebral, em diferentes condições inflamatórias, depende da expressão de moléculas de adesão em leucócitos (selectinas e integrinas) e seus ligantes nas células endoteliais (VCAM-1

e ICAM-1) (TANG et al, 1996; KERFOOT E KUBES, 2002; JAMES et al, 2003). Embora os mecanismos de regulação da entrada de leucócitos no SNC ainda não tenham sido totalmente compreendidos, atribui-se às quimiocinas papel importante na regulação da expressão de moléculas de adesão em linfócitos, assim como a migração destas células para o SNC (RANSOHOFF, 2002; BABCOCK e OWENS, 2003).

No presente trabalho, os dados encontrados para as quimiocinas CCL5 e CCL20 no cérebro estão em concordância ao observado em relação ao infiltrado celular avaliado. A concentração elevada de quimiocinas no 7° d.p.i. coincidiu com a presença de infiltrado celular inflamatório no grupo de animais imunizados com 100 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅. Já nos animais imunizados com 300 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, cujos níveis de quimiocinas estavam elevados somente a partir do 10° d.p.i., não foi observado infiltrado inflamatório no cérebro no 7° d.p.i. No 10° d.p.i., os animais do grupo imunizado apresentaram discreto processo inflamatório.

Além disso, no grupo imunizado com 100 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, o infiltrado celular foi mais intenso e os níveis de quimiocinas mais elevados no 14° d.p.i.. Estes dados mostram que o perfil de produção de quimiocinas e o infiltrado celular inflamatório no cérebro diferiram no início da doença entre os dois grupos, entretanto, esta diferença não resultou em evoluções clínicas distintas entre os grupos imunizados em nenhum dos pontos avaliados.

Shao e colaboradores (2004) ao induzirem o modelo de EAE com duas concentrações do peptídeo MOG₃₅₋₅₅ e concentrações constantes de adjuvantes, também observaram diferenças histológicas no início da doença, entre os grupos imunizados com 200 ou 50 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, mesmo na ausência de diferenças na pontuação do escore clínico entre estes dois grupos. Os resultados encontrados pelo grupo de Shao (2004) e os observados neste trabalho sugerem que a concentração do antígeno MOG₃₅₋₅₅ influencia as características do infiltrado celular inflamatório e as lesões no SNC durante o desenvolvimento da EAE.

Resultados diferentes foram apresentados por Berard e colaboradores (2010) ao induzirem as formas RR e crônica (CR) de EAE, nas quais não foi possível verificar diferença no número de lesões no SNC entre os dois grupos no início da doença, 9° d.p.i. para o modelo CR e 8° d.p.i. para o modelo RR. Apesar de ter progredido, significativamente, até o pico da doença, a diferença entre as lesões na medula espinhal dos grupos imunizados CR ou RR não foram significativas, ainda

que tenha ocorrido diferença no escore clínico entre os grupos. Entretanto, na fase progressiva da doença, entre o 21° e o 26° d.p.i., as lesões no grupo CR permaneceram elevadas, em contraste com o grupo RR no qual foi verificada uma redução das lesões, sendo esta diferença também observada no escore clínico que permaneceu elevado no grupo CR.

Os resultados do presente estudo demonstraram também que o aumento do infiltrado celular e dos níveis de quimiocinas no cérebro coincidiu com o aumento da pontuação do escore clínico em ambos os grupos imunizados. Entretanto, no 58° d.p.i., apesar da redução do infiltrado celular e dos níveis de quimiocinas, o escore dos animais permaneceu elevado. Neste ponto mais tardio de avaliação dos parâmetros, o fator responsável pela manutenção do escore clínico, possivelmente seria o processo de desmielinização. Estudos mostram que as lesões à bainha de mielina levam a deficiência ou completa perda da transmissão do impulso nervoso, causando assim, sinais e sintomas neurológicos intermitentes que com a evolução da doença podem agravar-se progressivamente (DeLUCA et al., 2006; BROWN e SAWCHENKO, 2007; FRISCHER et al., 2009).

Quando correlacionado o curso clínico da EAE com os níveis de citocinas no SNC, observa-se que a maioria das citocinas pró-inflamatórias, tanto do perfil Th1 (IL-12, IFN- γ , TNF- α e IL-1 β) quanto Th17 (IL-17, TGF- β e IL-6), em ambos os grupos, apresentaram-se mais elevadas durante a fase aguda da doença, entre o 7° e o 14° d.p.i., pontos que antecedem o início e o pico do escore clínico, respectivamente. A exceção ocorreu para o IFN- γ na medula espinhal do grupo imunizado com 300 μ g do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, que apresentou níveis mais elevados no 21° d.p.i.. Este aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias no SNC, que antecede o pico de escore clínico nos dois grupos estudados está de acordo com os resultados encontrados em um estudo que avaliou a indução de EAE utilizando 150 μ g do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, 4 mg/mL de *M. tuberculosis* e 500 ng de toxina pertussis (MURPHY et al., 2010).

A produção de IL-12p40 também foi avaliada neste trabalho e os níveis elevados encontrados no cérebro de animais do grupo imunizado com 300 μ g do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, correlacionados a baixos níveis de produção de IFN- γ , poderiam ser explicados pela possibilidade de ligação da fração IL-12p40 a IL-23p19 resultando na formação de IL-23. A citocina IL-12 é indutora da produção de IFN- γ

por células T, células NK, e outros tipos celulares, promovendo a diferenciação de células Th1. Esta citocina apresenta duas cadeias, P40 e P35, ligadas covalentemente formando um heterodímero. Entretanto, IL-12p40 pode associar-se não só a cadeia IL-12p35, formando IL-12p70, mas também a cadeia IL-23p19, para formar outra citocina heterodimérica, a IL-23 (revisto por HUNTER, 2005).

Os resultados encontrados para as citocinas pró-inflamatórias (IL-12, IFN- γ , IL-1 β , TNF- α , IL-17 e IL-6) no cérebro e na medula espinhal, mostram que o grupo de camundongos imunizados com 100 μ g do peptídeo MOG₃₅₋₅₅ apresentou níveis elevados a partir do 7° d.p.i.. Enquanto, o aumento destas citocinas no grupo de animais imunizados com 300 μ g do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, ocorreu somente a partir do 10° d.p.i.. Vale ressaltar que estes dados estão em concordância ao observado para o infiltrado celular inflamatório avaliado nos cortes histológicos e níveis de produção de quimiocinas no cérebro.

Desta forma, o infiltrado celular inflamatório e os níveis de citocinas pró-inflamatórias no cérebro do grupo imunizado com 100 μ g do peptídeo MOG₃₅₋₅₅ observados no 7° d.p.i., sugerem que a migração de células T para o SNC parece ocorrer precocemente neste grupo e pode ser consequência do aumento dos níveis das quimiocinas CCL5 e CCL20, no cérebro, já neste ponto. Por outro lado, as quimiocinas CCL5 e CCL20 no grupo de animais imunizados com 300 μ g do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, estavam elevadas somente a partir do 10 d.p.i, o que pode ter resultado em recrutamento mais tardio de macrófagos, células Th1 e Th17 para o SNC, confirmados pela presença do infiltrado inflamatório a partir do 10° d.p.i., o que justificaria o aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias somente a partir deste ponto.

Estudo realizado por Santos e colaboradores (2005) mostrou que a quimiocina CCL5 exerce importante papel no recrutamento de células para o SNC. Ao utilizar anticorpos anti-CCL5, verificaram a inibição da adesão dos linfócitos aos microvasos do cérebro. Como a adesão é um passo essencial para a migração dos leucócitos para os tecidos, esta observação sugere que a CCL5 pode afetar a capacidade dos linfócitos de migrar para o SNC e, conseqüentemente, poderia influenciar nos picos de produção das citocinas pró-inflamatórias.

Pode-se sugerir ainda que a produção mais tardia de citocinas e quimiocinas na imunização com 300 μ g do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, pode estar relacionada a algum

mecanismo regulador ou de tolerância, induzido pela elevada concentração de antígeno MOG₃₅₋₅₅. A tolerância pode ser induzida através da exclusão de células T auto-agressivas, mas também através da expansão e diferenciação de células T que regulam ou suprimem a resposta imunológica. Esta tolerância também pode ser induzida por complexas interações celulares entre células dendríticas e células T regulatórias CD4⁺CD25⁺ (CHEN et al., 2003; WING e SAKAGUCHI, 2010).

Alguns estudos demonstraram que células T regulatórias CD4⁺CD25⁺ desempenham papel importante na regulação de respostas autoimunes em camundongos e foram identificadas também em seres humanos (TAKAHASHI et al., 1998; BAECHER-ALLAN et al., 2001; JONULEIT et al., 2001). O mecanismo de ação destas células envolve o contato célula-célula e a atuação de citocinas imunorreguladoras, tais como, IL-10 e TGF- β (revisito por DURKIN e WAKSMAN, 2001). Zhang e colaboradores (2004) ao induzir EAE em camundongos da linhagem C57BL/6, utilizando 200 μ g do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, 400 μ g de *M. tuberculosis* e 150 ng de toxina pertussis, relataram que a inibição de células T regulatórias CD4⁺CD25⁺ *in vivo* através da utilização de anticorpo anti-CD25 aumentou a severidade da doença e diminuiu a produção de IL-10.

Vale ressaltar que no 14° d.p.i., na medula do grupo imunizado com 300 μ g do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, ocorreu aumento das citocinas IL-10 e TGF- β , acompanhado de redução das citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ , IL-1 β e TNF- α), com exceção da IL-17, que neste ponto estava elevada. Sabe-se que a citocina IL-10 desempenha um papel importante na regulação de doenças autoimunes, sendo capaz de inibir respostas de perfil Th1 (FIORENTINO, BOND e MOSMANN, 1989). Além disso, o trabalho de McGeachy e colaboradores (2007) mostrou que um aumento na produção de IL-10 pode ser induzido por TGF- β e IL-6, sugerindo que nestas condições possa ocorrer uma co-expressão de IL-10 e IL-17 resultado da atuação de linfócitos T reguladores, ou mesmo da ação de clones de linfócitos Th17 reguladores, que produzem IL-17 e IL10.

No presente estudo, nota-se também aumento dos níveis de IL-10 e TGF- β na medula de ambos os grupos imunizados, no 58° d.p.i.. Neste mesmo ponto ocorreu redução do infiltrado celular inflamatório, das quimiocinas CCL5 e CCL20 e da citocina IFN- γ . Lees e colaboradores (2008) em estudo utilizando transferência adotiva de células polarizadas para o perfil Th1, inoculadas em camundongos do

tipo selvagem, deficientes em IFN- γ e deficientes em receptores para IFN- γ , verificaram a importância do IFN- γ no estabelecimento de um infiltrado celular e consequente desenvolvimento de lesões na medula espinhal. Portanto, pode-se sugerir que o aumento de IL-10 e TGF- β produzidos por linfócitos T reguladores e a redução do IFN- γ na medula espinhal de ambos os grupos imunizados, no 58° d.p.i., pode ter contribuído para a redução das quimiocinas e do infiltrado celular inflamatório.

De forma bastante interessante, a avaliação das citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ , IL-17 e IL-6) nos linfonodos inguinais do grupo imunizado com 100 μ g do peptídeo MOG₃₅₋₅₅ mostrou baixa concentração dessas citocinas no 7° d.p.i., com aumento gradativo nos demais pontos avaliados (10°, 14° e 21° d.p.i.). No grupo imunizado com 300 μ g do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, estas citocinas já estavam elevadas no 7° d.p.i. e apresentaram gradativa redução nos pontos posteriores. No SNC os resultados observados para as citocinas foram contrários aos encontrados nos linfonodos inguinais. No grupo de animais imunizados com 100 μ g do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, os níveis das citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ , IL-17 e IL-6), tanto no cérebro, quanto na medula espinhal, estavam elevados no 7° d.p.i., com redução nos demais pontos avaliados. No grupo imunizado com 300 μ g do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, estas citocinas estavam reduzidas no 7° d.p.i. e apresentaram aumento a partir do 10° d.p.i..

Estudo envolvendo a indução de EAE em camundongos SJL/J imunizados com PLP₁₃₉₋₁₅₁ (1 mg/mL) e toxina pertussis (200 ng) mostrou a presença de células T específicas para PLP produtoras de IFN- γ e IL-17 nos linfonodos drenantes no 4° dia pós-imunização, enquanto estas mesmas células não foram detectadas no SNC neste ponto (HOFSTETTER e FORSTHUBER, 2010). Desta forma, uma possível explicação para a diferença entre os resultados observados para a produção de citocinas no SNC e nos linfonodos inguinais do grupo imunizado com 100 μ g do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, seria a presença de intensa resposta imunológica precoce, possivelmente acontecendo nos dias iniciais nos órgãos linfóides periféricos, como os linfonodos drenantes. Isto poderia influenciar o influxo de células e a resposta imunológica no SNC. Entretanto, mais estudos serão realizados para a avaliação do perfil fenotípico das células envolvidas, através da marcação com CD4/IL-10,

CD4/Foxp3 e da avaliação da resposta imune inata para melhor elucidação da modulação da resposta imunológica no modelo de EAE.

7 CONCLUSÃO

- A variação somente na concentração do antígeno MOG₃₅₋₅₅ não foi capaz de induzir cursos clínicos diferentes neste modelo de EAE;
- A variação na concentração do antígeno MOG₃₅₋₅₅ foi capaz de influenciar parâmetros imunológicos e histológicos;
- A utilização da maior concentração do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, parece promover a ação de clones de linfócitos T reguladores.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, C.W.; POSTON, R.N.; BUK, S.J. 1989. Pathology, biochemistry and immunocytochemistry of lesions in acute multiple sclerosis. **Journal of the neurological sciences**, **92 (2-3)**: 291-306.

ANNUNZIATO, F.; COSMI, L.; SANTARLASCI, V.; MAGGI, L.; LIOTTA, F.; MAZZINGHI, B.; PARENTE, E.; FILÌ, L.; FERRI, S.; FROSALI, F.; GIUDICI, F.; ROMAGNANI, P.; PARRONCHI, P.; TONELLI, F.; MAGGI, E.; ROMAGNANI, S. 2007. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. **The Journal of experimental medicine**, **204 (8)**: 1849–1861.

BABCOCK, A.; OWENS, T. 2003. Chemokines in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. **Advances in experimental medicine and biology**, **520**: 120-132.

BAECHER-ALLAN, C.; BROWN, J.A.; FREEMAN, G.J.; HAFLER, D.A. 2001. CD4⁺CD25^{high} regulatory cells in human peripheral blood. **The Journal of immunology**, **167 (3)**: 1245-1253.

BALASHOV, K.E.; ROTTMAN, J.B.; WEINER, H.L.; HANCOCK, W.W. 1999. CCR5(+) and CXCR(+) T cells are increased in multiple sclerosis and their ligands MIP-1alpha and IP-10 are expressed in demyelinating brain lesions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **96 (12)**: 6873-6878.

BARTOSIK-PSUJEK, H.; STELMASIAK, Z. 2006. The interleukin-10 levels as a potential indicator of positive response to interferon beta treatment of multiple sclerosis patients. **Clinical neurology and neurosurgery**, **108 (7)**: 644–647.

BAUER, J.; HUITINGA, I.; ZHAO, W.; LASSMANN, H.; HICKEY, W.F.; DIJKSTRA, C.D. 1995. The role of macrophages, perivascular cells and microglial cells in the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. **Glia**, **15 (4)**: 437-446.

BAXTER, A.G. 2007. The origin and application of experimental autoimmune encephalomyelitis. **Nature reviews Immunology**, **7 (11)**: 904–912.

BEGOLKA, W.S.; VANDERLUGT, C.L.; RAHBE, S.M.; MILLER, S.D. 1998. Differential expression of inflammatory cytokines parallels progression of central nervous system pathology in two clinically distinct models of multiple sclerosis. **The Journal of immunology**, **161 (8)**: 4437-4446.

BELMADANI, A.; TRAN, P.B.; REN, D.; MILLER, R.J. 2006. Chemokines regulate the migration of neural progenitors to sites of neuroinflammation. **The Journal of Neuroscience**, **26 (12)**: 3182-3191.

BENVENISTE, E.N. 1997. Role of macrophages/microglia in multiple sclerosis and experimental allergic encephalomyelitis. **Journal of Molecular Medicine**, **75 (3)**: 165–173.

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 (4)**: 434–445.

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 (9)**: 1073–1081.

BETTELLI, E.; CARRIER, Y.; GAO, W.; KORN, T.; STROM, T.B.; OUKKA, M.; WEINER, H.L.; KUCHROO, V.K. 2006. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. **Nature**, **441 (7090)**: 235–238.

BILLIAU, A.; MATTHYS, P. 2001. Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. **Journal of Leukocyte Biology**, **70 (6)**: 849-860.

BROWN, D.A.; SAWCHENKO, P.E. 2007. Time course and distribution of inflammatory and neurodegenerative events suggest structural bases for the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. **The Journal of comparative neurology**, **502 (2)**: 236-260.

BRUCK, W.; SOMMERMEIER, N.; BERGMANN, M.; ZETTL, U.; GOEBEL, H.H.; KRETZSCHMAR, H.A.; LASSMANN, H. 1996. Macrophages in multiple sclerosis. **Immunobiology**, **195 (4-5)**: 588-600.

CARRIERI, P.B.; MAIORINO, A.; PROVITERA, V.; SOSCIA, E.; PERRELLA, O. 1992. Cytokines in the pathogenesis of multiple sclerosis. **Acta neurologica**, **14 (4-6)**: 333-41.

CARRIERI, P.B.; PROVITERA, V.; DE ROSA, T.; TARTAGLIA, G.; GORGA, F.; PERRELLA, O. 1998. Profile of cerebrospinal fluid and serum cytokines in patients

with relapsing-remitting multiple sclerosis: a correlation with clinical activity. **Immunopharmacology and immunotoxicology**, **20 (3)**: 373–382.

CHEN, W.; JIN, W.; HARDEGEN, N.; LEI, K.J.; LI, L.; MARINOS, N.; MCGRADY, G.; WAHL, S. M. 2003. Conversion of peripheral CD41CD25- naive T cells to CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. **The Journal of Experimental Medicine**, **198 (12)**: 1875-1886.

COHEN, I. R. 2001. Antigenic mimicry, clonal selection and autoimmunity. **Journal of autoimmunity**, **16 (3)**: 337-340.

COSTA, O.; DIVOUX, D.; ISCHENKO, A.; TRON, F.; FONTAINE, M. 2003. Optimization of an animal model of experimental autoimmune encephalomyelitis achieved with a multiple MOG(35-55)peptide in C57BL6/J strain of mice. **Journal of autoimmunity**, **20 (1)**: 51-61.

CZLONKOWSKA, A.; CIESIELSKA, A.; GROMADZKA, G.; KURKOWSKA-JASTRZEBSKA, I. 2005. Estrogen and cytokines production - the possible cause of gender differences in neurological diseases. **Current pharmaceutical design**, **11 (8)**: 1017-1030.

DE PAULA, M.L.; RODRIGUES, D.H.; TEIXEIRA, H.C.; BARSANTE, M.M.; FERREIRA, A.P. 2008. Genistein down-modulates proinflammatory cytokines and reverses clinical signs of experimental autoimmune encephalomyelitis. **International Immunopharmacology**, **8 (9)**: 1291-1297.

DeLUCA, G.C.; WILLIAMS, K.; EVANGELOU, N.; EBERS, G.C.; ESIRI, M.M. 2006. The contribution of demyelination to axonal loss in multiple sclerosis. **Brain**, **129 (Pt6)**: 1507-1516.

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.

DUA, T.; ROMANI, P. 2008. Atlas of Multiple Sclerosis Resources in the World 2008. Geneva: WHO, p. 54.

DURKIN, H.G.; WAKSMAN, B.H. 2001. Thymus and tolerance. Is regulation the major function of the thymus? **Immunological reviews**, **182**: 33-57.

EDWARDS, L.J.; SHARRACK, B.; ISMAIL, A.; TUMANI, H.; CONSTANTINESCU, C.S. 2011. Central inflammation versus peripheral regulation in multiple sclerosis. **Journal of neurology**, **258 (8)**: 1518–1527.

ENGELHARDT, B.; RANSOHOFF, R.M. 2005. The ins and outs of T-lymphocyte trafficking to the CNS: anatomical sites and molecular mechanisms. **Trends Immunology**, **26 (9)**: 485–495.

EUGSTER, H.P.; FREI, K.; KOPF, M.; LASSMANN, H.; FONTANA, A. 1998. IL-6-deficient mice resist myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced autoimmune encephalomyelitis. **European Journal of Immunology**, **28 (7)**: 2178–2187.

FERRARI, C.C.; DEPINO, A.M.; PRADA, F.; MURARO, N.; CAMPBELL, S.; PODHAJECER, O.; PERRY, V.H.; ANTHONY, D.C.; PITOSI, F.J. 2004. Reversible demyelination, blood–brain barrier breakdown, and pronounced neutrophil recruitment induced by chronic IL-1 expression in the brain. **The American Journal of Pathology**, **165 (5)**: 1827–1837.

FIORENTINO, D.F.; BOND, M.W.; MOSMANN, T.R. 1989. Two types of mouse T helper cell IV Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. **The Journal of experimental medicine**, **170 (6)**: 2081–95.

FRISCHER, J.M.; BRAMOW, S.; DAL-BIANCO, A.; LUCCHINETTI, C.F.; RAUSCHKA, H.; SCHMIDBAUER, M.; LAURSEN, H.; SORENSEN, P.S.; LASSMANN, H. 2009. The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. **Brain**, **132 (Pt5)**: 1175–1189.

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.

GENAIN, C.P., CANELLA, B., HAUSER, S.L., RAINE, C.S. 1999. Identification of autoantibodies associated with myelin damage in multiple sclerosis. **Nature medicine**, **5 (2)**: 170–175.

GENAIN, C.P.; HAUSER, S.L. 2001. Experimental allergic encephalomyelitis in the New World monkey *Callithrix jacchus*. **Immunological reviews**, **183**: 159–172.

GLABINSKI, A.R.; BIELECKI, B.; O'BRYANT, S.; SELMAJ, K.; RANSOHOFF, R.M. 2002. Experimental autoimmune encephalomyelitis: CC chemokine receptor expression by trafficking cells. **Journal of Autoimmunity**, **19 (4)**: 175-181.

HAFLER, D.A. 1999. The distinction blurs between an autoimmune versus microbial hypothesis in multiple sclerosis. **The Journal of clinical investigation**, **104 (5)**: 527-529.

HART, B.A.; GRAN, B.; WEISSERT, R. 2011. EAE: imperfect but useful models of multiple sclerosis. **Trends in Molecular Medicine**, **17 (3)**: 119 – 125.

HAUSER, S.L.; DOOLITTLE, T.H.; LINCOLN, R.; BROWN, R.H.; DINARELLO, C.A. 1990. Cytokine accumulations in CSF of multiple sclerosis patients: frequent detection of interleukin-1 and tumor necrosis factor but not interleukin-6. **Neurology**, **40 (11)**: 1735–1739.

HAVLA, J.; PELLKOFER, H.L.; HOHLFELD, R.; KÜMPFEL, T. 2011. Multiple sclerosis: can therapy delay ongoing disability? **MMW Fortschritte der Medizin**, **153 (14)**: 63-66.

HOFSTETTER, H.H.; FORSTHUBER, T.G. 2010. Kinetics of IL-17- and interferon-gamma-producing PLPp-specific CD4 T cells in EAE induced by coinjection of PLPp/IFA with pertussis toxin in SJL mice. **Neuroscience letters**, **476 (3)**: 150-155.

HUNTER, C.A. 2005. New IL-12 family members: IL-23 and IL-27, cytokines with divergent functions. **Nature reviews. Immunology**, **5 (7)**: 521-531.

IMLER, T.J.; JR, PETRO, T.M. 2009. Decreased severity of experimental autoimmune encephalomyelitis during resveratrol administration is associated with increased IL-17⁺IL-10⁺ T cells, CD4(-) IFN-gamma⁺ cells, and decreased macrophage IL-6 expression. **International Immunopharmacology**, **9 (1)**: 134-143.

ISHIZU, T.; OSOEGAWA, M.; MEI, F.J.; KIKUCHI, H.; TANAKA, M.; TAKAKURA, Y.; MINOHARA, M.; MURAI, H.; MIHARA, F.; TANIWAKI, T.; KIRA, J. 2005. Intrathecal activation of the IL-17/IL-8 axis in opticospinal multiple sclerosis. **Brain**, **128 (5)**: 988–1002.

JALOSINSKI, M.; KAROLCZAK, K.; MAZUREK, A.; GLABINSKI, A. 2008. The effects of methylprednisolone and mitoxantrone on CCL5-induced migration of lymphocytes in multiple sclerosis. **Acta Neurologica Scandinavica**, **118 (2)**: 120-125.

JAMES, W.G.; BULLARD, D.C.; HICKEY, M.J. 2003. Critical role of the (4 integrin/VCAM-1 pathway in cerebral leukocyte trafficking in lupusprone MRL/faz IPR mice. **Journal of immunology**, **170 (1)**: 520-527.

JONULEIT, H.; SCHMITT, E.; STASSEN, M.; TUETTENBERG, A.; KNOP, J.; ENK, A.H. 2001. Identification and functional characterization of human CD4⁺CD25⁺ T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. **The Journal of experimental medicine**, **193 (11)**: 1285-1294.

KABAT, E.A.; WOLF, A.; BEZER, A.E. 1946. Rapid production of acute disseminated encephalomyelitis in rhesus monkeys by injection of brain tissue with adjuvants. **Science**, **104 (1946)**: 362–363.

KAWAI, T.; ANDREWS, D.; COLVIN, R.B.; SACHS, D.H.; COSIMI, A.B. 2000. Thromboembolic complications after treatment with monoclonal antibody against CD40 ligand. **Nature medicine**, **6 (2)**: 114.

KEBIR, H.; KREYMBORG, K.; IFERGAN, I. 2007. Human T(H)17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. **Nature Medicine**, **13 (10)**: 1173-1175.

KEBIR, H.; IFERGAN, I.; ALVAREZ, J.I.; BERNARD, M.; POIRIER, J.; ARBOUR, N.; DUQUETTE, P.; PRAT, A. 2009. Preferential recruitment of interferon-gamma-expressing TH17 cells in multiple sclerosis. **Annals of neurology**, **66 (3)**: 390–402.

KERCHENSTEINER, M.; BAREYRE, F.M.; BUDDEBERG, B.S.; MERKLER, D.; STADELMANN, C.; BRUCK, W.; MISGELD, T.; SCHWAB, M.E. 2004. Remodeling of axonal connections contributes to recovery in an animal model of multiple sclerosis. **The Journal of Experimental Medicine**, **200 (8)**: 1027-38.

KERFOOT, S.M.; KUBES, P. 2002. Overlapping roles of P-selectin and alpha 4-integrin to recruit leukocytes to the central nervous system in experimental autoimmune encephalomyelitis. **The Journal of immunology**, **169 (2)**: 1000– 1006.

KIVISÄKK, P.; MAHAD, D.J.; CALLAHAN, M.K.; TREBST, C.; TUCKY, B.; WEI, T.; WU, L.; BAEKKEVOLD, E.S.; LASSMANN, H.; STAUGAITIS, S.M.; CAMPBELL, J.J.; RANSOHOFF, R.M. 2003. Human cerebrospinal fluid central memory CD4⁺ T cells: evidence for trafficking through choroid plexus and meninges via P-selectin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **100 (14)**: 8389–8394.

KIVISAKK, P.; TUCKY, B.; WEI, T.; CAMPBELL, J.J.; RANSOHOFF, R.M. 2006. Human cerebrospinal fluid contains CD4⁺ memory T cells expressing gut- or skin-specific trafficking determinants: relevance for immunotherapy. **BMC immunology**, **7**: 14.

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

KUERTEN, S.; KOSTOVA-BALES, D.A.; FRENZEL, L.P.; TIGNO, J.T.; TARY-LEHMANN, M.; ANGELOV, D.N.; LEHMANN, P.V. 2007. MP4- and MOG:35–55-induced EAE in C57BL/6 mice differentially targets brain, spinal cord and cerebellum. **Journal of neuroimmunology**, **189 (1-2)**: 31-40.

KUERTEN, S.; ROTTLAENDER, A.; RODI, M.; VELASCO JR, V.B.; SCHROETER, M.; KAISER, C.; ADDICKS, K.; TARY-LEHMANN, M.; LEHMANN, P.V. 2010. The clinical course of EAE is reflected by the dynamics of the neuroantigen-specific T cell compartment in the blood. **Clinical immunology**, **137 (3)**: 422-32.

KUERTEN, S.; GRUPPE, T.L.; LAURENTIUS, L.M.; KIRCH, C.; TARY-LEHMANN, M.; LEHMANN, P.V.; ADDICKS, K. 2011. Differential patterns of spinal cord pathology induced by MP4, MOG peptide 35–55, and PLP peptide 178–191 in C57BL/6 mice. **Acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica**, **119 (6)**: 336-346.

KURTZKE, J.F. 1983. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). **Neurology**, **33 (11)**: 1444-1452.

LEES, J.R.; IWAKURA, Y.; RUSSELL, J.H. 2008. Host T cells are the main producers of IL-17 within the central nervous system during initiation of experimental autoimmune encephalomyelitis induced by adoptive transfer of Th1 cell lines. **The Journal of immunology**, **180 (12)**: 8066-8072.

LEHMANN, P.V.; FORSTHUBER, T.; MILLER, A.; SERCARZ, E.E. 1992. Spreading of T-cell autoimmunity to cryptic determinants of an autoantigen. **Nature**, **358 (6382)**: 155-157.

LUBLIN, F. D. 2007. The incomplete nature of multiple sclerosis relapse resolution. **Journal of the Neurological Sciences**, **15 (256)**: S14–S18.

LUBLIN, F.D.; MAURER, P.H.; BERRY, R.G.; TIPPETT, D. 1981. Delayed, relapsing experimental allergic encephalomyelitis in mice. **The Journal of immunology**, **126** (3): 819–822.

LUBLIN, F.D.; BAIER, M.; CUTTER, G. 2003. Effect of relapses on development of residual deficit in multiple sclerosis. **Neurology**, **61** (11): 1528-1532.

MACATONIA, S.E.; HOSKEN, N.A.; LITTON, M.; VIEIRA, P.; HSIEH, C.S.; CULPEPPER, J.A.; WYSOCKA, M.; TRINCHIERI, G.; MURPHY, K.M.; O'GARRA, A. 1995. Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4⁺ T cells. **The Journal of immunology**, **154** (10): 5071-5079.

MADSEN, L.S.; ANDERSSON, E.C.; JANSSON, L.; KROGSGAARD, M.; ANDERSEN, C.B.; ENGBERG, J.; STROMINGER, J.L.; SVEJGAARD, A.; HJORTH, J.P.; HOLMDAHL, R.; WUCHERPFENNIG, K.W.; FUGGER, L. 1999. A humanized model for multiple sclerosis using HLA-DR2 and a human T-cell receptor. **Nature genetics**, **23** (3): 343–347.

MAHAD, D.J.; TREBST, C.; KIVISAKK, P.; STAUGAITIS, S.M.; TUCKY, B.; WEI, T.; LUCCHINETTI, C.F.; LASSMANN, H.; RANSOHOFF, R.M. 2004. Expression of chemokine receptors CCR1 and CCR5 reflects differential activation of mononuclear phagocytes in pattern II and pattern III multiple sclerosis lesions. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, **63** (3): 262-273.

McGEACHY, M.J.; BAK-JENSEN, K.S.; CHEN, Y.; TATO, C.M.; BLUMENSCHNEIN, W.; MCCLANAHAN, T.; CUA, D.J. 2007. TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology. **Nature immunology**, **8** (12): 1390–1397.

McQUIBBAN, G.A.; GONG, J.H.; WONG, J.P.; WALLACE, J.L.; CLARK-LEWIS, I.; OVERALL, C.M. 2002. Matrix metalloproteinase processing of monocyte chemoattractant proteins generates CC chemokine receptor antagonists with anti-inflammatory properties in vivo. **Blood**, **100** (4): 1160-1107.

MILLER, D.H.; WEINSHENKER, B.G.; FILIPPI, M.; BANWELL, B.L.; COHEN, J.A.; FREEDMAN, M.S.; GALETTA, S.L.; HUTCHINSON, M.; JOHNSON, R.T.; KAPPOS, L.; KIRA, J.; LUBLIN, F.D.; MCFARLAND, H.F.; MONTALBAN, X.; PANITCH, H.; RICHERT, J.R.; REINGOLD, S.C.; POLMAN, C.H. 2008. Differential diagnosis of suspected multiple sclerosis: a consensus approach. **Multiple sclerosis**, **14** (9): 1157–1174.

MILO, R.; KAHANA, E. 2010. Multiple sclerosis: geoepidemiology, genetics and the environment. **Autoimmunity reviews**, **9 (5)**: A387-394.

MIX, E.; MEYER-RIENECKER, H.; ZETTL, U.K. 2008. Animal models of multiple sclerosis for the development and validation of novel therapies – potential and limitations. **Journal of neurology**, **255 (S6)**: 7–14.

MOWRY, E.M.; PESIC, M.; GRIMES, B.; DEEN, S.; BACCHETTI, P.; WAUBANT, E. 2009. Demyelinating events in early multiple sclerosis have inherent severity and recovery. **Neurology**, **72 (7)**: 602-608.

MUILI, K.A.; GOPALAKRISHNAN, S.; MEYER, S.L.; EELLS, J.T.; LYONS, J.A. 2012. Amelioration of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in C57BL/6 Mice by Photobiomodulation Induced by 670 nm Light. **PLoS One**, **7 (1)**: e30655.

MURPHY, A.C.; LALOR, S.J.; LYNCH, M.A.; MILLS, K.H.G. 2010. Infiltration of Th1 and Th17 cells and activation of microglia in the CNS during the course of experimental autoimmune encephalomyelitis. **Brain, Behavior and Immunity**, **24 (4)**: 641-651.

NÚÑEZ-IGLESIAS, M.J.; NOVÍO, S.; ALMEIDA-DIAS, A.; FREIRE-GARABAL, M. 2010. Inhibitory effects of alprazolam on the development of acute experimental autoimmune encephalomyelitis in stressed rats. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, **97 (2)**: 350-356.

OLSSON, T.; ZHI, W.W.; HÖJEBERG, B.; KOSTULAS, V.; JIANG, Y.P.; ANDERSON, G.; EKRE, H.P.; LINK, H. 1990. Autoreactive T lymphocytes in multiple sclerosis determined by antigeninduced secretion of interferon-gamma. **The Journal of clinical investigation**, **86 (3)**: 981–985.

PENKOWA, M.; HIDALGO, J.; 2001. Metallothionein treatment reduces proinflammatory cytokines IL-6 and TNF-alpha and apoptotic cell death during experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). **Experimental Neurology**, **170 (1)**: 1–14.

PETTINELLI, C.B.; MCFARLIN, D.E. 1981. Adoptive transfer of experimental allergic encephalomyelitis in SJL/J mice after in vitro activation of lymph node cells by myelin basic protein: requirement for Lyt 1+ 2- T lymphocytes. **The Journal of immunology**, **127 (4)**: 1420-1423.

PETITO, C.K.; ADKINS, B. 2005. Choroid plexus selectively accumulates T-lymphocytes in normal controls and after peripheral immune activation. **Journal of Neuroimmunology**, **162 (1-2)**: 19-27.

PICCIO, L.; ROSSI, B.; SCARPINI, E.; LAUDANNA, C.; GIAGULLI, C.; ISSEKUTZ, A.C.; VESTWEBER, D.; BUTCHER, E.C.; CONSTANTIN, G. 2002. Molecular mechanisms involved in lymphocyte recruitment in inflamed brain microvessels: critical roles for P-selectin glycoprotein ligand-1 and heterotrimeric Gi-linked receptors. **The Journal of immunology**, **168 (4)**: 1940-1949.

POLMAN, C.H.; REINGOLD, S.C.; BANWELL, B.; CLANET, M.; COHEN, J.A.; FILIPPI, M.; FUJIHARA, K.; HAVRDOVA, E.; HUTCHINSON, M.; KAPPOS, L.; LUBLIN, F.D.; MONTALBAN, X.; O'CONNOR, P.; SANDBERG-WOLLHEIM, M.; THOMPSON, A.J.; WAUBANT, E.; WEINSHENKER, B.; WOLINSKY, J.S. 2011. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2011 revisions to the McDonald criteria. **Annals of neurology**, **69 (2)**: 292-302.

PRINEAS, J.W.; WRIGHT, R.G. 1978. Macrophages, lymphocytes and plasma cells in the perivascular compartment in chronic multiple sclerosis. **Laboratory investigation**, **38 (4)**: 409-421.

QUINTANA, A.; MULLER, M.; FRAUSTO, R.F.; RAMOS, R.; GETTS, D.R.; SANZ, E.; HOFER, M.J.; KRAUTHAUSEN, M.; KING, N.J.; HIDALGO, J.; CAMPBELL, I.L. 2009. Site-specific production of IL-6 in the central nervous system retargets and enhances the inflammatory response in experimental autoimmune encephalomyelitis. **The Journal of Immunology**, **183 (3)**: 2079–2088.

RANSOHOFF, R.M. 2002. The chemokine system in neuroinflammation: an update. **The Journal of infectious diseases**, **186 Suppl 2**: S152-6.

RANSOHOFF, R. M.; KIVISAKK, P.; KIDD, G. 2003. Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. **Nature Reviews Immunology**, **3 (7)**: 569–581.

RAO, P.; SEGAL, B.M. 2004. Experimental autoimmune encephalomyelitis. **Methods in molecular medicine**, **102**: 363-375.

REBOLDI, A.; CAROLINE COISNE, C.; DIRK BAUMJOHANN, D.; FEDERICA BENVENUTO, F.; BOTTINELLI, D.; LIRA, S.; UCCELLI, A.; LANZAVECCHIA, A.; BRITTA ENGELHARDT, B; SALLUSTO, F. 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 (5)**: 514-523.

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 (1)**: 39–53.

RIVERS, T.; SCHWENTKER, F.F. 1935. Encephalomyelitis accompanied by myelin destruction experimentally produced in monkeys. **The Journal of experimental medicine**, **61 (5)**: 689–702.

ROTTMAN, J.B.; SLAVIN, A.J.; SILVA, R.; WEINER, H.L.; GERARD, C.G.; HANCOCK, W.W. 2000. Leukocyte recruitment during onset of experimental allergicecephalomyelitis is CCR1 dependent. **European Journal of Immunology**, **30 (8)**: 2372-2377.

SANTOS, A.C.; BARSANTE, M.M.; ARANTES R.M.E.; BERNARD, C.C.A.; TEIXEIRA, M.M.; TAVARES, J.C. 2005. CCL2 and CCL5 mediate leukocyte adhesion in experimental autoimmune encephalomyelitis - an intravital microscopy study. **Journal of Neuroimmunology**, **162 (1-2)**: 122-129.

SEDGWICK, J.D.; RIMINTON, D.S.; CYSTER, J.G.; KORNER, H. 2000. Tumor necrosis factor: a master-regulator of leukocyte movement. **Immunol. Today**, **21 (9)**: 110–113.

SEGAL, B.M. 2003. Experimental autoimmune encephalomyelitis: cytokines, effector T cells, and antigen-presenting cells in a prototypical Th1-mediated autoimmune disease. **Current allergy and asthma reports**, **3 (1)**: 86-93.

SEGAL, B.M.; CONSTANTINESCU, C.S.; RAYCHAUDHURI, A.; KIM, L.; FIDELUS-GORT, R.; KASPER, L.H. 2008. Repeated subcutaneous injections of IL12/23 p40 neutralising antibody, ustekinumab, in patients with relapsingremitting multiple sclerosis: a phase II, double-blind, placebocontrolled, randomised, dose-ranging study. **Lancet neurology**, **7 (9)**: 796–804.

SELMAJ, K.W. 2000. Tumour necrosis factor and anti-tumour necrosis factor approach to inflammatory demyelinating diseases of the central nervous system. **Annals of the Rheumatic Diseases**, **59 (S1)**: 94–102.

SHAO, H.; HUANG, Z.; SUN, S.L.; KAPLAN, H.J.; SUN, D. 2004. Myelin/oligodendrocyte glycoprotein-specific T-cells induce severe optic neuritis in

the C57BL/6 mouse. **Investigative ophthalmology & visual science**, **45 (11)**: 4060-4065.

SHARIEF, M.K.; HENTGES, R. 1991. Association between tumor necrosis factor-alpha and disease progression in patients with multiple sclerosis. **The New England journal of medicine**, **325 (7)**: 467–472.

SMOLIANOV, V.; DEHMEL, T.; VOLLMAR, P.; MAUSBERG, A.K.; KIESEIER, B.C.; HEMMER, B.; HARTUNG, H.P.; HOFSTETTER, H.H. 2011. Alteration of T cell cytokine production in PLP_{p-139-151}-induced EAE in SJL mice by an immunostimulatory CpG oligonucleotide. **Journal of neuroinflammation**, **30 (8)**: 59.

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

SRIRAM, S.; STEINER, I. 2005. Experimental allergic encephalomyelitis: a misleading model of multiple sclerosis. **Annals of neurology**, **58 (6)**: 939–945.

STEFFEN, B.J.; BREIER, G.; BUTCHER, E.C.; SCHULZ, M.; ENGELHARDT, B. 1996. ICAM-1, VCAM-1, and MAdCAM-1 are expressed on choroid plexus epithelium but not endothelium and mediate binding of lymphocytes in vitro. **The American Journal of Pathology**, **148 (6)**: 1819-1838.

STROMNES, I.M.; GOVERMAN J.M. 2004. Active induction of experimental allergic encephalomyelitis. **Nature Protocols**, **1 (4)**: 1810-1819.

SUTTON, C.; BRERETON, C.; KEOGH, B.; MILLS, K.H.; LAVALLE, E.C. 2006. A crucial role for interleukin (IL)-1 in the induction of IL-17-producing T cells that mediate autoimmune encephalomyelitis. **The Journal of Experimental Medicine**, **203 (7)**: 1685–1691.

SUTTON, C.E.; LALOR, S.J.; SWEENEY, C.M.; BRERETON, C.F.; LAVALLE, E.C.; MILLS, K.H. 2009. Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from gammadelta T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity. **Immunity**, **31 (2)**: 331–341.

SVENNINGSSON, A.; HANSSON, G.K.; ANDERSEN, O.; ANDERSSON, R.; PATARROYO, M.; STEMME, S. 1993. Adhesion molecule expression on cerebrospinal fluid T lymphocytes: evidence for common recruitment mechanisms in multiple sclerosis, aseptic meningitis, and normal controls. **Annals of Neurology**, **34 (2)**: 155-161.

TAKAHASHI, T.; KUNIYASU, Y.; TODA, M.; SAKAGUCHI, N.; ITOH, M.; IWATA, M.; SHIMIZU, J.; SAKAGUCHI, S. 1998. Immunologic selftolerance maintained by CD25+CD4+ T cells: induction of autoimmune diseases by breaking their anergic/suppressive state. **International immunology**, **10 (12)**: 1969-1980.

TANG, T.; FRENETTE, P.S.; HYNES, R.O.; WAGNER, D.D.; MAYADAS, T.N. 1996. Cytokine-induced meningitis is dramatically attenuated in mice deficient in endothelial selectins. **The Journal of clinical investigation**, **97 (11)**: 2485-2490.

THEIL, D.J.; TSUNODA, I.; RODRIGUEZ, F.; WHITTON, J.L.; FUJINAMI, R.S. 2001. Viruses can silently prime for and trigger central nervous system autoimmune disease. **Journal of neurovirology**, **7 (3)**: 220-227.

TSUKADA, N.; MIYAGI, K.; MATSUDA, M.; YANAGISAWA, N.; YONE, K. 1991. Tumor necrosis factor and interleukin-1 in the CSF and sera of patients with multiple sclerosis. **Journal of the neurological sciences**, **104 (2)**: 230– 234.

TZARTOS, J.S.; FRIESE, M.A.; CRANER, M.J.; PALACE, J.; NEWCOMBE, J.; ESIRI, M.M.; FUGGER, L. 2008. Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. **The American journal of pathology**, **172 (1)**: 146–155.

VELDHOEN, M.; HOCKING, R.J.; ATKINS, C.J.; LOCKSLEY, R.M.; STOCKINGER, B. 2006. TGF- β in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. **Immunity**, **24 (2)**: 179–189.

VON HERRATH, M.G.; FUJINAMI, R.S.; WHITTON, J.L. 2003. Microorganisms and autoimmunity: making the barren field fertile? *Nature reviews*. **Microbiology**, **1 (2)**: 151-157.

VOSKUHL, R.R.; MARTIN, R.; BERGMAN, C.; DALAL, M.; RUDDLE, N.H.; MCFARLAND, H.F. 1993. T helper 1 (Th1) functional phenotype of human myelin basic protein-specific T lymphocytes. **Autoimmunity**, **15 (2)**: 137–143.

WEINER, H.L. 2009. The Challenge of Multiple Sclerosis: How Do We Cure A Chronic Heterogeneous Disease? **Annals of neurology**, **65 (3)**: 239–248.

WEINSHENKER, B.G.; BASS, B.; RICE, G.P.; NOSEWORTHY, J.; CARRIERE, W.; BASKERVILLE, J. 1989. The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. I. Clinical course and disability. **Brain**, **112 (1)**: 133–46.

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

WING, K.; SAKAGUCHI, S. 2010. Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. **Nature Immunology**, **11 (1)**: 7-13.

WINGERCHUK, D.M.; HOGANCAMP, W.F.; O'BRIEN, P.C.; WEINSHENKER, B.G. 1999. The clinical course of neuromyelitis optica (Devic's syndrome). **Neurology**, **53 (5)**: 1107–1114.

WOLF, A.; KABAT, E.A.; BEZER, A.E. 1947. The pathology of acute disseminated encephalomyelitis produced experimentally in the rhesus monkey and its resemblance to human demyelinating disease. **Journal of neuropathology and experimental neurology**, **6 (4)**: 333–357.

ZAMVIL, S.; NELSON, P.; TROTTER, J.; MITCHELL, D.; KNOBLER, R.; FRITZ, R.; STEINMAN, L. 1985. T cell clones specific for myelin basic protein induce chronic relapsing EAE and demyelination. **Nature**, **317 (6035)**: 355–358.

ZHANG, X.; KOLDZIC, D.N.; IZIKSON, L.; REDDY, J.; NAZARENO, R.F.; SAKAGUCHI, S.; KUCHROO, V.K.; WEINER, H.L. 2004. IL-10 is involved in the suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by CD25 + CD4+ regulatory T cells. **International immunology**, **16 (2)**: 249– 256.

ZLOTNIK, A.; YOSHIE, O. 2000. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. **Immunity**, **12 (2)**: 121–127.